N° d'ordre : 831

50376
1980
70

50376
1980
70

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : BIOLOGIE VEGETALE

mention Microbiologie

par

Daniel OCHIN

LA PRODUCTION EN MASSE ET LA PREPARATION DE CELLULES DESHYDRATEES DE RHIZOBIUM

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Soutenue le 1er juillet 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	MM.	J. GUILLAUME	Président
		J.C. DERIEUX	Rapporteur
		C. BONNIER	Examinateur
		B. MONTUELLE	Examinateur
		R. TAILLIEZ	Examinateur

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous le remercions vivement pour nous avoir accueilli mais aussi pour ses conseils et encouragements permanents qui ont permis la réalisation de ce travail.

Nous remercions Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX pour avoir accepté de juger cette thèse et de siéger dans notre jury.

Nous remercions Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ d'avoir consacré une bonne partie de son temps à la lecture attentive du manuscrit et de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Que Monsieur le Professeur B.MONTUELLE trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance d'avoir accepter de juger notre travail.

Monsieur le Recteur BONNIER nous a fait bénéficier de sa très grande expérience du Rhizobium, nous lui adressons nos plus vifs remerciements et nous lui sommes très reconnaisants d'avoir accepté de participer à notre jury.

Que Messieurs B. COURTOIS, C. DEFIVES, J.P. HORNEZ et M. WERQUIN , ainsi que Madame LETOQUART et Monsieur A. DECQ soient vivement remerciés.

Table des Matieres

Pages

CHAPITRE I : INTRODUCTION 1

AVANT PROPOS 1

GENERALITES 5

I. Importance de l'inoculation artificielle des légumineuses..... 5

II. Préparation et conservation des inoculums pour légumineuses..... 7

I. Les cultures de Rhizobium pour inoculums..... 7
2. Les inoculums liquides..... 8
3. Les inoculums sur supports solides..... 9
a) les propriétés de la tourbe ..... IO
b) la préparation du support..... II
c) l'ensemencement du support II
d) conservation et transport..... II

4. Les autres formes d'inoculums I2

III. Principales méthodes d'application des inoculums... I3

I. L'application directe I3
a) l'imprégnation à sec..... I3
b) l'imprégnation humide I4
c) l'enrobage des graines I4

2. L'application indirecte I4

BUTS DU TRAVAIL I6

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES GENERALES..... I7

I MATERIEL BACTERIEN ET VEGETAL I7

I. Rhizobium à croissance rapide I7
2. Rhizobium à croissance lente..... I9
3. Souche de R.meliloti acido-tolérante $M_9Sm_1^{Str}$.. 2I
4. Entretien et conservation des souches de Rhizobium 2I
5. Légumineuses..... 22

II MILIEUX DE CULTURE ET TAMPON..... 23

I. Milieux empiriques pour Rhizobium 23
2. Milieux synthétiques pour Rhizobium..... 26
3. Tampon de non prolifération pour Rhizobium..... 29
4. Milieux de culture pour plantules de luzerne... 29

Pages

III PROCEDES DE CULTURE DES BACTERIES..... 3I

I. Cultures en tubes..... 3I
2. Cultures en flacons..... 32
3. Cultures suivies au biophotomètre..... 33
4. Cultures en fermenteur de laboratoire..... 35
4. 1. fermenteur utilisé 35
4. 2. Conduite de la fermentation..... 35
a. préparation..... 35
b. préculture..... 36
c. inoculation 36
d) déroulement et surveillance de la fermentation..... 37

IV METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.. 38

I. Méthodes physico-chimiques..... 38
a) mesure de l'absorbance ou D.O..... 38
b) mesure du poids sec des bactéries..... 4I
c) dosage des exopolyosides formés et du sucre consommé..... 4I

2. Méthodes microbiologiques..... 42
a) dénombrement des cellules viables dans les cultures ou les suspensions..... 42
b) dénombrement des bactéries infectantes dans un inoculum 43

V METHODES D'EVALUATION DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DE R. MELILOTI, DANS DES CONDITIONS ARTIFICIELLES, AU LABORATOIRE..... 44

I. Opérations préliminaires 44
a) la stérilisation des graines de luzerne... 44
b) la germination..... 45
c) la culture en tube 45
d) l'inoculation de la souche à tester..... 45

2. Le test de l'infectivité 45

3. Le test d'efficience 46

VI METHODES DE DESHYDRATATION ET DE CONSERVATION DE LA BIOMASSE 49

I. Procédés de concentration partielle de la biomasse..... 49
a) la centrifugation en continu..... 49
b) la concentration sous vide..... 49

Pages

2. Méthodes de déshydratation de la biomasse..... 5I
a) la lyophilisation..... 5I
a.1-principe général 5I
-la congélation..... 52
-la déshydratation..... 52
a.2-conditions expérimentales..... 53
-le lyophilisateur USIFROID..... 53
-le lyophilisateur SERAIL..... 54
b) l'atomisation..... 54
b.1-principe général..... 54
b.2-conditions expérimentales..... 55
-l'atomiseur MINOR-MOBILE 55
-l'atomiseur ANHYDRO..... 57
b.3-mesures effectuées..... 59

3. Moyens de conservation des cellules déshydratées 60

CHAPITRE III : RESULTATS ET COMMENTAIRES..... 6I

• PARTIE I PRODUCTION DE CELLULES DE RHIZOBIUM MELILOTI.. 6I

A ETUDE ET CHOIX DU MILIEU DE CULTURE..... 6I

I CONSIDERATIONS GENERALES..... 6I

II CULTURES DE RHIZOBIUM EN MILIEUX COMPLETS OU EMPIRIQUES..... 64
1. Cultures de souches de Rhizobium à croissance rapide..... 64
2. Cultures de souches de Rhizobium à croissance lente..... 69
3. Discussion et conclusion..... 74

III CHOIX DU MILIEU POUR LA CULTURE DE RHIZOBIUM MELILOTI..... 77
1. Souches utilisées..... 77
2. Cultures de R. meliloti sur milieux empiriques 78
a) étude du temps de génération 78
b) étude du milieu d'ISWARAN 83
3. Cultures de R. meliloti en milieux synthétiques..... 89
a) recherche du milieu le plus favorable pour R. meliloti 90
b) influence de la nature de la sourceazotée 94
c) influence de la quantité d'azote..... 97
d) Influence de la nature de la source carbonée..... 99
e) influence de la quantité de fructose..... IO2
f) exigences en vitamines de la souche $M_9Sm_1^{Str}$..... IO2

Pages

4. Synthèse et conclusion I05
a) comparaison des cultures en milieux complets et synthétiques..... I06
b) validité du milieu synthétique R.S..... I06
c) discussion et conclusion I08

B RECHERCHE DES CONDITIONS PHYSIQUES OPTIMALES POUR LA PRODUCTION DE CELLULES DE R. MELILOTI EN MILIEU SYNTHETIQUE II0

I INFLUENCE DE LA QUANTITE D'INOCULUM II0

II INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION II3

III INFLUENCE DU pH INITIAL DE LA CULTURE II4

IV INFLUENCE DE L'AERATION ET DE L'AGITATION II8

1. Notion du $K_L.a$ II8
2. recherche de $K_L.a$ optimal..... I20

V CONCLUSIONS I23

C PRODUCTION EN MASSE DE R. MELILOTI EN FERMENTEUR..... I24

I PRODUCTION DE R. MELILOTI EN MILIEUX COMPLETS ET SYNTHETIQUES..... I24

II PRODUCTION EN MILIEU R.S. DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ I27

III DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS..... I30

D CONSERVATION DE LA BIOMASSE I33

I CONSERVATION DE LA BIOMASSE A + 4°C SANS CONCENTRATION PREALABLE I34

II CONSERVATION DE LA BIOMASSE CONCENTREE, A + 4°C..... I34

Pages

• PARTIE 2 : PREPARATION ET CONSERVATION DE CELLULES DESHYDRATEES DE RHIZOBIUM MELILOTI..... I37

A PREPARATION ET CONSERVATION DES CELLULES DESHYDRATEES DE R. MELILOTI..... I37

INTRODUCTION..... I37

I. Cellules déshydratées par lyophilisation.. I37
a) les essais réalisés..... I37
b) les résultats obtenus..... I38
b 1 . conservation des bactéries durant la lyophilisation..... I38
b 2 . conservation des bactéries sans support gardées à différentes températures..... I39
- conservation sous air..... I39
- conservation sous vide..... I39
- conservation sous azote..... I39
b 3 . conservation des bactéries lyophilisées sur différents supports..... I39
c) conclusions..... I42

II. Cellules déshydratées par atomisation ... I43
a) les essais réalisés I43
b) les résultats obtenus..... I43
b 1 . conservation des bactéries durant l' atomisation..... I43
b 2 . conservation des bactéries atomisées,en fonction de la température d'entrée de l'air... I44
b 3 . conservation des bactéries atomisées à I40°C sur différents supports..... I44
b 4 . conservation des bactéries atomisées à I30°C, sur maltodextrine et conservées à 20-25°C I46

III. Discussions et conclusions. I48

Pages

B EVALUATIONS DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DES CELLULES DESHYDRATEES I52

I. Evaluation de la concentration en Rhizobium infectants dans les inoculums déshydratés..... I52

II. Evaluation de l'infectivité, de l'efficience et de l'acido-tolérance des cellules déshydratées de R. meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ I54

C TENTATIVE DE SELECTION D'UNE SOUCHE DE $M_9Sm_1^{Str}$ " ANHYDRO-RESISTANTE " I58

D DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS..... I6I

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE..... I63

Chapitre I

INTRODUCTION

A V A N T P R O P O S .

Nous savons depuis les travaux de HELLRIEGEL et WILFARTH en 1886 rappelés par WILSON (170) que des cellules bactériennes peuvent fixer l'azote atmosphérique .

Les Cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques sont à la fois capables de photosynthèse et de fixation de l'azote moléculaire . Rhizobium , Azotobacter , Nitrosomonas peuvent fixer l'azote, généralement en vivant en symbiose avec une plante hôte . D'autre bactéries fixatrices comme Azospirillum brasiliensis vivent associées aux racines des graminées fourragères tropicales, ou à celles du riz ou du maïs .Certains champignons inférieurs, les mycorrhizes ,ont aussi un rôle important dans l'alimentation azotée de certains arbres ou de plantes d'origine tropicale.

La symbiose certainement la mieux connue associe les bactéries du genre Rhizobium à des plantes de la vaste famille des légumineuses. Ces bactéries infectent les tissus racinaires et y provoquent la formation de nodules. Elles s'y transforment en " bactéroïdes " capables de synthétiser la nitrogénase qui permet la réduction de l'azote en ions ammonium, et les systèmes enzymatiques qui transformeront ceux-ci en acides aminés utilisables par la plante.

Cette symbiose Rhizobium - légumineuse est certainement celle qui présente le plus grand intérêt économique . D'après GROS , JACOB et ROYER 1979 (51)"la symbiose Rhizobium - légumineuse qui s'établit dans les nodosités est responsable de près de la moitié de la fixation biologique de l'azote à l'échelle planétaire . Ainsi la quantité d'azote fixé par ces légumineuses varie de 50 à 500 kg par hectare et par an .

Les récentes crises économiques (soja 1973, pétrole 1975) montrent bien que le développement des études fondamentales sur cette symbiose devient essentiel et doit permettre l'extension et la promotion des cultures de légumineuses, surtout à l'heure où des économies en énergie et en importation de protéines s'imposent. En effet beaucoup d'espèces donnent des graines riches en protéines ou sont des sources utiles de nourriture (soja , pois, haricot) ou de fourrage (luzerne). D'autres sont importantes par leur utilisation comme engrais vert ou comme pâturage (trèfle, vesce) . Des espèces tropicales produisent même du bois, des épices, des drogues. La production d'un aliment riche en protéine ne nécessitant pas beaucoup d'engrais azoté est particulièrement avantageux pour nos régions mais surtout pour les régions ou pays en voie de développement où protéines et engrais sont rares et coûteux .

Pour la luzerne,comme pour les autres légumineuses,l'obtention de récoltes à rendement satisfaisant dépend de l'établissement d'une association particulièrement efficiente entre la légumineuse à cultiver et une souche appropriée de Rhizobium . Ces souches sont rarement présentes dans le sol à cultiver : sols exempts de Rhizobium , sols hostiles à leur survie (sols acides,sols décalcifiés),sols contenant des Rhizobium très infectants mais peu compétitifs. Il est donc souvent nécessaire de pratiquer"l'inoculation" (106) avant, pendant ou après chaque semis,avec une souche très efficiente,convenablement sélectionnée, cultivée et conservée. Un tel R. meliloti, s'il s'agit de luzerne, doit être capable de :

- persister sur les graines et dans le sol concerné.
- surmonter la compétitivité des autres Rhizobium indigènes.
- provoquer rapidement la formation de nodules efficients.

Cette fixation symbiotique dépend aussi de nombreux autres facteurs: ceux influençant la croissance de la plante hôte,la présence plus ou moins grande d'azote dans le sol,par exemple .

Il semble néanmoins raisonnable de penser que des associations entre Rhizobium et des végétaux n'appartenant pas à la famille des légumineuses pourront,à plus ou moins long terme, être cultivées et contribuer ainsi à une importante économie d'engrais azoté.

L'importance agronomique et fondamentale de R. meliloti nous a conduit à étudier la production et la conservation de cette bactérie en vue de préparer un inoculum présentant des avantages certains sur ceux déjà existants.

Avant d'exposer les résultats de nos travaux nous présenterons dans la partie "Généralités" une étude bibliographique sommaire sur la préparation et l'application des inoculums pour légumineuses et particulièrement pour la luzerne (Medicago sativa) . C'est une légumineuse pérenne capable de donner des rendements élevés sans fertilisation azotée. En France et en Europe c'est la plante pour l'alimentation du bétail qui fournit le plus de protéines à l'ha (IO tonnes de matière sèche fournissent près de 2 tonnes de protéines). Parmi les autres avantages de cette espèce on peut citer son faible coût de revient et son rôle important dans l'amélioration de la fertilité des sols: elle apporte l'équivalent de 30% de la quantité totale d'azote fournie par l'industrie à l'agriculture française (communication I.N.R.A. LUSIGNAN).

G E N E R A L I T E S .

I . IMPORTANCE DE L' INOCULATION ARTIFICIELLE DES LEGUMINEUSES.

Les bactéries du genre Rhizobium sont présentes et peuvent survivre parfois très longtemps, en l'absence de plante-hôte, dans la majorité des sols (8,68) . Mais la culture de légumineuses dans de tels sols ne s'accompagne pas nécessairement d'une nodulation et d'une fixation d'azote atmosphérique. La symbiose n'est possible que si,lors du semis d'une légumineuse, l'espèce de Rhizobium spécifique correspondante est présente dans le sol. De plus ces bactéries doivent pouvoir infecter les jeunes racines, y provoquer la formation de nodules et être efficientes, c'est à dire capables d'assimiler et de transformer l'azote de l'air. Ces premières conditions de spécificité et d'efficience sont loin d'être toujours réunies dans la nature. Les techniques de sélection de souches de Rhizobium et d'inoculation artificielle des légumineuses permettent très souvent de les réunir.

Les nombreux résultats positifs obtenus après inoculation démontrent l'importance économique de cette technique culturale , aussi bien sur le continent européen (16,20,21,22,23,94,105,118) que dans les régions très diverses du monde entier (12-39-57-81).

Parmi les principales causes d'insuccés dans l'inoculation des légumineuses nous pouvons incriminer :

- la présence de dose élevée d'azote minéral dans le sol(96,98,106)
- l'utilisation d'inoculum contenant des quantités trop faibles de bactéries viables (15_95_123_).
- l'utilisation de substances toxiques pour Rhizobium : pesticides, engrais, composant d'enrobage ou de certaines tourbes (95_79_).
- les antagonismes microbiens et les phénomènes de compétition dans le sol (60_157_168).
- l'action des rhizobiophages (90.166).
- les conditions physiques du sol telles que l'acidité (118), les températures élevées (65_125_169.).

Tous ces facteurs pouvant affecter la survie et la multiplication de Rhizobium, la nodulation et la fixation de l'azote de la symbiose Rhizobium - légumineuse ont été remarquablement analysés par RAKOTOARISOA (118), tout récemment.

Outre les qualités nécessaires que doit avoir la plante-hôte pour cette fixation symbiotique,et qui ne sont pas de notre spécialité, la sélection préalable de souches de Rhizobium particulièrement bien adaptées à cette plante- hôte est absolument nécessaire. En plus des caractères dus à la sélection,la souche doit donc être résistante aux facteurs chimiques (acidité, substances toxiques,produits fongicides et herbicides),aux facteurs physiques (température élevée,dessiccation) ou biologiques (phages) existantes dans le sol à cultiver.

Elle doit être infective, efficiente, stable du point de vue génétique, avoir une compétitivité supérieure à celle des Rhizobium autochtones et enfin persister dans le sol.

La préparation et l'application des inoculums pour la "bactérisation" des légumineuses doit contribuer largement à la réunion de ces exigences.

II PREPARATION ET CONSERVATION DES INOCULUMS POUR LEGUMINEUSES.

La qualité d'un inoculum dépend du nombre de bactéries viables qu'il contient, du maintien de la spécificité et de l'efficience de ces bactéries, mais aussi de sa facilité de transport, de conservation et d'utilisation.

I) Les cultures de Rhizobium pour inoculum.

Les Rhizobium pour inoculation sont le plus souvent obtenus par culture immergée en milieux riches à base d'extrait de levure (66 - 162). Des milieux empiriques utilisant des sous produits industriels ont été décrits et utilisés avec plus ou moins de succés (17.19.55.). Dans tous les cas le milieu bon marché doit être capable de produire un nombre élevé de cellules viables en parfait état physiologique (131). La durée de la culture doit être aussi courte que possible, si ce n'est que pour réduire les risques de contamination .

Des quantités élevées de cellules viables peuvent certes être obtenues en modifiant l'origine ou la concentration de l'extrait de levure utilisé, mais les résultats sont variables suivant les souches.

De plus il faut prendre des précautions pour éviter les inhibitions de croissance et les altérations cellulaires imputables à certains extraits de levure(32,135,138) ou à des teneurs élevées en certains acides aminés (142-143).

La plupart du temps ces cultures sont réalisées en fermenteur de capacité adaptée aux besoins. Les paramètres de culture (inoculation ,aération, température et durée d'incubation etc...) doivent être parfaitement étudiés et maîtrisés. Dans ces conditions l'utilisation d'un milieu de culture synthétique est certainement souhaitable.

2) Les inoculums liquides.

Ils sont formés par le milieu de culture contenant les Rhizobium en phase stationnaire de croissance,ou d'une suspension réalisée à partir d'une culture de bactéries obtenue par ailleurs sur milieu solide. Deux méthodes d'application peuvent être utilisées.Immédiatement avant le semis les graines sont arrosées de cette suspension,soigneusement mélangées et ressuyées à l'ombre jusqu'à ce qu'elles n'adhèrent plus les unes aux autres,permettant ainsi un semis régulier. Les bactéries en milieu liquide(eau, lait écrémé, maltose à 9%) peuvent aussi être mélangées avec de la terre,ou du foin de légumineuses finement broyé (24) qui est ensuite répandu sur les champs. Cette méthode est de nos jours abandonnée.

Ce type d'inoculum donne de bons résultats en régions tempérées (155), il a été utilisé largement dans les polders d'Ijsselmeer en Hollande (24) où il existe une collaboration très étroite entre les utilisateurs et le producteur. Il est par contre difficilement utilisable là où les conditions écologiques sont plus sévères,notamment dans les régions équatoriales (12_16_39).

Dans ce cas d'inoculation sous forme liquide , les bactéries directement en contact avec les graines, sont très sensibles à certains fongicides et insecticides (16_24)utilisés dans le traitement de ces graines.

Enfin ce procédé est peu pratique. Le flacon de culture expédié à l'agriculteur doit être fermé hermétiquement, et dans ces conditions les Rhizobium meurent rapidement. De plus les flacons sont fragiles,difficiles à transporter et surtout à manipuler.

3) Les inoculums sur supports solides.

C'est certainement la forme d'inoculum la plus couramment rencontrée. Parmi les très nombreux supports utilisés les plus importants sont à base de tourbe (16_126_127). Divers auteurs ont essayé d'ajouter à celle-ci d'autres additifs tels que farine végétale, terre (156), craie (16), charbon (110), foin , fumier (116), boue de filtration (114) etc....

Ces supports, toujours riches en matières organiques, contenant les Rhizobium peuvent être remis en suspension dans l'eau et utilisés comme inoculums liquides. Ils peuvent aussi être répandus mécaniquement, le plus souvent au moment du semis, avec ou à côté des graines .

Ces supports ont certes de nombreux avantages. Ils permettent souvent une multiplication des bactéries avant l'inoculation et les protègent sur les graines et dans le sol (26 _126). Ils présentent néanmoins d'importants défauts inhérents aux propriétés de la tourbe. Les difficultés qu'ils engendrent au niveau de la fabrication, du transport et de la conservation ne sont pas négligeables.

a) les propriétés de la tourbe.

La tourbe a des propriétés physiques et chimiques très variables d'un gisement à l'autre (144), et même au sein d'un même gisement (130). Ce manque d'uniformité nuit évidemment à la fiabilité de l'inoculum final. Certaines tourbes peuvent inhiber totalement la croissance de Rhizobium , d'autres contiennent même des substances néfastes à la survie des bactéries (139_158) . Le choix de la tourbe est donc essentiel. Il faut aussi signaler qu'elle n'est pas disponible dans toutes les régions du monde, et il est alors difficile de généraliser son emploi.

b) la préparation du support.

Les différents constituants du support doivent être séchés, broyés et mélangés. La tourbe généralement très acide doit être neutralisée ($CaCO_3$). Il est souvent nécessaire de stériliser soigneusement le support avant ensemencement. Parmi les méthodes utilisées on peut citer: l'autoclavage à I20°C pendant 4 heures, l'irradiation gamma (5 à IO.IO^6 rads). Cette dernière méthode est certainement la méthode de choix, mais son coût reste toujours très élevé.

c) l'ensemencement du support.

Le milieu de culture contenant au moins IO^9 b/ml peut-être tout simplement mélangé au support non stérile ou mieux injecté aseptiquement à chaque dose de support stérilisée au préalable. Dans les deux cas il est nécessaire de favoriser le développement du Rhizobium dans le support par un séjour de I à 2 semaines à 26 - 28°C . On notera déjà ici l'importance qu'il faut donner au choix du conditionnement pour toutes ces préparations délicates, mais aussi au taux d' humidité (60%) pour le développement, la conservation et le transport (127) .

d) La conservation et le transport.

Les inoculums solides conservés en sachets de polypropylène (144) sont certainement les plus utilisés de nos jours.

Parmi les facteurs pouvant avoir une influence importante sur la survie du Rhizobium on peut citer le maintien de l'humidité (156), l'aération et la température (127) . Malgré la conservation à + 4°C presque toujours indispensable, la durée d'utilisation d'un tel inoculum est très souvent limitée (6 à I8mois).

Ce type d'inoculum est souvent encombrant et peu pratique à transporter, surtout à grande distance et dans les régions aux conditions climatiques sévères.

4) Les autres formes d'inoculums.

Récemment un inoculum constitué de Rhizobium fixé dans un gel de polyacrylamide semble pouvoir donner des résultats de laboratoire intéressants (41) . Pour cela ce type d'inoculum doit encore être conservé dans des conditions d'hydratation importante.

La déshydratation de Rhizobium par lyophilisation est un procédé couramment utilisé pour la conservation des souches de collection (16), les propriétés symbiotiques de ces bactéries n'étant pas altérées (122). La production d'inoculum lyophilisé, déjà suggéré en I960 par BONNIER (12), n'en est pas encore au stade industriel car elle se heurte à deux problèmes essentiels : un très faible pourcentage de survie des bactéries traitées (16) et une mort rapide des bactéries dans le sol par manque de protection (31,161). De plus c'est un procédé onéreux.

La dessiccation des Rhizobium , par un procédé industriel peu coûteux ,pourrait,pensons nous,résoudre les problèmes liés aux inoculums liquides et sur support . En effet, à condition de conserver les caractères essentiels des bactéries la dessiccation présente divers avantages tant au niveau de la fabrication , les conditions de culture pouvant être standardisées, qu'au niveau du stockage et du transport, les doses pouvant être conditionnés en petits flacons permettant un stockage aisé,et l'encombrement minimum de ces doses réduisant de façon appréciable les frais de transport. Par ailleurs cette présentation , après conservation et remise en suspension dans l'eau, rend possible non seulement la fabrication des divers types d'inoculum mais aussi l'application par les divers moyens habituellement utilisés.

III PRINCIPALES METHODES D'APPLICATIONS DES INOCULUMS

Elles peuvent être directes ou indirectes :

I°) L'application directe ,ou pré-inoculation des graines :

Dans ce cas l'inoculum est appliqué sur la graine avant le semis. Trois méthodes peuvent être utilisées :

a) l'imprégnation à sec : l'inoculum sec ou sur support est mélangé avec les graines. C'est le plus simple des procédés mais aussi le moins efficace .

b) l'imprégnation humide : elle peut-être pratiquée à partir d'un inoculum liquide ou après suspension dans l'eau d'un inoculum sec ou d'un inoculum -tourbe. Il est possible d'ajouter à ce moment des agents adhérents tels que la gomme arabique ou des composés cellulosiques. Cette méthode est souvent dénommée pralinage.

c) l'enrobage des graines : est une méthode très utilisée. Elle consiste à fixer les bactéries sur la graine. Ces bactéries peuvent provenir d'un inoculum liquide, sec ou sur support. Ce procédé protège assez bien les Rhizobium des conditions physiques et chimiques défavorables du sol et des graines, mais aussi vis-à-vis des bactéries en compétition et des prédateurs. C'est ainsi que l'utilisation de carbonate de calcium sous différentes formes, et de charbon peut protéger les bactéries de l'acidité de certains sols(110) .

2°) L'application indirecte :

Les graines sont semées non inoculées et l'inoculum est appliqué sur le sol indépendamment. Cette technique est nécessairement employée pour les graines de légumineuses qui perdent leurs téguments quand les cotylédons émergent du sol . (ex. soja), mais aussi dans le cas où un traitement des graines par fongicides ou insecticides est indispensable. Ce mode d'application permet aussi une bactérisation importante quand la compétition avec les Rhizobium autochtones est sévère.

Ce procédé peu utilisé, peut-être effectué par arrosage avec une suspension préparée extemporanément à partir d'inoculum liquide, solide ou sur support, ou par dépôt d'un inoculum solide, devant ou derrière la graine, pendant le semis. Ce mode d'application, déjà envisagé par BONNIER en 1960 (12) s'adapte bien aux inoculums déshydratés ou à ceux qui sont préparés par granulation à partir d'inoculum - tourbe (24.47)

xxxxxxxxxxxxxxxxx

Après étude des avantages théoriques de l'inoculation, des principales méthodes de préparation des inoculums, et de leurs modes d'application, nous nous sommes tout d'abord demandés si l'utilisation de milieux empiriques était vraiment indispensable pour la production de Rhizobium. Les inconvénients nombreux des procédés les plus utilisés, l'inoculum -tourbe et l'enrobage des graines, nous ont amené à penser que l'inoculum déshydraté , capable de maintenir pendant une durée suffisamment longue une quantité importante de bactéries en bon état physiologique , serait l'idéal . En effet il peut-être d'un prix de revient relativement peu élevé et sa présentation en petit flacon peut-être commode et permettre une large utilisation, aussi bien dans nos régions que dans les pays en voie de développement.

B U T S D U T R A V A I L .

Nos travaux personnels nous ont amené :

I°) A étudier et à mettre au point la production en quantité de cellules de Rhizobium dans un état physiologique satisfaisant, et ceci d'une manière peu onéreuse : l'étude des cultures sur les principaux milieux pour Rhizobium nous a permis de définir un milieu synthétique idéal utilisable en fermenteur de laboratoire pour la production en masse de Rhizobium meliloti.

2°) A étudier et à mettre au point des techniques de déshydratation et de conservation de ces bactéries en vue de la préparation d'un inoculum sec pour la culture de la luzerne (Medicago sativa).

3°) A réaliser, par des procédés adaptés, la sélection d'une souche " anhydro-résistante " présentant un taux de survie qui améliore encore la qualité de notre inoculum.

Chapitre II

MATERIEL

ET

METHODES

GENERALES

I MATERIEL BACTERIEN ET VEGETAL .

1 . RHIZOBIUM A CROISSANCE RAPIDE.

Souches N°	Appellation d'origine.	Origine.	Isolement.
MI-5	Rhizobium meliloti	F.S.A.G.	Medicago sativa BELGIQUE 68
$MI-5^{Str}$	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Mutant de MI-5
M5S	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa
M5NI	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa
M9S	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa
$M_9Sm_I^{Str}$	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa Lille I980
MIIS	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa Lille I972
MI2S	Rhizobium meliloti	R.I.O.	Medicago sativa I962
ArI6	Rhizobium meliloti	S.R.M.S.	
MI7	Rhizobium meliloti	R.I.O.	Medicago sativa I963
M20S	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Medicago sativa
TU20	Rhizobium meliloti	S.R.M.S.	
VE26	Rhizobium meliloti	S.R.M.S.	
44	Rhizobium meliloti	C.I.A.T.	Medicago sativa AUSTRALIE I969
45	Rhizobium meliloti	C.S.I.R.O.	Medicago sativa URUGUAY I963
SU47	Rhizobium meliloti	C.S.I.R.O.	Medicago sativa AUSTRALIE I939
AI45	Rhizobium meliloti	R.I.J.P.K.	

Souches N°.	Appellation d'origine.	Origine.	Isolement
AI6I	Rhizobium meliloti	R.I.J.P.K.	
444	Rhizobium meliloti		Non connu
WU498	Rhizobium meliloti	U.W.A.	Medicago truncatula W.AUSTRALIA I965
WU499	Rhizobium meliloti	U.W.A.	Medicago truncatula
200I	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Medicago sativa
2003	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Non connu
2004	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Non connu
20IID	Rhizobium meliloti		Non connu
20IIR	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Non connu
20IIS	Rhizobium meliloti		
20IIStr3	Rhizobium meliloti	U.S.T.Lille	Mutant de 20II
FMI	Rhizobium meliloti		
LII	Rhizobium leguminosarum	U.S.T. Lille	Pisum sativum Lille I972
L2S	Rhizobium leguminosarum 3HOaI8/C/R/B.	C.R.B.	Pisum sativum BELGIQUE Rochelle ILL I933
L26	Rhizobium leguminosarum IOOI R.C.R.	R.C.R.	Viscia hirsuta I972
PI5	Rhizobium phaseoli 3622 R.C.R.	R.C.R.	Non connu
PI6	Rhizobium phaseoli 36IO R.C.R.	R.C.R.	Non connu
P94	Rhizobium phaseoli	R.I.O.	Phaseolus acutifolus Yuma,Ariz. I948

Souches	Appellation d'origine	Origine	Isolement
P95	Rhizobium phaseoli	R.I.O	Phaseolus vulgaris
CC365	Rhizobium phaseoli	C.S.I.R.O.	Phaseolus vulgaris
CC5II	Rhizobium phaseoli	C.S.I.R.O.	Phaseolus vulgaris
TI	Rhizobium trifolii	R.I.O.	Trifolium sp I962
TAI	Rhizobium trifolii	C.S.I.R.O.	Trifolium Substerraneum,Bridfort Tasmania AUSTRALIE I968
T3	Rhizobium trifolii	R.C.R.	Trifolium repens AMBLESIDE ENGLAND I942
T5	Rhizobium trifolii	R.C.R.	Trifolium repens BLADFORD DORSET ENGLAND I94I
TI4	Rhizobium trifolii	U.S.T.	Trifolium pratense Lille I969
CC2480a	Rhizobium trifolii	C.S.I.R.O.	Trifolium subterraneum yanninicum GREECE I965

2 . RHIZOBIUM A CROISSANCE LENTE.

J5	Rhizobium japonicum 3-I7	F.S.A.G.	Soja I956
J6	Rhizobium japonicum 3-24	C.S.I.R.O.	Non connu
J67	Rhizobium japonicum	R.I.O.	Glycine hispida JAPON I929
J68	Rhizobium japonicum	R.I.O.	Glycine hispida YOUGOSLAVIE I955
CC709	Rhizobium japonicum	C.S.I.R.O.	Glycine max
CBI809	Rhizobium japonicum	C.S.I.R.O.	Glycine max I968

Souches	Appellation d'origine	Origine	Isolement
K65	Rhizobium lupini	U.S.D.A.	Lupinus angustifolius GEORGIA I946
KI07	Rhizobium lupini	R.I.O.	Lupinus albus GAINSVILLE I940
KI2I	Rhizobium lupini	R.I.O.	Lupinus luteus BRESIL I959
V6	Rhizobium spp cowpea -group	U.S.T. Lille	Arachis SENEGAL I974
VI22	Rhizobium spp	R.I.O.	Vigna sinensis I920
I35	Rhizobium spp	R.I.O.	Pueraria thumbergiana ROCK HILL I939
300I	Rhizobium spp	R.C.R.	Anthylus vulneraria BEDFORT ENGLAND I95I
3002	Rhizobium spp	R.C.R.	Lotus corniculatus BEDFORT ENGLAND I95I
CB756	Rhizobium spp	C.S.I.R.O.	Non connu

ORIGINES :

C.I.A.T. Centre International Agricultura tropical COLOMBIA

C.S.I.R.A. COMMONWEALTH Scientific and Industrial Research Organisation CANBERRA,AUSTRALIA

F.S.A.G. Faculté des Sciences Agronomiques de GEMBLOUX 5800 GEMBLOUX , BELGIQUE

R.C.R. RHOTHAMSTED Collection of RHIBOZIUM (HARPENDEN HERTFORDSHIRE) G.B.

R.I.O. Research Institute ONTARIO , CANADA

U.S.D.A. United States Department of Agriculture BELTVILLE,MARYLAND U.S.A.

U.S.T. - Université des Sciences et Techniques,Laboratoire de Microbiologie , LILLE

U.W.A. The University of WESTERN AUSTRALIA (NEDLANDS,AUSTRALIA)

R.I.J.P.K. Rijksdienst voor de Ijsselmeerpolders , KAMPEN.THE NETHERLANDS

S.R.M.S. Station de recherche de Microbiologie des sols.DIJON,FRANCE

3. SOUCHE DE R. MELILOTI ACIDO-TOLERANTE $M_9Sm_1^{Str}$

RAKOTOARISOA 1980 (118) a isolé de la souche de R. meliloti M_9S un premier mutant spontané capable de se développer convenablement à pH 5,5. A partir de celui-ci, par mutagénèses, des mutants de seconde génération ont été obtenus, dont $M_9Sm_1^{Str}$. Cette souche est la plus acido-tolérante que l'on a obtenue au cours des mutagénèses successives. Elle a été ensuite rendue résistante à 400 µg/ml de streptomycine afin de pouvoir la repérer lors de son utilisation sur le terrain.

Cette souche est capable de se développer et d'infecter la luzerne dans les sols acides.

4. ENTRETIEN ET CONSERVATION DES SOUCHES DE RHIZOBIUM.

Selon la méthode préconiséepar QUADLING 1960 (117) toutes les souches bactériennes utilisées sont maintenues à - 20°C en milieu R.C. fructosé à 1% additionné de 50% de glycérol.

A partir de ces cultures congelées, des repiquages sont effectués sur le même milieu solide en tubes inclinés. Ils sont maintenus à + 4°C au réfrigérateur et utilisés pour les expériences.

Il est aussi possible de maintenir les souches bactériennes en suspension dans la gélose pure à 7,5g / litre (gélose blanche), en petits tubes bien fermés, ou en ampoules scellées au réfrigérateur. Ce moyen peut permettre une conservation de deux années.

Les souches les plus importantes pour nos travaux, comme les souches obtenues par sélection ou mutation (ex. $M_9Sm_1^{Str}$), sont gardées lyophilisées en ampoules scellées sous vide.

5. LEGUMINEUSES.

Des essais préliminaires ont été effectués sur des variétés de graines de luzerne (Medicago sativa) . La variété "Magali" a été retenue pour son taux de germination et son appareil racinaire bien développé.

II MILIEUX DE CULTURE ET TAMPON.

1. MILIEUX EMPIRIQUES POUR RHIZOBIUM.

Parmi les nombreux milieux de culture empiriques (ou complets) décrits par divers auteurs pour la culture des bactéries du genre Rhizobium nous avons surtout retenu ceux utilisés par :

1. FRED, BALDWIN et Mc COY (48), en 1932 : milieu Y.E.M. (Yeast Extract Medium) pour Rhizobium.
2. LAIRD (73), en 1932, modifié par DELATTRE (34), en 1971 : milieu R.C. (Rhizobium complet) pour Rhizobium.
3. KEELE (71), en 1969, milieu K. pour R. japonicum.
4. ISWARAN (66), en 1973, milieu I. pour R. japonicum.
5. BERINGER (10), en 1974, milieu T.Y. (Tryptone Yeast pour R. leguminosarum .
6. ARIAS (3), en 1976, milieu A. pour R. japonicum et R. trifolii.
7. UCKER et SIGNER (152), en 1978, milieu L.B. (LURIA Broth (80) , pour R. meliloti.

Les compositions en g par litre de ces milieux sont décrites ci après. Nous avons résumé dans le tableau I les formules de ceux qui ont été utilisés dans notre travail.
Tous ces milieux complets contiennent de l'extrait de levure sous forme sèche (Yeast Extract Difco).
Nous n'avons pas employé le milieu de WRIGHT recommandé par de nombreux auteurs tels que BALDWIN et FRED (4), NORRIS(104), BONNIER et BRAKEL (16),COURTOIS(29) etc. car,la reproductibilité de la qualité de l'extrait de levure fraîche est difficile à obtenir.
De même nous n'avons pas retenu le milieu de BERGENSEN (7), son taux élevé (3g. par litre) de carbonate de calcium le rend hétérogène et d'utilisation délicate pour nos comparaisons.
Nous avons utilisé essentiellement le mannitol,le glucose, et le fructose ou lévulose comme source de carbone et d'énergie. Ils sont toujours ajoutés en solutions stériles,au moment de l'emploi,au reste du milieu stérile. Les milieux T.Y. et L.B. ne contiennent pas de source hydrocarbonée autre que celle contenue dans l'extrait de levure .
Le pH. final de tous ces milieux est vérifié et ajusté à 7,0 $\pm$ 0,2 , à la température de 25°C.

COMPOSANT	CONCENTRATION FINALE EN GRAMMES PAR LITRE D'EAU DISTILLEE								
	I Y.E.M.	2 R.C.	3 K.	4 I.	5 T.Y.	6 A.	7 L.B.	8 W.	9 B.
KH_2PO_4			I			I			
K_2HPO_4	O,5	I	I	O,5		I		O,5	O,5
NH_4NO_3									
NH_4Cl			O,5			O,5			
$MgSO_4,7H_2O$	O,I	O,2	O,I8	O,2		O,I8		O,2	O,2
$FeCl_3,6H_2O$	O,OI		O,OO4	O,OI		O,OO4			O,OI
$CaCl_2,2H_2O$	O,I3		O,I3		O,88	O,I3			
$CaSO_4,2H_2O$								O,I	O,I
$CaCO_3$								O,I	3
NaCl	O,2		O,2	O,I		O,2	5	O,2	O,2
Tryptone (Difco)					5		IO		
Extrait de Levure (Difco)	I	I	I	2	3	3	5	IOOml. frais	I
Gluconate de potassium				I,5					
Mannitol	IO	IO	IO	IO		IO		IO	IO

TABLEAU I . Composition de milieux empiriques pour *Rhizobium*.

2. MILIEUX SYNTHETIQUES POUR RHIZOBIUM

Parmi les nombreux milieux de culture synthétiques décrits, par divers auteurs pour la culture des différentes espèces de Rhizobium nous avons surtout retenu ceux utilisés par:

I. FERRY P. , BLACHERE H. et OBATON M.(46) en I959, milieu F.B.O. pour la culture de R.meliloti.

2. RIGAUD J. (122) en I965, milieu RI. pour la croissance d'une souche de R. meliloti.

3. SHERWOOD M.T. (134) en I970, milieu S.Y. pour la croissance de Rhizobium . Ce milieu dérive du milieu synthétique décrit par BERGERSEN (7) en I96I,et utilisé avec quelques modifications,par BERINGER (9_10) en I973 pour des études génétiques de R. leguminosarum.

4. DELATTRE J.M. (34) en I97I, milieu R.H.B_I ou R pour des études de physiologie de Rhizobium.

5. MILLER J.H. (89) en I972 mais aussi UCKER D.S. et SIGNER E.R. en I978 : milieu M_9A pour des études génétiques de R. meliloti.

6. NEIDHARDT F.C. (9 9) en I974, milieu M.O.P.S. (Morpholino propane sulfonate) pour des études physiologiques sur les Entérobactéries.

7. PEDROSA F.O. (1 1 2) en I974, milieu P. pour des études sur le métabolisme de R. japonicum .

Leurs compositions respectives en grammes par litre d'eau distillée, sont décrites ci-après et résumées dans le tableau II

Nous n'avons pas utilisé le milieu synthétique originel de VINCENT (1 5 9), ni celui très coûteux décrit par DUDMAN W.F. (4 3) pour la production de polysaccharide extracellulaire par R. meliloti en phase de croissance.

Dans nos travaux comparatifs l'ose et les vitamines sont ajoutés en solutions stériles au moment de l'emploi. Le pH final de tous ces milieux est ajusté à 7,0, à la température de 25°C.

CONCENTRATION FINALE EN GRAMMES PAR LITRE									
MILIEU / COMPOSANT	F.B.O. I	RI. 2	SY. 3	R 4	M_9A 5	M.O.P.S 6	P. 7	B. 8	D. 9
KH_2PO_4	2,27				3				
K_2HPO_4		0,5	0,22	0,5		0,23	0,22		0,5
K_2SO_4						0,043			
$NaHPO_4$, $12H_2O$	II,94				5,8			0,45	
NH_4Cl					I	0,5			
(NH_4) SO_4	6,6								
NH_4 NO_3				0,5					
KNO_3							0,3		
$MgSO_4,7H_2O$	0,I97	0,2	0,I	0,2	0,I2		0,I	0,I	0,2
$MgCl_2$						0,5		0,020	
$FeCl_3,6H_{20}$			0,02				0,0005		0,02
$FeSO_4,7H_2O$	0,078					0,00I5			
$CaCl,6H_2O$	0,022		0,040		0,0I0	$0,5.10^{-4}$	0,02	0,04	0,05
$CaSO_4,2H_2O$		0,I							
$CaCO_3$		0,I							
NaCl		0,2			0,5	3			0,5
M.O.P.S.						8,37			
TRICINE						0,7I			
OLIGO-ELEMENTS						+ (*)			+ (*)
BIOTINE	$I,2-10^{-5}$	5.10^{-7}	5.10^{-7}	10^{-5}	3.10^{-3}		5.10^{-7}	2.10^{-4}	$2,5.10^{-4}$
THIAMINE HCL		7.10^{-5}	10^{-4}	5.10^{-4}			10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
MANNITOL		10	10	10	2	10	10	10	10
GLUCOSE	(I8)								
Na GLUTAMATE		0,96	I,I					I,I	
AC. GLUTAMIQUE							0,5		

TABLEAU II : COMPOSITION DE MILIEUX SYNTHETIQUES POUR RHIZOBIUM.

(*) Oligo-éléments : $(NH_4)_6$ Mo_7O_{24} : 3.10mM ; H_3BO_3 : 4.10^{-4}mM ; $CoCl_2$: 3.10^{-5}mM ; $CuSO_4$: 10^{-5}mM ; $MnCl_2$: 8.10^{-5} ; $ZnSO_4$: 10^{-5}mM.

3. TAMPON DE NON PROLIFERATION POUR RHIZOBIUM.

Nous avons utilisé un tampon de non prolifération (T.N.P.) pour laver et mettre en suspension les cellules bactériennes.

Ce tampon est en fait le milieu R. ne contenant ni source carbonée, ni source azotée.

Sa formule par litre d'eau distillée est la suivante :

$K_2H\ PO_4$.....I,0 g

$MgSO_4,7H_2O$ .....0,2 g

pH final à 25°C.....7,2

Pour éviter une éventuelle formation de précipité de phosphate de magnésium durant la stérilisation, les deux solutions sont préparées séparément, autoclavées 20 minutes à I20°C et mélangées à part égale au moment de l'utilisation.

4. MILIEUX DE CULTURE POUR PLANTULES DE LUZERNE.

Milieu de NICOL et THORNTON (101)

K_2HPO_4.....0,5 g

$MgSO_4$,$7H_2O$.....0,2 g

NaCl .....0,I g

$FePO_4$.....I,0 g

$Ca_3\ (PO_4)_2$.....2,0 g

$FeCl_3$.....I ml. d'une solution concentrée à I0g/l

Eau de conduite .... q.s.p. I litre

Le pH est ajusté à la valeur voulue par une solution de H_3PO_4 (acide orthophosphorique) ou de K OH (potasse)

Le milieu est réparti en tubes de 20 x 200 mm à raison de I2 ml par tube, dans lequel on introduit une languette de papier WHATMAN N°3.

La stérilisation se fait à I20°C pendant 20 minutes.

III PROCEDES DE CULTURE DES BACTERIES

Nos études de croissance des différentes souches sur les milieux retenus ont été, dans un premier temps, réalisées en tubes et en flacons agités. Puis nous avons eu la possibilité de pouvoir utiliser un biophotomètre original pour confirmer et préciser nos premiers résultats. Les essais de production de cellules ont ensuite été entrepris en fermenteurs de laboratoire.

I. CULTURES EN TUBES .

Elles ont toutes été réalisées au moins deux fois, dans des tubes de 20x220 mm contenant chacun IOml. de milieu à expérimenter. Chaque tube est inoculé par O,I ml d'une suspension en tampon TNP contenant IO^9 bactéries lavées par ml . Ces bactéries proviennent d'une culture en phase stationnaire effectuée sur milieu R.C. fructosé à I% . A une densité optique de O,8 à 600 nm les cellules sont centrifugées à I6.300 g lavées dans le tampon TNP, centrifugées à nouveau et reprises dans 5 ml de tampon TNP. Les milieux ensemencés contiennent donc au départ environ IO^7 bactéries par ml.

Les cultures sont maintenues à 30°C,en agitation rotative continue. L'utilisation de la table d'agitation A.S. 850 de la Société BIOLAFFITE , (IOO rotations par min, excentrique de 25 mm) permet d'obtenir une aération convenable du milieu.

La croissance est contrôlée par des mesures régulières de l'absorbance à 600 nm,mais aussi par l'évolution du pH,et dans certains cas,par l'appréciation du nombre de cellules revivifiables.

2. CULTURES EN FLACONS.

La grande majorité des cultures ont aussi été réalisées en flacons de 500ml (type transfusion sanguine), toujours en double exemplaire . Ces flacons, ne contenant que IOOml. de milieu sont ensemencés avec Iml de suspension bactérienne préparée comme décrit ci-dessus.

Les flacons ainsi inoculés,bouchés eux aussi par une bourre de coton cardé stérile,sont mis à incuber à 30°C, sur agitateur rotatif identique à celui utilisé pour les cultures en tubes.

Un prélèvement de 5ml est effectué régulièrement pour apprécier d'une part l'absorbance à 600 nm et le nombre de cellules viables,et suivre d'autre part l'évolution du pH.

3. CULTURES SUIVIES AU BIOPHOTOMETRE.

Certaines cultures comparatives ont pu être réalisées et suivies au moyen d'un nouveau biophotomètre qui a été mis au point récemment par MARAIS (84) au centre de Technologie Biomédicale de l'I.N.S.E.R.M. de Lille (Directeur : Y. MOSCHETTO).

Les caractéristiques essentielles et les conditions expérimentales de cet appareil sont les suivantes :

- cellules de culture : I6 tubes standards alignés, de I8 x 200mm pouvant contenir IO ml de milieu, permettent de suivre simultanément, sans autre manipulation que l'ensemencement ,I6 croissances dans des conditions bien définies.

- dispositif d'agitation : par vortex continu dont la vitesse est réglable de quelques tours à plus de 3.000 tours /minute. Lors de chaque lecture l'agitation du tube est arrêtée, puis celui-ci reprend aussitôt sa position et son agitation initiales. Pour nos cultures nous avons maintenu une vitesse constante de 750 t/min

- dispositif de régulation de la température d'incubation :
  + 4°C à 45°C, par enceinte chauffée par une jaquette d'eau. La précision atteinte au niveau du milieu est de ± 0,5°C Nos cultures ont été réalisées à 30°C.

- dispositif automatique de mesure de l'absorbance :
  par turbidimétrie, au moyen d'une diode électroluminescente émettant à 693 nm et d'une photodiode réceptrice. Ce couple est fixé sur un chariot, qui se déplace devant les I6 cuves. L'intervalle de temps séparant les séries de mesures est réglable de I à 99minutes. De façon à éviter toute dérive, le 0% et le I00% de transmission sont effectués automatiquement avant chaque mesure. La précision de la mesure obtenue peut-être inférieure à I pour mille .
  Toutes les mesures sont imprimées et peuvent être traitées à la sortie. Dans nos essais elles ont été effectuées automatiquement toutes les 20minutes.

L'inoculation des milieux est pratiquée de façon tout à fait identique à celle des autres cultures en tubes.
C'est ainsi que nous avons pu comparer simultanément la croissance d'une souche sur 7 milieux et apprécier les performances d'un milieu vis-à-vis de 7 souches différentes, toutes les cultures ayant été toujours effectuées en deux exemplaires.

4. CULTURES EN FERMENTEUR DE LABORATOIRE.

4. 1 - Fermenteur utilisé.

La plupart de nos travaux de mise au point de production de cellules de Rhizobium ont été pratiqués en fermenteurs NEW-BRUNSWICK-modèle I9 dont les caractéristiques essentielles sont :

- cuve en verre de capacité utile I2 litres.
- agitation magnétique, 0 à 8 00 t/min
- aération par injection d'air comprimé, pression=I,05 Kgf/cm^2 débit = 0 à I6 l/min
- régulation de la température par circulation d'eau, réglable de 20 à 70°C.
- contrôle des mousses par turbine casse-mousse et d'addition d'agent antimousse à base de silicone.
- contrôle et régulation de pH par électrode et dispositif d'injection de solution acide (H_3PO_4.3N) ou basique (KOH.3N)
- dispositif de mesure de la concentration en oxygène dissous au moyen d'une sonde.
- dispositif d'ensemencement et de prélèvement par une dérivation entraînée par pompe péristaltique.

4. 2 - Conduite de la fermentation .

a) préparation

I0 litres de milieu sans source de carbone, ni vitamines, sont préparés; 9 litres sont introduits dans la cuve du fermenteur munie de tous ses accessoires, 0,9 l dans une fiole d'inoculation de 2 litres.

La stérilisation est assurée par autoclavage à I2I°C pendant 60 minutes. Les solutions concentrées de sucre et de vitamines, préparées et stérilisées séparément, sont introduites en quantité suffisante dans la fiole puis dans le fermenteur, juste avant l'inoculation.

b) préculture

Pour la production de biomasse chaque fiole est inoculée avec le contenu d'un tube (IOml.) de souche conservée à -20°C. en milieu R.C. fructosé à I% et glycérolé à 50%, ou avec IOml. de suspension de cellules lavées 2 fois et reprises en tampon TNP quand il s'agit d'études physiologiques . Les fioles sont mises en agitation à 30°C pendant 24 à 48 heures pour les souches de Rhizobium à croissance rapide, et 48 à 72 heures pour les souches à croissance lente.

c) inoculation du fermenteur

Le milieu préchauffé à 30°C est inoculé aseptiquement avec la préculture qui représente IO% du volume total de milieu. Le nombre de bactéries viables au temps t = O est voisin de IO^7 /ml.

On assure la régulation des principaux paramètres: température, agitation, aération et pH.

d) déroulement et surveillance de la fermentation .

IOml de culture sont prélevés aseptiquement, à intervalles de temps réguliers pour :

- l'appréciation de la pureté par examen microscopique .
- la mesure de l'absorbance à 600 nm .
- la vérification du pH.
- la détermination du nombre de cellules viables par ml .
- le poids sec de bactéries produites par ml de milieu.

On arrête la culture juste avant l'apparition de la phase stationnaire. On a effectué aussi,dans certains cas, le dosage du sucre consommé et celui des exopolyosides solubles produits dans le milieu.

IV METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.

Les prélèvements réalisés régulièrement au cours des cultures nous ont permis d'apprécier la croissance bactérienne par différentes méthodes.

I. METHODES PHYSICO - CHIMIQUES.

a) Mesure de l'absorbance ou densité optique (D.O.)

La mesure du flux lumineux transmis au travers d'une culture bactérienne homogène rend très généralement compte de la masse liée au nombre de bactéries en suspension . Cette mesure peut-être influencée par l'absorption propre du milieu nutritif.

L'examen des spectres d'absorption de suspensions de Rhizobium à différentes concentrations dans l'eau et dans les principaux milieux utilisés montre que l'absorption est minimale à la longueur d'onde de 700nm,elle est encore très faible à 600nm (fig.1).

C'est pourquoi nos mesures de densité optique ont été réalisées le plus souvent à 600nm,sous 1cm d'épaisseur au spectrophotomètre JEAN et CONSTANT ,et à 693nm quand nous avons utilisé le biophotomètre I.N.S.E.R.M.

De façon à nous faciliter la tâche nous avons établi des courbes de concordance entre la D.O. et le nombre de bactéries par ml aux différents stades de la croissance,ceci pour les principaux milieux et principales expèces de Rhizobium . (Ex. fig.2)

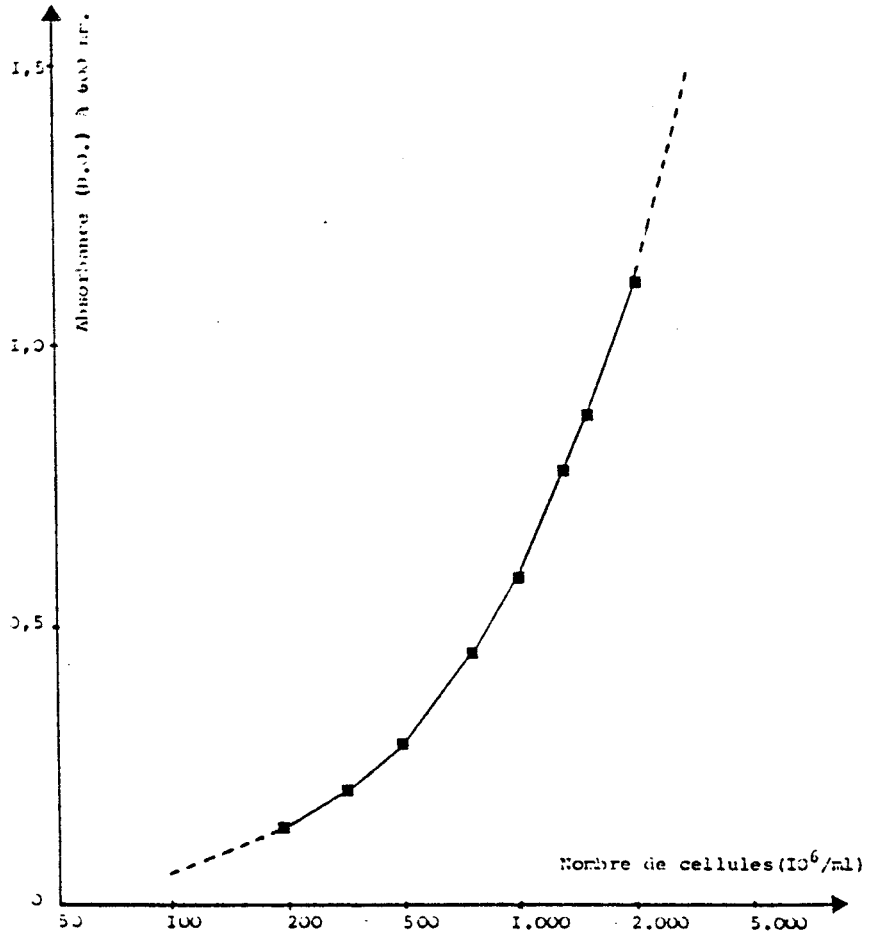


FIG.2 CORRESPONDANCE ENTRE LA DENSITE OPTIQUE ET LE NOMBRE DE CELLULES VIABLES. DANS UNE CULTURE DE R. MELILOTI M I-5 EN MILIEU R.

Les numérations à D.O. < 0,15 et à D.O. > 1,0 doivent être prises en considération avec beaucoup de prudence.

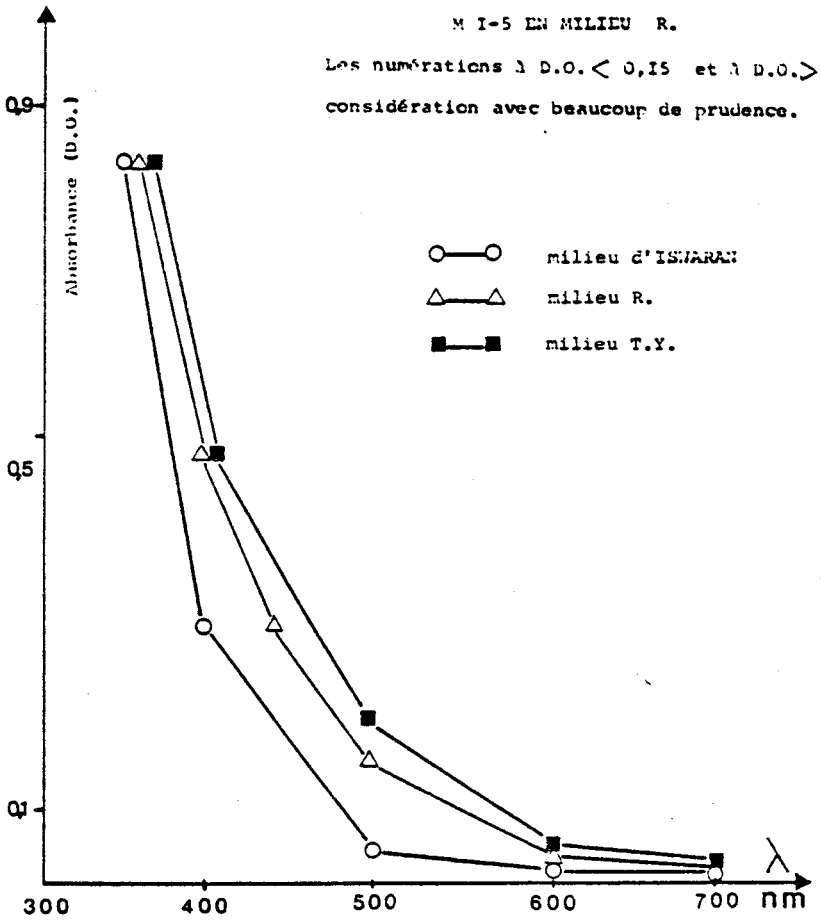


FIG.1 : SPECTRE D'ABSORPTION DE QUELQUES MILIEUX DE CULTURE POUR RHIZOBIUM.

BUS LILLE

b) Mesure du poids sec des bactéries.

Cinq ml du prélèvement homogénéisé, ou d'une dilution sont filtrés sur un filtre de diamètre 45 mm et de porosité 0,45 µm, pesé au préalable (P_1) . Suivant la méthode de HADJIPETROU (5 6) on rince avec IOml d'eau bidistillée, puis la membrane est séchée à l'étuve à IO5°C jusqu'à poids constant . Elle est pesée à nouveau (P_2). $P_2 - P_1$ représente le poids sec des bactéries contenus dans les 5 ml .

c) Dosage des exopolyosides formés et du sucre consommé .

De façon à obtenir rapidement des résultats pour des séries de mesure parfois importantes, nous avons dû nous servir d'un procédé d'évaluation plutôt que d'une méthode de dosage très rigoureuse .

Nous avons appliqué la méthode au phénol sulfurique pour les deux dosages. Vingt ml de culture sont centrifugés à I6.300 g pendant 30 minutes. Le surnageant est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant final est traité par 5 volumes d'éthanol glacé, additionné d'acétate de sodium. La précipitation des exopolyosides dure I2 heures à + 4°C. On obtient alors deux phases. La phase inférieure solide, formée par les polyosides précipités et la phase supérieure liquide qui contient entr'autre le sucre en solution .

Le précipité est repris par 20 ml d'eau bidistillée. A Iml de cette solution on ajoute I ml d'eau phénolée à 5% et 5 ml d'acide sulfurique pur. On maintient au bain-marie bouillant 5 min On laisse ensuite à l'obscurité 30 minutes. La gamme étalon, de 0 à 1000 µg/ml, est préparée avec des polyosides purifiés de Rhizobium préparés antérieurement . Le dosage est ensuite réalisé par mesure de l'absorbance à 510 nm .

Pour réaliser le dosage du fructose on utilise la phase supérieure de la précipitation précédente. On réduit le volume au I/5 par évaporation sous vide, puis on rétablit le volume à 20 ml par de l'eau bidistillée . On effectue ensuite le dosage par la même méthode que pour les polyosides. La gamme étalon, de 0 à 400µg/ml est préparée à partir de fructose pur pour analyses (SIGMA).

2 . METHODES MICROBIOLOGIQUES.

a) Dénombrement des cellules viables dans les cultures ou les suspensions.

Dans la majorité des cas la numération des cellules viables dans les prélèvements a été effectuée par culture en milieu R.C. gélosé en utilisant la méthode dite en double couche.

Les dilutions décimales sont réalisées en tampon T.N.P. Des essais préalables avec quelques liquides de suspension-dilution utilisés couramment en microbiologie (Tryptone-sel,eau salée à 0, 85 % ,eau salée cystéinée à 0,I%, liquide de Ringer dilué au I/4) ont montré sa validité pour les Rhizobium.

I ml de chaque dilution est mis dans le fond d'une boîte de PETRI, ceci en double exemplaire. On recouvre alors de I5 à 20ml de milieu RCG fondu et maintenu à 45 - 50°C. On homogénéise parfaitement. Après solidification on recouvre d'une seconde couche de milieu vierge. On laisse à nouveau se solidifier avant d'incuber les boîtes à 30°C . Le comptage des colonies ne s'effectue pas avant 4 ou 5 jours ,ou davantage pour les souches à croissance lente. On calcule la moyenne des deux résultats obtenus.

b) Dénombrement des bactéries infectantes dans un inoculum.

Le simple dénombrement bactérien n'est pas suffisant par lui même pour évaluer la concentration exacte en Rhizobium infectieux dans un inoculum. Le taux de cellules viables et infectantes peut-être déterminé par la méthode de comptage des suspensions - dilutions.

Dix plantules aseptiques sont inoculées chacune, au moment de leur mise en place dans les tubes de milieu de NICOL et THORNTON, par 0,5 ml des dilutions décimales de l'inoculum . On dénombre après un temps convenable le nombre de plantes pourvues de nodules.

V. METHODES D'EVALUATION DE L' INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DE RHIZOBIUM MELILOTI DANS DES CONDITIONS ARTIFICIELLES , AU LABORATOIRE.

Le principal intérêt des Rhizobium réside,non dans les propriétés qui leur sont inhérentes lorsqu'ils sont envisagés seuls, mais dans celles qu'ils manifestent en présence des légumineuses : c'est à dire leur pouvoir de nodulation et celui de fixation d'azote. La première de ces propriétés a reçu le non " d'infectivité," la seconde d'"efficience" ; mais l'une comme l'autre inter-réagissent avec les facteurs propres à l'hôte et ne peuvent recevoir d'interprétation valable sans considération de ces facteurs.

1 Opérations préliminaires .

a) La stérilisation des graines de luzerne.

Elle s'effectue de la manière suivante : une centaine de graines préalablement triées est déposée dans une boîte de PETRI. On ajoute une goutte de détergent (Teepol) et on recouvre les graines de 8 ml de chlorure mercurique à 5 pour mille dans l'eau, additionnéé de I2 ml d'eau distillée. On laisse agir 5 min en agitant et ensuite on élimine cette solution stérilement au moyen d'une pipette PASTEUR branchée sur une trompe à vide et passée à la flamme. Puis les graines sont rincées IO fois à l'eau distillée stérile.

b) La germination.

Les graines stérilisées sont déposées alors sur la surface d'un milieu riche (RCG glucosé) afin de contrôler la stérilité et la germination (20 graines/boîte de PETRI).

c) La culture en tubes.

On prend stérilement à l'aide d'une öse les graines germées sur le milieu riche (ayant une racine d'une longueur de I à 2 cm) et on les place sur le support dans le tube à raison d'une plantule par tube. L'incubation est réalisée dans les conditions ambiantes du laboratoire.

d) L'inoculation de la souche à tester .

Dès que les racines secondaires sont apparues,on ajoute I ml de suspension bactérienne dans le milieu de NICOL et THORNTON; ces bactéries sont préalablement centrifugées,lavées et reprises dans ce milieu.Pour chaque essai,environ IO^6 bactéries par tube sont utilisées.

2. Le test de l'infectivité.

On dit qu'une souche bactérienne de Rhizobium est infective quand elle est capable d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules. Ce caractère se note Inf^+; il se différencie difficilement de la spécificité d'hôte.

L' infectivité d'une souche de Rhizobium est donc la capacité de former (" in vitro ") des nodules sur une légumineuse-test. Le principe du test est de mettre une légumineuse cultivée aseptiquement,en présence de la souche à étudier et d'observer s'il y a formation de nodule ;les tissus internes des graines étant normalement exempts de bactéries.

3) Le test d'efficience.

L'efficience,c'est la qualité de l'association Rhizobium - légumineuse qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire. Par extension,c'est la qualité d'une souche de Rhizobium capable d'induire une telle association. Le symbole du caractère est représenté par Eff^+.

Le contrôle de l'efficience est réalisé dans les conditions suivantes : après inoculation des souches à tester,les plantules, maintenues en croissance entre I mois et demi et 2 mois, sont transférées dans un flacon de I50 ml fermé hermétiquement. On retire à l'aide d'une seringue I7 ml d'air du flacon que l'on remplace par I5 ml d'acétylène (qui sera éventuellement réduit par la nitrogénase) et 2 ml de propane (qui servira de témoin interne pour le dosage). Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle et l'on prélève à l'aide d'une seringue un volume de 0,5 ml pour l'injecter dans le chromatographe en phase gazeuse (Intersmat IGC, II2 F). Ce prélèvement correspond à la quantité d'éthylène formé au temps t = 0.

Le flacon contenant la plantule est ensuite placé dans l'étuve à 32°C.Après 7 heures d'incubation, on homogénéise de nouveau le contenu du flacon et on injecte la même quantité de gaz dans le chromatographe pour mesurer la quantité d'éthylène éventuellement produite.

La formule appliquée pour déterminer la quantité d'éthylène formé après injection de l'acétylène dans le flacon est :

$$Q = C \times K \times \frac{H_I \quad (C_2H_4)}{H_2 \quad (C_3H_8)}$$

Q = Nombre de µ moles de C_2H_4 produites dans le flacon

C = Nombre de µ moles de C_3H_8 injectées dans le flacon

C = I,27 µ moles de C_3H_8 injectées dans le flacon

K = Coefficient de proportionnalité. K = I,5 pour le rapport $\frac{C_3H_8}{C_2H_4}$

H_I = Hauteur du pic de C_2H_4

H_2 = Hauteur du pic de C_3H_8

C_2H_4 = éthylène

C_3H_3 = propane

$\Delta Q = Q_7 - Q_O$

ou

Q_7 = quantité de C_2H_4 produite au temps t = 7 heures.

Q_O = quantité de C_2H_4 produite au temps t = O heure.

Conditions expérimentales:

- Gaz vacteur : N_2
- Température du four : 50°C.
- Température d'injection : 70°C.
- Température du détecteur : II5°C.
- Détecteur : ionisation de flammme
- La longueur de la colonne est de 2 mètres et remplie de sphérosil X_O B_O 75
- Chromatographe : intersmat IGC , II2 F

VI METHODES DE DESHYDRATATION ET DE CONSERVATION DE LA BIOMASSE.

I - Procédés de concentration partielle de la biomasse.

Les bactéries ont été recueillies par 2 procédés différents :

a) La centrifugation en continu des bactéries.

Nous avons utilisé une centrifugeuse Westfalia type KDD.604 , à la vitesse de IO.OOO t/min (I3.400 g).
Ce procédé est difficilement utilisable pour les récupérations de cultures renfermant un taux de polyosides supérieur à I.OOO µg/ml.

b) La concentration des bactéries sous vide sur appareil Centri-Therm.

L'appareil Centri-Therm C.T.$_{I}$.B . permet de recueillir les bactéries à partir de volumes de milieu plus importants. Ce procédé associe,pour la concentration d'un produit, le vide,la force centrifuge, et l'élévation ménagée de température. (Fig. 3)

Cet appareil permet de séparer le produit de fermentation en deux parties sensiblement égales,le concentrat et le surnageant.
Après deux passages successifs,il est possible de concentrer quatre fois la culture obtenue en fermenteur.

Les principales conditions de fonctionnement de l'appareil Centri-Therm que nous avons utilisé sont les suivantes :

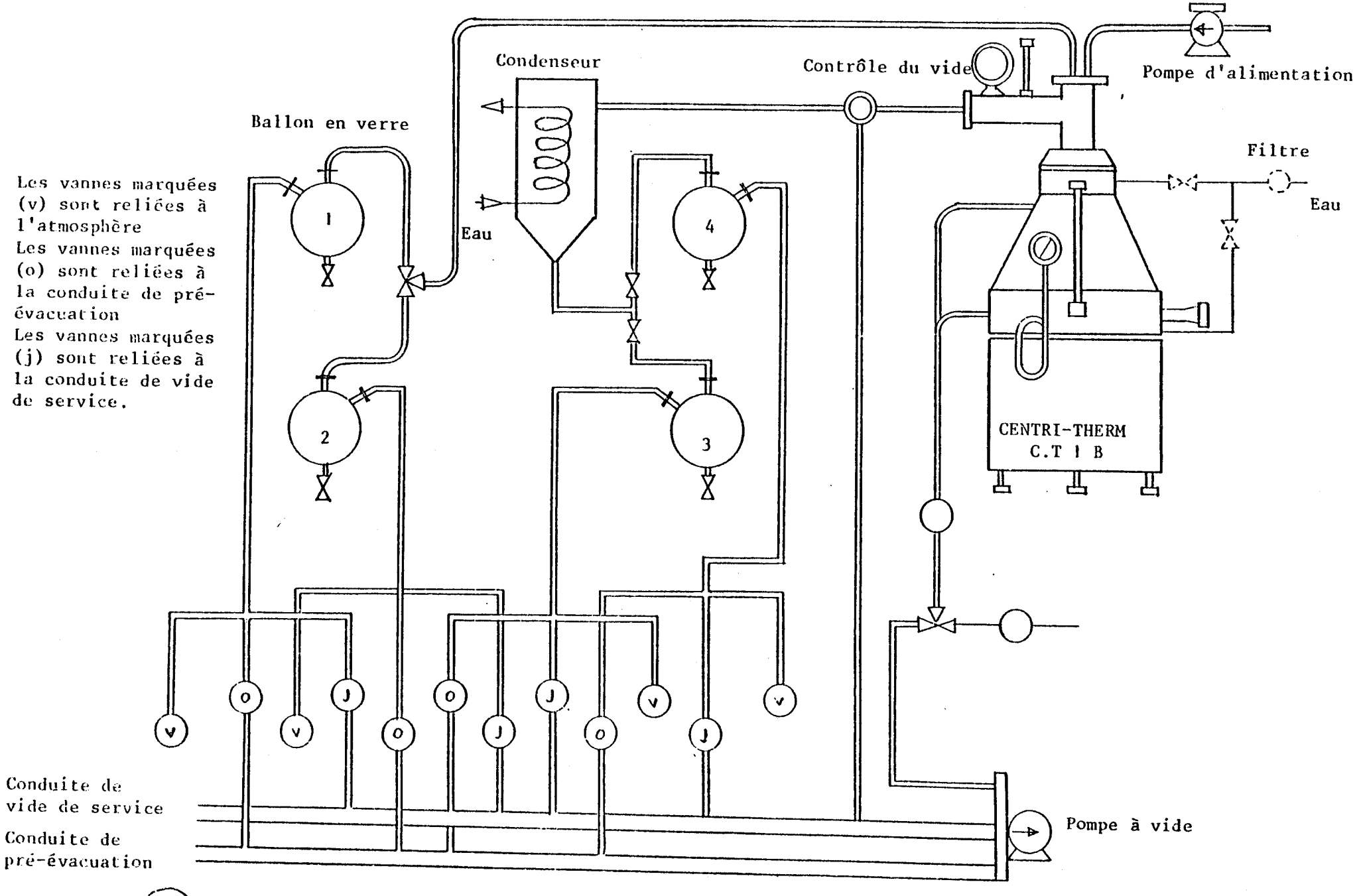


FIG. 3 : CENTRI-THERM C.T 1 B : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT

- stérilisation préalable de l'appareil par vapeur d'eau chaude pendant 30 min.
- conduite de la concentration :

	Ier passage	2ème passage
- température d'entrée du produit	65-67°C	66-65°C
- vide à l'entrée	-0,70 bars	-0,70bars
- température de sortie du produit	33-37°C	34°C
- vide à la sortie	-0,96bars	-0,95bars
- température de l'eau de chauffage	65°C	65°C
- température de l'eau de refroidissement	I6°C	I6°C
- durée du cycle	20-32min	20-32 min

Dans ces conditions ,40l de culture bactérienne peuvent être réduits à IO l en I heure à température ménagée.

2 - Méthodes de déshydratation de la biomasse.

Deux méthodes de conservation par dessiccation ont été utilisées : la lyophilisation et l'atomisation (spray- drying)

a) La lyophilisation.

a.1. Principe général.

La lyophilisation est une déshydratation par sublimation. Le produit préalablement congelé est placé dans une enceinte sous vide. L'abaissement de la pression entraîne une sublimation de la glace; c'est à dire que l'eau,à l'état de glace,s'élimine sous forme de vapeur d'eau sans passer par l'état liquide.

Une lyophilisation comporte la congélation et la déshydratation du milieu.

- La congélation .

La congélation est une étape importante car elle est en grande partie responsable du faible taux de survie des cellules traitées. (36).

La température de congélation doit être suffisamment basse pour que toutes les substances présentes dans le produit soient bien congelées.

La congélation doit être très rapide afin de conserver au mieux les structures cellulaires.

- La déshydratation.

La phase de déshydratation se divise en deux parties qui correspondent exactement aux deux formes d'existence de l'eau dans une substance-eau libre et eau liée-.
Ces deux parties sont la sublimation et la désorption.

La phase de sublimation correspond à l'élimination de l'eau libre de l'état solide à l'état de vapeur; cette élimination s'effectue sous vide et la vapeur se condense sur une paroi froide. La sublimation n'est possible que si l'on fournit au produit l'énergie correspondante à la température latente de sublimation.

La désorption est la phase durant laquelle l'eau liée est éliminiée sous forme moléculaire,et cela sous vide poussé. Il est aussi utile d'apporter des calories afin de favoriser la désorption. Théoriquement la désorption ne se termine jamais,et on est obligé d'admettre une quantité d'eau résiduaire dans le produit lyophilisé.

a.2. Conditions expérimentales .

Nous avons utilisé deux types de lyophilisateur:

- Le lyophilisateur USIFROID .

Ce lyophilisateur de type hérisson est composé d'une cuve sur la paroi de laquelle sont disposés des ajutages . Les ampoules à lyophiliser sont reliées à ces ajutages par des embouts en caoutchouc . Les calories nécessaires à la déshydratation sont apportées par l'air ambiant. L'eau évaporée est piégée sur la paroi du condenseur. Nous avons utilisé un mélange de glace carbonique et d'alcool à brûler comme source froide.

Les lyophilisations ont duré I6 heures.

La suspension bactérienne, sous un volume de I ml, est placée dans des ampoules à lyophiliser en verre non poreux. Les ampoules sont congelées à - 70°C avec un congélateur centrifuge, puis placées sur le lyophilisateur USIFROID.

- Le lyophilisateur SERAIL C_5I2B

Nous avons réalisé la plupart de nos lyophilisations avec ce type d'appareil. La congélation s'effectue sur les plateaux du lyophilisateur à une température de -20°C pendant IO à I2 heures. La température de sublimation est de -I3°C . Deux types d'essais ont été réalisés :

- Dans certaines expérimentations,le produit récupéré par centrifugation réfrigérée est réparti au préalable en flacons de 75 ml de capacité, et à raison de 5 ml par flacon. On a utilisé comme support,le lait partiellement écrémé à une concentration de IOO g/l . La durée totale du cycle de lyophilisation a nécessité 78 heures.
- Dans d'autres lyophilisations, on a employé 5 séries des mêmes flacons mais avec 5ml du produit concentré sous vide (Centri-Therm.) additionné d'autres supports protecteurs à une concentration finale de 50 g/l . Ces lyophilisations ont duré 58 heures.

b) L'atomisation .

b . 1 - Principe général .

Le séchage par atomisation,parfois appelé séchage par pulvérisation,consiste à envoyer le produit liquide à sécher dans un disque tournant à très grande vitesse. Les très fines gouttelettes ainsi formées sont mises en contact avec un courant d'air chaud (température d'entrée) qui agit donc sur une très grande surface.

Ces gouttelettes de liquide sont alors très rapidement transformées en poudre fine et en vapeur d'eau. La chaleur de l'air sec est ainsi utilisée pour l'évaporation. La poudre est ensuite évacuée de la chambre de séchage,avec l'air sortant,,jusqu'au cyclône (température de sortie). Elle est recueillie au fond de ce cyclône et l'air est aspiré au dehors par un extracteur.

b.2 - Conditions expérimentales.

Nous avons utilisé deux types d'atomiseur différents:

- L'atomiseur MINOR MOBILE (NIRO ATOMIZER).

Le sécheur atomiseur MINOR MOBILE de la société RAPIDASE est un appareil de laboratoire. Il permet le séchage de faibles quantités de produit,qualité propice à la réalisation de nombreux essais successifs nécessaires à nos expérimentations (schéma p. 56). Les principales caractéristiques de fonctionnement sont les suivantes :

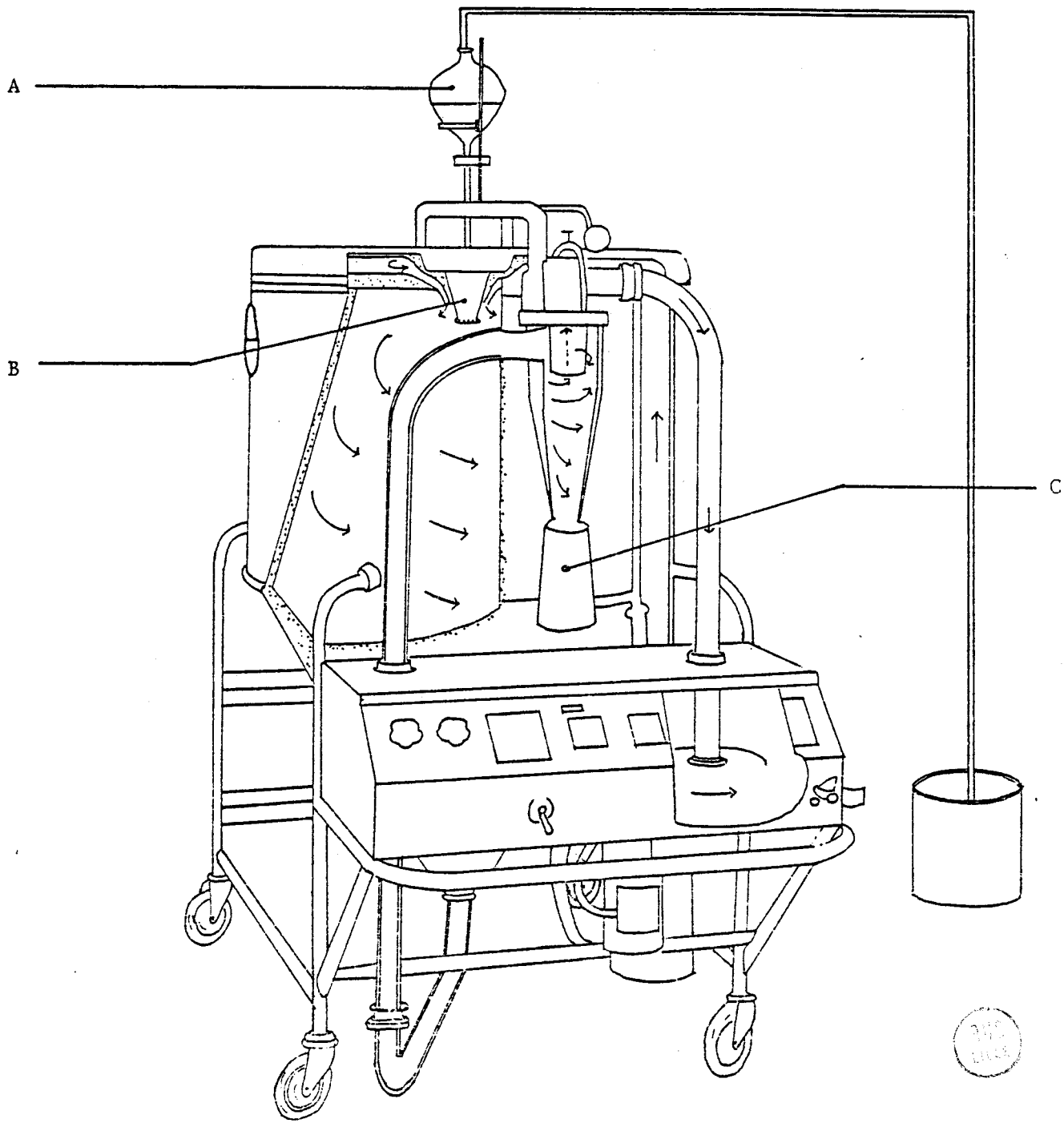
- le dispositif d'alimentation,composé d'une pompe péristaltique connectée à un récipient qui contient le produit en agitation continue;
- l'atomiseur de type rotatif,est entrainé par de l'air comprimé; la pression d'air de 6 Kgf/cm^2 permet d'obtenir,à une vitesse de 38000t/min ,le produit en très fines gouttelettes;
- Un thermostat assure la régulation de la température d'entrée de l'air stérile chauffé électriquement. A 110°C le débit d'air entrant est voisin de 70 m^3/h.

CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DU MINOR MOBILE

A = Dispositif d'alimentation

B = Atomiseur

C = La poudre est recueillie dans un récipient en verre.

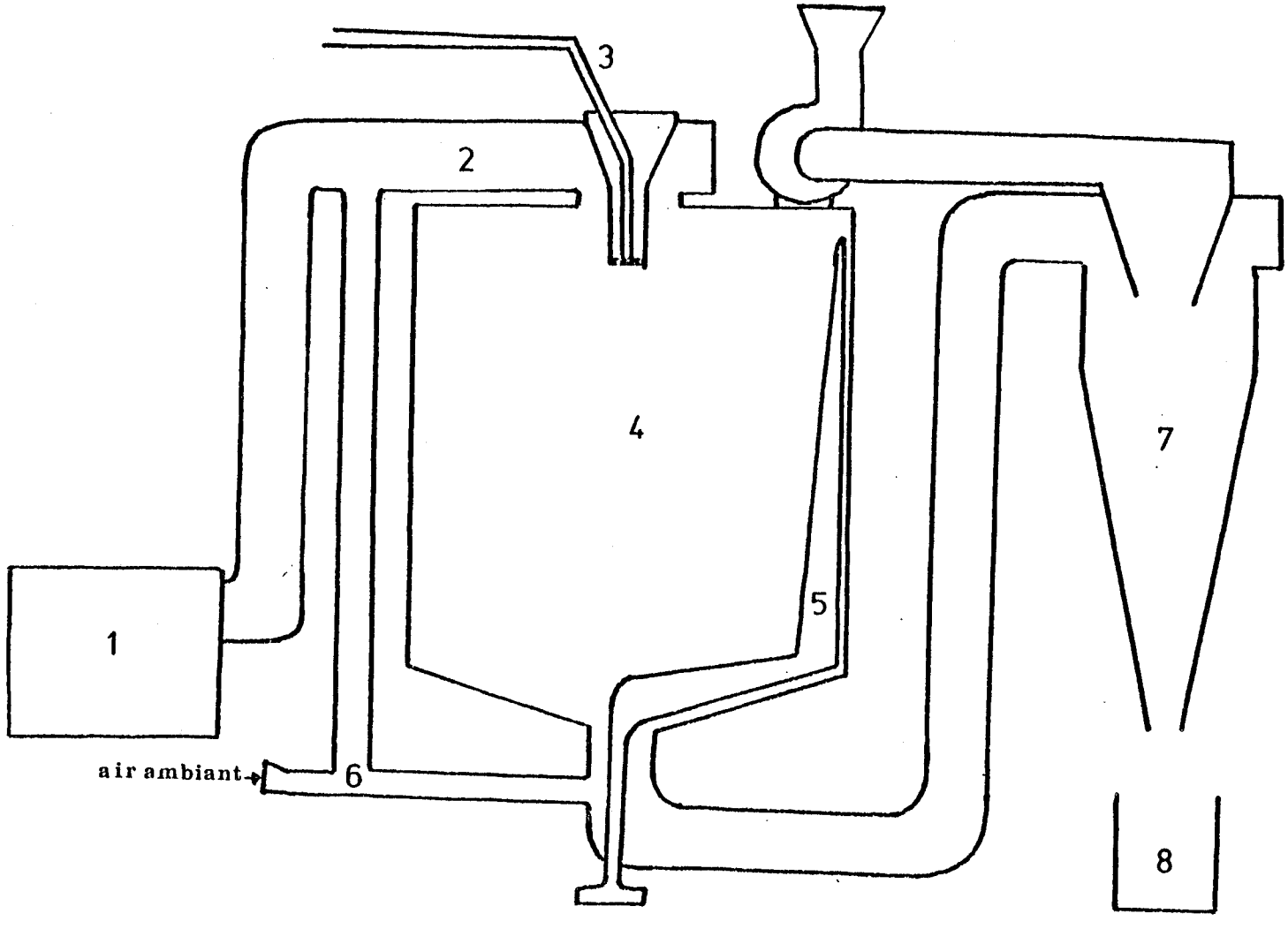


- la poudre obtenue est récupérée dans un récipient en verre;
- la stérilisation préalable de l'appareil s'effectue par passage d'air très chaud (250°C) dans l'atomiseur.

-L'atomiseur ANHYDRO (en représentation schématique p.58)

Il s'agit d'un atomiseur de dimension industrielle couramment utilisé par l'INSTITUT PASTEUR de Lille pour la déshydratation des milieux de culture. Son utilisation nécessite des volumes importants. Le liquide est pulvérisé dans la chambre de séchage grâce à une turbine d'atomisation . Les particules atomisées entrent directement en contact avec de l'air préalablement chauffé au gaz butane,ce qui conduit à une déshydratation du produit. La matière sèche à l'état de poudre se dépose sur les parois et sur le fond de la chambre,d'où elles sont recueillies par un râcleur où de l'air est insufflé (Air-broom). La poudre et l'air sont ensuite envoyés dans le cyclône de séparation où le produit est extrait.

Le rendement d'atomisation est fonction de la différence entre les températures de l'air à l'entrée et à la sortie de la chambre. Une température d'entrée de IIO°C et une température de sortie de 80°C permet par exemple une atomisation de IO litres de produit par heure.



1 chauffage de l'air

2 arrivee d'air

3 arrivee du liquide

4 chambre de sechage

5 racleur

6 regulation de la temperature de sortie

7 cyclone de separation

8 reception de la poudre

SHS LILLE

ATOMISEUR ANHYDRO

b_3 Mesures effectuées :

_Tous les paramètres habituels de l'atomisation :

température d'entrée et de sortie de l'air dans la chambre d'atomisation, température à l'entrée et à la sortie du cyclône.

- Le rendement de l'atomisation :

rapport entre la matière sèche recueillie et la matière sèche de la culture atomisée. A chaque expérience nous avons établi le taux de matière sèche de la culture et le poids de poudre obtenue. Une faible quantité de poudre est perdue, entraînée par l'air de séchage au niveau du cyclône.

- Le dénombrement des cellules viables: voir p. 42

- L'humidité résiduelle des poudres obtenues est mesurée par dessiccation poussée de I gramme de poudre à l'étuve à IO5°C.

3 - Moyens de conservation des cellules déshydratées.

Les bactéries deshydratées par lyophilisation sont conditionnées et conservées de deux façons :

- en ampoules scellées,sous vide,
- en flacons spéciaux de 75 ml de capacité pour les volumes plus importants (5ml) . Ces flacons sont fermés par un double bouchonnage : un opercule perforable en caoutchouc et une capsule vissée,ce qui assure une parfaite étanchéité.

Les bactéries deshydratées par atomisation sont réparties le plus rapidement possible,dans les flacons spéciaux,à raison de 0,5 g par flacon .

L'utilisation de ces flacons nous a permis de soumettre aisément les bactéries deshydratées à différentes conditions de conservation :

- sous air.
- sous vide (10^{-3} mm Hg).
- sous azote (qualité U , L'AIR LIQUIDE), introduit dans le flacon après y avoir fait le vide.

Chaque série de flacons est ensuite conservée,à l'obscurité, à différentes températures :

- + 4°C, en chambre froide.
- + 30°C, en étuve.
- + 20 - 25°C , température ambiante du laboratoire.

Chapitre III

RESULTATS

ET

COMMENTAIRES

Chapitre III

partie 1

PRODUCTION DE CELLULES DE RHIZOBIUM MELILOTI

A ETUDE ET CHOIX DU MILIEU DE CULTURE.

I. CONSIDERATIONS GENERALES.

Contrairement à bon nombre de micro-organismes il n'est pas facile de trouver un milieu synthétique et même complet qui assure une croissance convenable de l'ensemble des souches de Rhizobium.

Lors de repiquages successifs ces derniers ne donnent plus de bonnes cultures;ce qui prouve que d'autres constituants sont nécessaires.

NEUMANN I902 (100) a essayé plus de 70 milieux à base d'extraits de plantes et de sol. Les différents auteurs ont des avis trés différents sur les facteurs de croissance indispensables au Rhizobium . Pour WEST et WILSON I939 (167) il s'agirait de la biotine et de la thiamine,pour JORDAN I952 (70) d'acides aminés, pour STEINBERG I938 (140) et NORRIS I958 (102) d'oligo-éléments.

En ce qui concerne la croissance sur milieu complet, DELATTRE avait modifié en I97I (34) le milieu de LAIRD (73) qu'il a appelé RC . COURTOIS I975(29) montre que le milieu de WRIGHT I92I (173) permet une croissance convenable. Les performances satisfaisantes de ce milieu avaient déjà été remarquées par BONNIER et BRAKEL I969 (16).

Pour FERRY, BLACHERE et OBATON 1959 (46) il n'existe pas de milieu minimum qui permet la croissance de toutes les souches de Rhizobium des différents groupes d'inoculation.

Les milieux minima mis au point conviennent surtout à la croissance des souches d'un seul groupe de Rhizobium.

Ainsi DUDMAN 1964 (43) , FERRY et coll. 1959 (46) RIGAUD 1965 (122) ont mis au point des milieux pour la croissance des souches de R. meliloti. COURTOIS 1975(29). montre que les milieux F.B.O. et le milieu R. glucosé, ou mannité, convenaient mal à la croissance et à la production de polyosides par les souches M_5N_I et L_2S. Cet auteur n'a d'ailleurs pas trouvé de milieu minimum convenable pour la croissance et la synthèse des polyosides par l'ensemble des souches des différentes espèces.

Notre recherche a d'abord été orientée vers l'étude des milieux de culture liquides permettant d'obtenir une croissance satisfaisante des Rhizobium appartenant aux différents groupes d'inoculation.

Les milieux les plus couramment décrits dans ce but contiennent très souvent de l'extrait de levure. La plupart sont à usage de laboratoire (R.C., T.Y.), d'autres sont utilisés pour obtenir des productions plus importantes. (Y.E.M.) . Certains travaux de recherche ne peuvent cependant s'accommoder de tels milieux et nécessitent obligatoirement l'utilisation d'un milieu synthétique parfaitement défini. Nous avons donc commencé par éprouver un certain nombre de souches de Rhizobium appartenant aux principaux groupes d'inoculation . Toutes les souches

utilisées sont répertoriées dans le chapitre " Matériel et Méthodes Générales " . Puis nous avons comparé la croissance de ces souches dans les milieux complets et les milieux synthétiques les plus souvent décrits , ceci par des techniques bien standardisées de cultures en tubes et au biophotomètre, décrites plus haut.

Dans le cadre de recherches et de mises au point d'implantation de culture de luzerne dans les sols hostiles tels que ceux de Bretagne qui sont très acides,notre étude s'est poursuivie avec différentes souches de Rhizobium meliloti et particulièrement avec la souche acido-résistante $M_9Sm_I^{Str}$ que RAKOTOARISOA (118) a obtenu par mutagénèse.

II. CULTURES DE RHIZOBIUM EN MILIEUX COMPLETS (OU EMPIRIQUES).

Nous n'avons pas retenu pour nos études le milieu de WRIGHT à l'extrait de levure fraîche. Il est peu pratique, fastidieux à préparer et de plus il est sujet à la non reproductivité selon les lots de levure fraîche utilisés.

Sept milieux de cultures complets contenant tous de l'extrait de levure sec (Yeast Extract Difco) sont répartis en tubes et en flacons puis ensemencés comme nous l'avons décrits ci-dessus, en deux exemplaires, avec I5 souches de croissance rapide et I5 souches de croissance lente. L'inoculum important, permet d'obtenir une population de départ de l'ordre de IO^7 bactéries par ml. L'incubation est réalisée en agitation à 30°C.
Les cultures en tubes sont appréciées par simple observation optique du trouble toutes les 24 heures.

I- Cultures de souches de Rhizobium à croissance rapide.

Des essais préliminaires nous ont montré, que dans nos conditions expérimentales, la densité optique optimale (D.O. max.) était obtenue après 3 jours d'incubation avec la plupart des souches à croissance rapide utilisées .

Les résultats obtenus en culture en tubes, en présentation simplifiée, sont rassemblés dans le tableau 1

		MILIEUX DE CULTURE COMPLETS						
	SOUCHES	YEM	RC	K	I	TY	A	LB
R. MELILOTI	MI-5	±	++	-	++	++	±	±
	M5NI	+	+	±	++	+	±	±
	M9S	±	+	±	+	++	±	±
	$M9Sm_I^{Str}$	+	±	±	+	++	-	±
	AI45	+	±	±	+	+	-	-
	AI6I	±	+	±	++	+	±	-
	M2OOI	+	+	±	++	++	±	±
	$M2OII^{Str}$	±	±	-	+	+	±	±
	M2OIIS2	±	±	-	+	+	±	-
R. LEG.	LII	±	-	-	+	±	-	±
	L2S	±	-	-	±	±	-	-
R. PH.	PI6	±	±	±	+	+	±	±
	P9S	±	±	-	+	+	+	-
R. TRIF.	TAI	+	±	-	±	±	-	-
	T3	±	±	±	±	±	±	±

TABLEAU.1 : CULTURES DE RHIZOBIUM A CROISSANCE RAPIDE, EN MILIEUX COMPLETS, EN TUBES, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C

Légende: - : Croissance peu différente du temps T = O (env. IO^7 b/ml)

± : Culture assez dense (comprise entre IO^7 et IO^9 b/ml.)

+ : Culture dense, supérieure à l'inoculum (env. IO^9 b/ml)

++: Culture très dense (supérieure à IO^9 b/ml)

L'analyse des résultats figurant dans ce tableau nous montre clairement que le milieu T.Y. de BERINGER et le milieu d'ISWARAN permettent d'obtenir des cultures abondantes pour de nombreuses souches à croissance rapide et particulièrement pour R.meliloti et R. phaseoli. Sur le milieu R.C. les cultures sont moins luxuriantes que sur ces deux milieux ;elles sont assez comparables à celles obtenues sur le milieu Y.E.M.,milieu le plus utilisé par les auteurs .

Le milieu de LURIA ne permet qu'une croissance faible.

Dans le tableau 2 figurent les mesures d'absorbance à 600nm et de pH après 72 heures d'incubation pour les 3 milieux complets donnant les meilleurs résultats,cultures effectuées cette fois ci en flacons pour se rapprocher des conditions de culture en fermenteur.

D'après ce tableau les pH. finaux des cultures de 3 jours en milieu d'ISWARAN sont très voisins de ceux obtenus dans les cultures en milieu R.C.,ils restent toujours assez proches des pH. initiaux. HORNEZ (61_62) a montré que l'utilisation du fructose (et du mannitol) par R. meliloti en milieu R.C., ne s'accompagnait que d'une variation négligeable du pH. Nous tenterons ultérieurement d'expliquer ce qui se produit en milieu d' ISWARAN. Il faut quand même remarquer une légère acidification des cultures de R. phaseoli dans ces deux milieux.

En milieu T.Y. les pH des cultures après 3 jours,pour l'ensemble des souches à croissance rapide,sont très souvent de l'ordre de 8 . Ils reflètent une activité métabolique peu importante à l'égard des sucres réducteurs présents dans l'extrait de levure.

		MILIEUX DE CULTURE COMPLETS					
	SOUCHES	R.C.		I		T.Y.	
		D.O.	pH (*)	D.O.	pH	D.O.	pH.
R. MELILOTI	MI5	4,2	7,2	5,8	7,0	5,2	7,9
	M5NI	2,6	6,9	4,0	6,8	4,7	8,3
	M9S	3,6	7,2	3,7	7,0	3,3	8,I
	M9Sm^{Str}	2,8	6,8	3,2	7,0	3,5	8,2
	AI45	2,I	7,2	3,6	7,I	4,0	7,9
	AI6I	3,5	7,0	5,8	7,2	4,7	8,I
	M200I	3,9	6,8	6,6	7,I	5,2	8,3
	M20II^{Str}	2,2	6,9	4,I	7,2	4,3	8,5
	M20IIS2	2,0	7,2	4,3	6,9	3,6	8,I
R. LEG.	LII	0,7	7,3	0,9	7,2	I,5	8,5
	L2S	0,8	7,2	2,7	7,0	I,8	8,7
R. PH.	PI6	3,0	6,2	4,5	6,5	2,0	8,3
	P9S	2,5	6,5	4,3	6,8	2,I	7,9
R. TRIF.	TAI	I,5	7,2	2,3	6,9	I,8	8,0
	T3	2,0	7,0	2,I	6,8	I,8	8,I

TABLEAU 2 : MESURE DE L'ABSORBANCE A 600 nm ET pH DE CULTURES DE RHIZOBIUM A CROISSANCE RAPIDE, EN MILIEUX COMPLETS, EN FLACONS, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

(*) pH initial de tous les milieux : 7,2

BUS LILLE

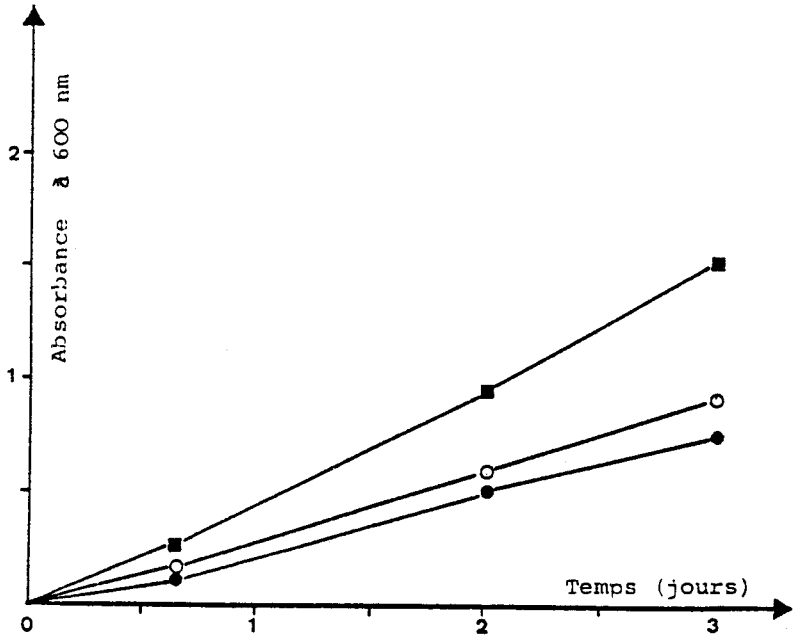


FIG. 4 CROISSANCE DE R. LEGUMINOSARUM L II SUR MILIEU RC (●) TY (■) ET D'ISWARAN (○).

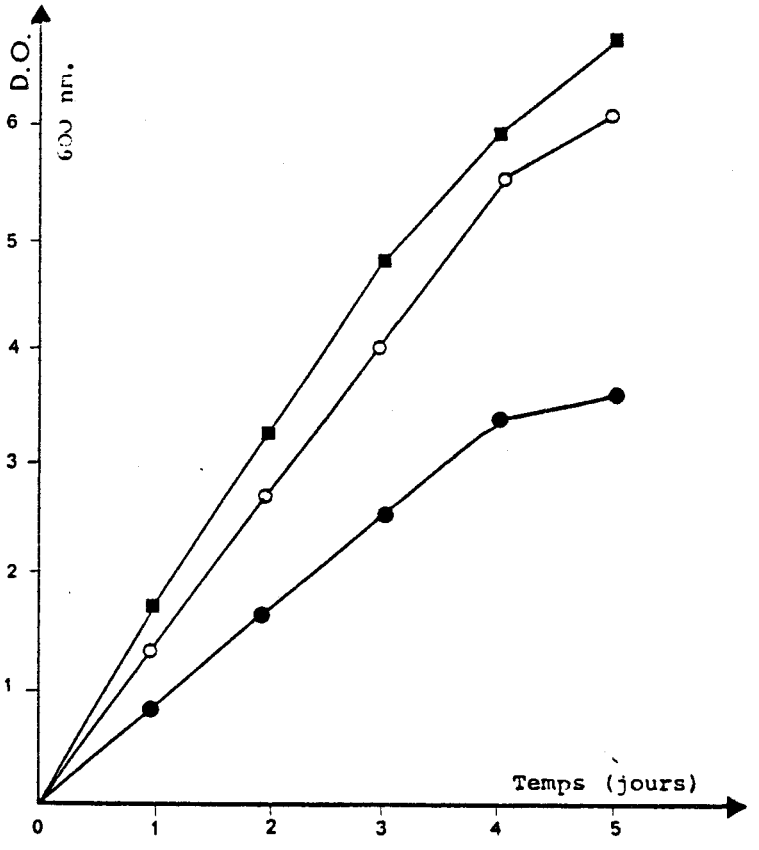


FIG. 5 CROISSANCE DE R. MELILOTI M5N1 SUR MILIEU R.C. (●) T.Y. (■) ET D'ISWARAN (○)

BUS

La décarboxylation de certains acides aminés présents dans la Tryptone (ex: lysine)peut également contribuer à ce phénomène.

Les figures 4 et 5 nous montrent quelques exemples de courbes de croissance obtenues dans ces dernières conditions.

Dans un but de simplification nous n' avons pas jugé utile de représenter toutes les courbes dans ce travail.

L'étude de ces courbes et des temps de génération pour quelques souches intéressantes,obtenus dans ces milieux empiriques, sera envisagée ultérieurement .

2 - Cultures des souches de Rhizobium à croissance lente.

Des essais préliminaires nous ont montré que, dans nos conditions expérimentales,la densité optique optimale était obtenue après 5 à7 jours d'incubation avec la plupart des souches à croissance lente utilisées.

Les résultats obtenus en culture , et présentés de façon simplifiée,sont rassemblés dans le tableau . 3

L'analyse des résultats figurant dans ce tableau nous montre que les cultures de ces souches sont non seulement lentes mais aussi peu abondantes en comparaison de celles obtenues avec les souches à croissance rapide. Les meilleures performances, pour les souches à croissance lente sont aussi obtenues avec les milieux T.Y. et d'ISWARAN. Sur le milieu R.C. les cultures sont moins luxuriantes que sur ces deux milieux,et sont comparables à celles obtenues sur le milieu Y.E.M. La croissance est très faible sur le milieu L.B.avec les souches à croissance lente et particulièrement J68 et KI07 .

		MILIEUX DE CULTURE COMPLETS						
	SOUCHES	YEM	RC	K	I	TY	A	LB
R. japonicum	J5	+	+	±	++	++	±	-
	J6	+	+	±	++	++	±	-
	J67	±	±	-	±	+	-	-
	J68	±	-	-	±	±	-	-
	CC709	+	++	+	++	+	-	-
	CB1809	+	++	±	++	+	±	±
R. lupini	K65	±	±	-	+	+	-	-
	K107	±	±	-	±	±	-	-
	K121	±	±	-	+	+	-	-
R. cowpea. group.	V6	±	±	-	±	±	-	-
	V122	-	±	-	±	±	-	-
	I35	+	+	±	±	+	-	-
	3 001	±	±	-	±	+	-	-
	3 002	+	+	±	++	+	±	-
	CB756	±	±	±	++	±	-	±

TABLEAU 3 : CULTURES DE RHIZOBIUM A CROISSANCE LENTE, EN MILIEUX COMPLETS, EN TUBES, APRES 144 HEURES D'AGITATION A 30°C.

Légende: - : Croissance peu différente du temps T = 0, environ 10^7 b /ml

± : Culture assez dense, comprise entre 10^7 et 10^9 b/ml

+ : Culture dense, supérieure à l'inoculum (env. 10^9b/ml)

++ : Culture très dense, supérieure à 10^9b/ml

BIB LILLE

Dans le tableau 4 figurent les mesures d'absorbance à 600nm et de pH après I44 heures d'incubation pour les 3 meilleurs milieux complets,cultures effectuées en flacons.

D'après ce tableau on remarque que les pH finaux des cultures de 6 jours en milieu d'ISWARAN sont aussi voisins de ceux obtenus en milieu R.C. S'ils restent encore proches de la neutralité ils sont néammoins plus élevés que dans les souches à croissance rapide.

On observe encore l'alcalinisation des cultures en milieu T.Y. pour des raisons identiques à celles décrites pour les souches à croissance rapide.

On notera que pour les souches J6 , K I2I et surtout 300I la densité optique qui permet d'apprécier la croissance est supérieure sur le milieu T.Y.

Les figures 6 , et 7 nous montrent quelques exemples de courbes de croissance obtenue dans ces dernières conditions.

L'examen de ces courbes nous montre bien que pour lessouches à croissance lente les milieux T.Y. et d'ISWARAN donnent des D.O. supérieures en général au milieu R.C., après 6 jours de culture agitée à 30°C.

MILIEUX DE CULTURE COMPLETS							
	SOUCHES	R.C.		I		T.Y.	
		D.O.	pH *	D.O.	pH	D.O.	pH
R. JAPONICUM	J5	2,3	6,9	3,8	7,4	2,7	8,5
	J6	I,3	7,7	2,6	7,6	2,9	8,7
	J67	0,7	7,7	I,0	7,3	I,9	8,4
	J68	0,4	8,I	I,6	7,7	I,4	8,4
	CC709	3,6	6,8	4,2	7,6	2,8	8,7
	CBI809	3,I	6,9	3,8	7,9	2,3	8,0
R. LUPINI	K65	0,7	6,8	2,0	8,0	2,2	8,8
	KI07	0,8	7,3	I,0	7,7	0,9	7,4
	KI2I	0,9	7,5	2,I	7,6	3,2	8,0
R. COWPEA GROUP.	V6	I,6	6,8	I,2	7,9	I,2	8,3
	VI22	I,6	6,9	I,2	8,0	I,I	8,5
	I35	2,5	7,0	I,7	8,I	2,I	8,6
	300I	0,7	8,I	0,8	8,I	2,7	8,8
	3002	I,9	6,9	3,6	7,3	2,5	8,5
	CB756	0,4	6,7	3,3	8,0	0,9	8,4

TABLEAU 4 : MESURE DE L'ABSORBANCE A 600 nm ET pH DE CULTURES DE RHIZOBIUM A CROISSANCE LENTE, EN MILIEUX COMPLETS, EN FLACONS, APRES I44 HEURES D'AGITATION A 30°C.

* pH initial de tous les milieux :7,2

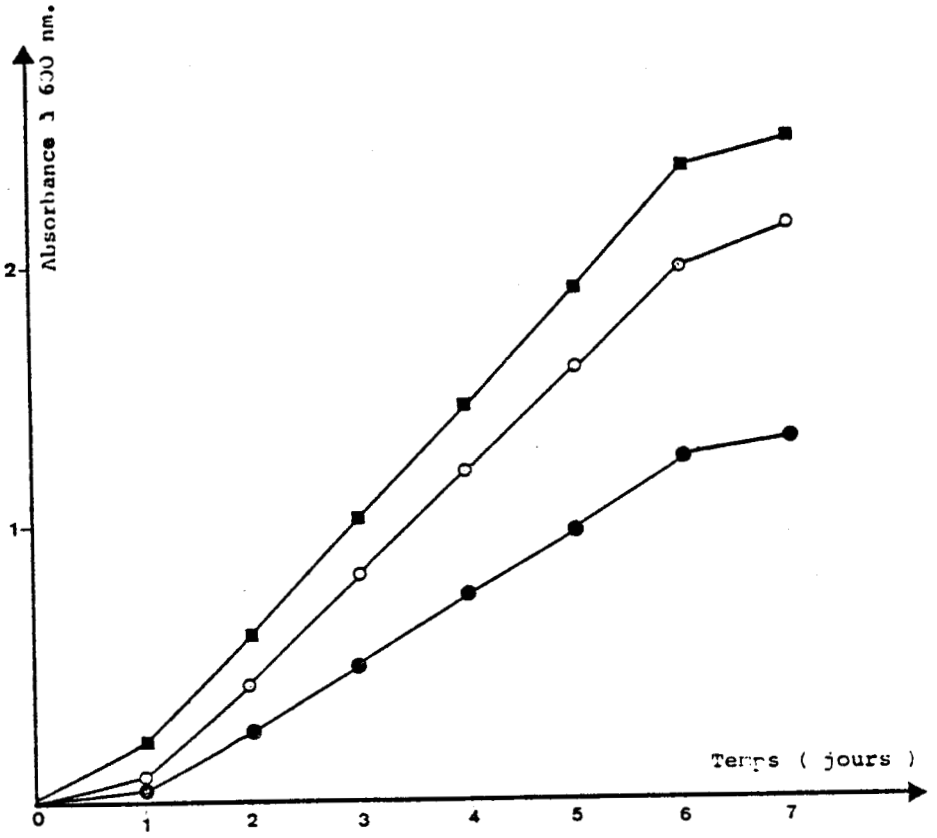
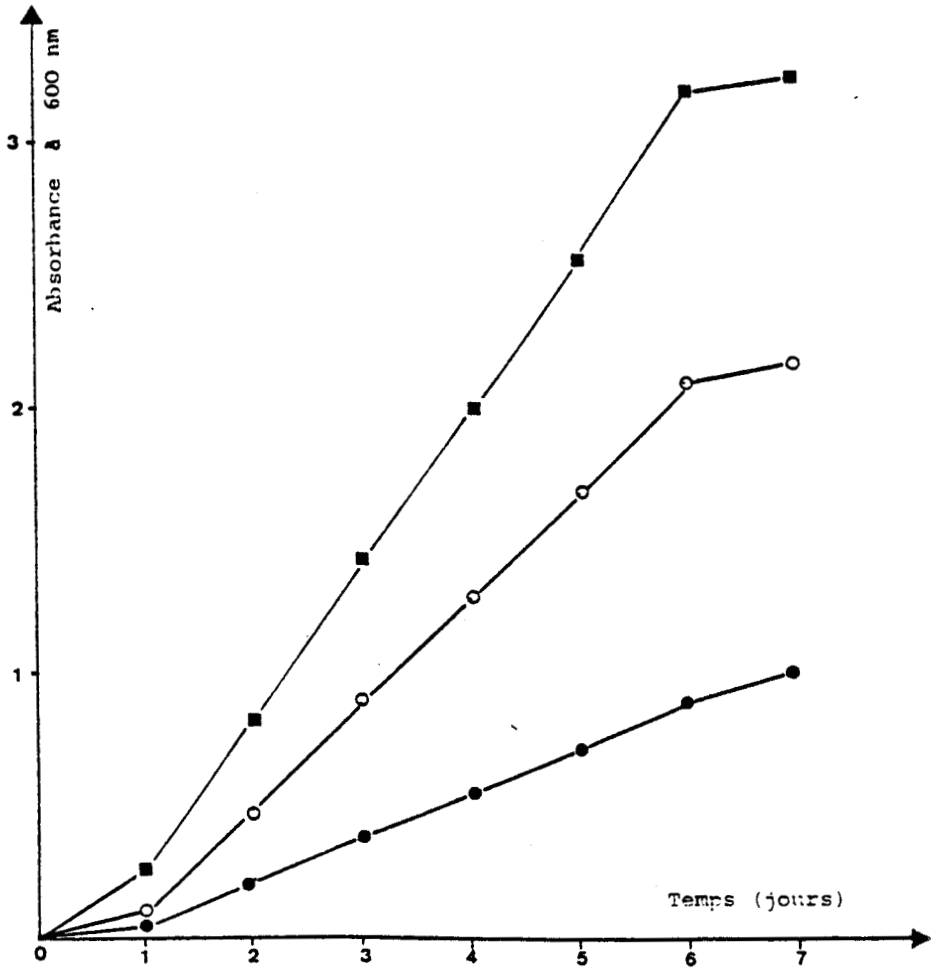


FIG. 6 CROISSANCE DE R. JAPONICUM J6 SUR MILIEU RC (●), TY (■) ET D'ISWARAN (o).



BUS LILLE

FIG.7 CROISSANCE DE R. LUPINI K 121 SUR MILIEU RC (●), TY (■), ET D'ISWARAN (o).

3 - Discussion et conclusion.

De cette étude de la croissance des Rhizobium en milieu empirique on peut tirer les conclusions suivantes :

a. Le milieu L.B. ne permet pas, dans nos conditions expérimentales, une croissance abondante pour le genre Rhizobium. Quelques souches de R. meliloti peuvent néanmoins se multiplier de façon appréciable sur ce milieu, comme les bactéries du genre Agrobacterium que certains auteurs rapprochent au point de vue taxonomie, de R. meliloti. UCKER I977 (151) trouve même que ce milieu est le meilleur parmi d'autre milieux peptonés (bouillon Tryptone, bouillon Super etc....) Il le retient pour ses études physiologiques et génétiques de R. meliloti. Il faut remarquer toutefois que cet auteur trouve un temps de doublement de R. meliloti 20II de l'ordre de 4 heures dans ce milieu.

La croissance faible de toutes les espèces sur ce milieu peut aussi s'expliquer par les travaux de JORDAN I965 (70), SHERWOOD I972 (135) qui montrent que des concentrations en extrait de levure supérieures à 0,35% diminuent la viabilité des cellules et provoquent d'importantes modifications morphologiques . Le milieu de LURIA contient en effet 5g/l. d'extrait de levure. Pour SKINNER I977 (138) une concentration de 0,I% d'extrait de levure additionné de 0,02 à I% de sucre ne change pas le nombre de Rhizobium viables, ceci pour les

R. japonicum, lupini, meliloti, trifolii et le groupe cowpea.

Le même auteur, mais aussi STRIJDOM I965-I969 (143), VAN EGERAAT I976 (154), ont démontré l'action inhibitrice de certains acides aminés (glycocolle et histidine) sur la croissance et l'efficacité des Rhizobium. DATE I972 (32) insiste sur la nécessité de bien choisir les extraits de levure. Pour SHERWOOD I972 (135) la toxicité de certains extraits de levure utilisés à dose élevée (0,3 à I %) serait due à une interaction entre le glycocolle et des ions monovalents. Cet effet inhibiteur peut être diminué par addition de Ca^{2+}. Les faibles cultures obtenues sur le milieu L.B. qui contient I0g/l. de tryptone et 5g/l. d'extrait de levure confirment bien ces résultats.

b . Le milieu T.Y. permet, dans nos conditions expérimentales, une croissance satisfaisante pour l'ensemble du genre Rhizobium, toujours supérieure à celle obtenue en milieux R.C. et Y.E.M. Toutefois il faut remarquer que cette supériorité n'est pas toujours vérifiée pour les souches T3 , CC709 , KI07 , V6 , VI22.

De nombreux auteurs utilisent ce milieu riche qui permet d'obtenir rapidement des cultures de densité optique très élevée. Ce milieu T.Y. est une modification apportée par BERINGER (9) au milieu T.G.Y. (Tryptone, Glucose, Yeast Extract) de MOSELEY et MATTINGLY I97I (93) pour permettre à cet auteur d'obtenir un taux élevé de mutants auxotrophes. Dans d'autres travaux

il remarque que l'élimination du sucre (glucose 0,I%) n'a pas d'autre effet discernable sur la croissance qu'une réduction de la production de polysaccharides, phénomène qui facilite beaucoup les techniques de répliques et de comptage des colonies. Nous avons également vérifié que l'addition de glucose, mannitol ou fructose, à 0,I% en concentration finale ne favorisait pas de façon significative la croissance des souches de R. meliloti dans ce milieu.

D'autre part la propriété de mieux se multiplier en milieu peptoné du type T.Y. ne semble pas être caractéristique d'un groupe particulier. Cette remarque semble aussi valable pour l'inhibition en milieu peptoné de type L.B. L'inhibition est bien provoquée par la présence à un taux élevé de certains acides aminés apportés par la peptone et l'extrait de levure.

c . Le milieu d'ISWARAN permet, dans nos conditions expérimentales, une croissance très abondante pour l'ensemble du genre Rhizobium.

En conclusion nous retiendrons le milieu T.Y. et le milieu d'ISWARAN comme milieux complets pour la mise au point de la production en masse de R.meliloti. En effet notre objectif est de produire, dans les meilleures conditions, des quantités importantes de bactéries de ce genre.

III. CHOIX DU MILIEU POUR LA CULTURE DE RHIZOBIUM MELILOTI.

1 - Souches utilisées :

Pour poursuivre ce travail nous avons utilisé, dans un premier temps, toutes les souches de R. meliloti répertoriées dans la partie "Matériel et Méthodes". Dans un but de simplification nous ne représenterons que les résultats correpondants aux souches citées dans les tableaux précédents. Puis nous nous sommes limités à quatre souches: M5NI, M2OII ^{Str}, MI-5 ^{Str} et M9SmI ^{Str}. Les souches M5NI, M2OII ^{Str} sont trés utilisées pour différentes recherches fondamentales dans divers laboratoires. La souche MI-5^{Str} est employée trés fréquemment en agronomie, dans le monde entier, pour sa capacité à résister à des valeurs trés différentes de pH du sol et pour sa faculté d'adaptation à différents types de sols. La souche M9Sm$_I^{Str}$ de RAKOTOARISOA 1980 (118) a été obtenue par mutagénèses successives provoquées par la N-methyl - N'-nitro-N-nitroso-guanidine (N.T.G.) et sélection sur milieu acide. C'est un mutant acido-résistant qui a montré son utilité sur le plan pratique. En effet, dans des expériences en terrains acides (pH 4,9) de Bretagne, où la culture de la luzerne n'a jamais pu se réaliser, l'inoculation par les souches M9Sm$_I^{Str}$ et I-5 ^{Str}, aprés chaulage léger, a permis d'obtenir des rendements convenables après deux coupes.

2 - Cultures de R. meliloti sur milieux empiriques.

Les tableaux 1 et 2 p.65-66 nous ont montré que les densités optiques maximales, aprés 3 jours de culture, en tubes et en flacons agités à 30°C, étaient surtout obtenues dans les milieux d'ISWARAN et T.Y. Comme nous l'avons dit précédemment la mesure de l'absorbance est certes très utile mais elle ne donne aucun renseignement sur la viabilité et l'intégrité des cellules bactériennes. Aussi avons nous entrepris l'étude des temps de génération des cultures de R. meliloti dans ces deux milieux et dans les milieux R.C., avec un inoculum important de façon à diminuer la phase de latence.

a) Etude du temps de génération.

Le matériel cellulaire nouvellement synthétisé est entièrement construit à partir du sucre, de la source d'azote, et des substances minérales présentes dans le milieu nutritif. Ainsi c'est leur aptitude à se multiplier rapidement qui permet aux bactéries de survivre. La vitesse de renouvellement métabolique des composants cellulaires varie d'une cellule à l'autre et d'un milieu à un autre.

Dans cette expérience, nous avons comparé le temps de génération des souches de R. meliloti dans les milieux R.C. T.Y. et d'ISWARAN.

La culture se fait en flacon de 500ml contenant 100ml de milieu, à la température de 30°C, sur une table d'agitation rotative.

L'inoculation est faite comme il a été décrit antérieurement. Les milieux contiennent au départ environ 1.10^7 bactéries par ml. Cet inoculum fort ne provoque pas de changement appréciable de pH dans ces milieux.

La croissance est suivie par numération des cellules viables en utilisant la technique à double couche sur milieu RCG fructosé.

Le temps de génération (T) est calculé suivant la formule :

$$T = \frac{(T_2 - T_I) \log.2}{\log.N_2 - \log. N_I}$$

où : $\log. N_2$: logarithme du nombre de bactéries au temps T2

$\log. N_I$: logarithme du nombre de bactéries au temps T1

$N_2 > N_I$

D'aprés le tableau 5 qui donne les résultats de cette étude nous constatons :

- que les milieux d'ISWARAN et T.Y. permettent d'obtenir des populations importantes de bactéries viables, plus abondantes que sur le milieu R.C fructosé.
- que le temps de génération en milieu T.Y. et d' ISWARAN sont assez semblables mais toujours inférieurs à ceux obtenus en milieu R.C.

SOUCHES	MILIEUX DE CULTURES COMPLETS					
	R.C.		I.		T.Y.	
	N	T	N	T	N	T
M I-5	I8,I	2,I	23,2	I,9	2I,I	2,0
M I-5^{Str}	27,6	2,4	48,I	2,I	3I,2	2,3
M5NI	24,2	3,0	53,2	2,8	36,3	2,8
M9S	3I,8	I,9	47,4	I,5	49,6	I,6
M9SmI^{Str}	II,4	2,3	44,3	I,7	32,2	I,6
AI45	I2,7	2,7	33,7	2,4	3I,4	2,5
AI6I	I4,3	2,6	3I,6	2,0	27,6	2,2
M20II	I7,2	2,2	43,5	I,8	3I,7	2,0
M20II^{Str}	24,I	2,5	46,I	I,7	30,2	2,3
M20IIS2	I2,5	2,4	42,8	I,7	35,9	I,7

TABLEAU : 5 : CULTURES DE RHIZOBIUM MELILOTI, EN MILIEUX COMPLETS LIQUIDES, EN FLACONS, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

légende : - N : Nombre de bactéries viables x 10^8 /ml (moyenne de 3 numérations) au temps T = 0 N = 10^7b/ml

- T : Temps de génération en heures .

- que l'ensemble des temps de génération en milieu d'ISWARAN est légèrement inférieur à celui obtenu sur milieu T.Y., sauf peut-être pour la souche M2OIIS2.

La comparaison de ces résultats avec ceux du tableau 2 montre qu'à une différence de D.O. donnée ne correspond pas nécessairement une différence analogue dans les temps de génération et dans les quantités de bactéries viables obtenues. Ceci est particulièrement vrai en milieu T.Y. Les densités optiques aprés 72 heures dans ce milieu sont parfois supérieures à celles des cultures sur milieu d'ISWARAN qui permet cependant d'obtenir une population plus importante de bactéries viables.

Pour vérifier ce fait nous avons suivi au biophotomètre la croissance de $M9SmI^{Str}$ dans ces mêmes milieux inoculés faiblement (IO^5b/ml).

La figure 8 représentant ces cultures montre bien une densité optique après 50 heures, plus élevée sur le milieu T.Y. (2,3) que sur le milieu d'ISWARAN (I,6). Cette différence ne se reflète pas dans les numérations des bactéries viables (T.Y. : 3,2 . IO^9b/ml , I : 4,4 . IO^9b/ml.

Notons que pour le milieu R.C. la D.O. est de I,5 pour une population viable de I,I IO^9b/ml.

Les phénomènes de transformations cellulaires en présence de doses relativement élevées d'acides aminés et d'extrait de levure, constatées par de nombreux auteurs dont SKINNER I977 (138) peuvent en partie expliquer ce phénomène. On peut aussi penser que le pourcentage de cellules lysées est beaucoup plus important en milieu T.Y.

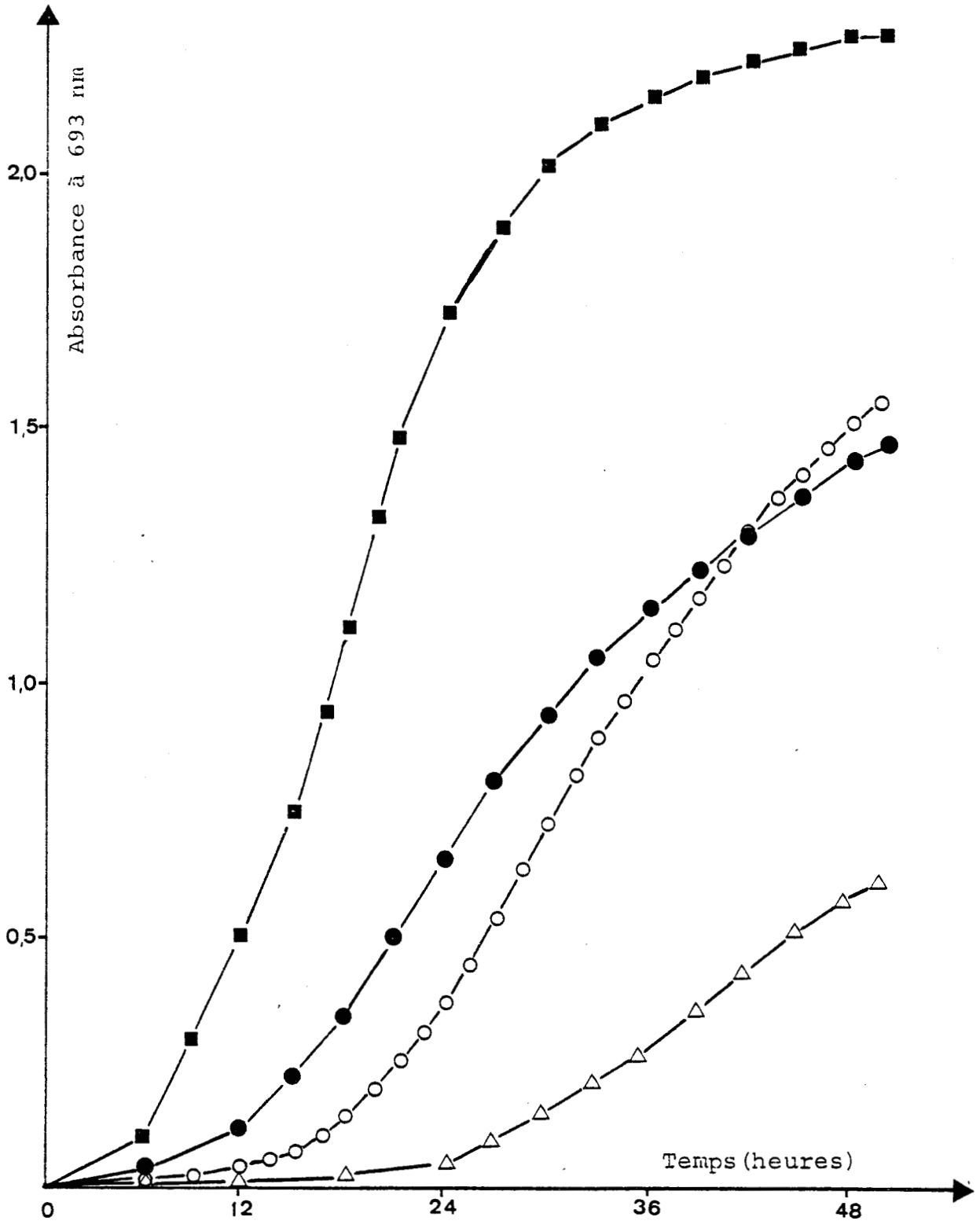


FIG. 8 : EVOLUTION DE LA CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, EN MILIEUX COMPLETS ET SYNTHETIQUES : (■) TY ; (○) ISWARAN ; (●) RC ; (△) R ; CULTURES SUIVIES AU BIOPHOTOMETRE I.N.S.E.R.M.

BUS LILLE

DATE I972 (3 2) montre que si la population totale de cellules augmente quand la dose d'extrait de levure croît , dans certaines limites,le nombre de cellules viables peut diminuer de façon trés appréciable avec certains extraits de levure;et ceci est vrai pour tous les Rhizobium.

Nous retenons donc le milieu d'ISWARAN pour la mise au point de la production de cellules de R. meliloti en milieu empirique.

b - Etude du milieu D'ISWARAN.

Par rapport au milieu T.Y. ce milieu se présente comme un milieu non peptoné,avec un taux d'extrait de levure inférieur, contenant deux sources de carbone :fructose (ou mannitol) et gluconate de potassium .

Ce milieu peut aussi se définir comme un milieu R.C. additionné de Ig/l d'extrait de levure, de I,5 g /l de gluconate,de $FeCl_3$ et de chlorure de sodium (voir tableau I p. 25).

Pour essayer de préciser l'importance de chacun des composants sur la croissance des Rhizobium dans ce milieu nous avons envisagé 3 types de cultures en flacons avec quelques souches de R.meliloti, dont $M9Sm_I^{Str}$

bl - Choix de la nature et de la dose de gluconate.

Des essais préliminaires nous ont montré que l'on pouvait remplacer indifféremment le gluconate de calcium du milieu originel d'ISWARAN par le gluconate de potassium ou de sodium beaucoup plus solubles.

NORRIS 1958 (104) avait déjà démontré, que pour 48 souches de Rhizobium appartenant à différents groupes d'inoculation, le calcium n'était pas indispensable alors que le magnésium l'est. De plus il est très difficile d'obtenir des milieux limpides avec le gluconate de calcium.

Nous avons donc retenu le gluconate de potassium pour la fabrication du milieu d' ISWARAN : la dose optimale trouvée est de 1,5 g/l comme dans le milieu d' origine .

b2 - Cultures de R. meliloti en milieux de base R.C, sans mannitol, supplémentés.

Dans les parties aliquotes de milieu de base R.C. contenant K_2HPO_4 :0,5 g/l , $MgSO_4$ $7H_2O$: 0,2 g/l, Extrait de levure (Y.E.) : 1g/l. nous avons ajouté séparément les autres composants pour obtenir finalement le milieu complet d'ISWARAN . Les cultures en flacons sont inoculées et incubées normalement.

Les résultats, obtenus pour la souche $M9Sm_1^{Str}$ (tableau 6) montrent que, dans nos conditions expérimentales :

1- l'addition de phosphate de potassium, ne modifie pas la croissance de cette souche.

2- l'augmentation de la quantité d'extrait de levure (1g à 2 g) améliore la croissance bactérienne.

MILIEU	COMPOSITIONS EN GRAMMES PAR LITRE	D.O. 72 à 600 nm
RC_O	K_2HPO_4 (0,5g/l)-$MgSO_4,7H_2O$ (0,2g/l)-YE (I g/l)	I,56
RC_I	RC_O + K_2HPO_4 (0,5g/l)	I,55
RC_2	RC_I + Y.E. (Ig/l)	2,26
RC_3	RC_I + K. gluconate (I,5 g/l)	I,74
RC_4	RC_3 + Y.E. (Ig/l)	2,76
RC_5	RC_4 + $FeCl_3$ (0,0I g/l)	2,76
RC_6	RC_5 + NaCl (0,I g/l)	2,70
RC_7	RC_6 + K_2HPO_4 (0,5 g/l)	2,70
TEMOINS	ISWARAN sans mannitol	2,68
	ISWARAN + mannitol (IO g/l)	5,04
	T.Y.	4,74
	R.C.M.	3,I2

TABLEAU 6 : CULTURES DE R. MELILOTI M9SmI^{Str}, DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE R.C. , SANS MANNITOL, SUPPLEMENTES, , APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

légende - Y.E. : Extrait de levure; R.C: milieu R.C.

- T.Y. : milieu T.Y.; M : mannitol

3- l' addition conjointe de gluconate et d'extrait de levure est nécessaire pour permettre l'amélioration de la croissance.

4- les chlorures de fer et de sodium ne provoquent aucune amélioration de la croissance sur cette souche.

5- un excés de potassium dans le milieu complet ne modifie pas les résultats de façon appréciable.

6- la source de carbone essentielle, ici le mannitol, provoque une nette amélioration des cultures.

7- le milieu d'ISWARAN, sans source de carbone autre que le gluconate de potassium et l'extrait de levure, permet d'obtenir une croissance presque équivalente à celle obtenue sur le milieu R.C.

b3 - Cultures de R. meliloti en milieux de base ISWARAN supplémentés.

Dans une autre expérience, à des parties aliquotes de milieu d'ISWARAN ne contenant ni gluconate, ni mannitol, ni extrait de levure, (milieu de base I.B.), nous avons ajouté ces composants comme il est indiqué dans le tableau suivant.

Les cultures, en flacons, sont inoculées et incubées comme habituellement. Les résultats obtenus pour la souche M9SmI^{Str} (tableau 7) confirment les remarques précédentes.

	MILIEU	COMPOSITION EN GRAMMES PAR LITRE	D.O.$_{72}$ à 600nm
1	IB	K_2HPO_4 (0,5g/l)-$MgSO_4$,$7H_2O$ (0,2g/l)-NaCl (0,Ig/l) $FeCl_3$ (0,0Ig/l)	0,I4
2	IB.G	(I) + K- gluconate (I,5 g/l)	0,08
3	IB.GM	(2) + mannitol (I0g/l)	0,09
4	IB.Y	(I) + Yeast Extract (2)	2,60
5	IB.YM	(4) + mannitol	4,75
6	IB.YG	(4) + K. gluconate (I,5g/l)=ISWARAN sans mannitol	3,00
7	IB.YGM	(6) + mannitol = ISWARAN + mannitol (I0g/l)	5,70
TEMOINS	T.Y.		4,74
	R.C.M.		3,I2

TABLEAU 7 : CULTURES DE R. MELILOTI M9SmI^{Str}, EN FLACONS, DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE ISWARAN SUPPLEMENTES, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

légende : Y = extrait de levure ; RC = milieu RC ; TY= milieu TY
M = mannitol ; IB = milieu d'ISWARAN de base
G = gluconate de K

BUS LILLE

Ici aussi les meilleurs résultats sont obtenus avec le milieu contenant à la fois IOg/l de mannitol , I,5g /l de gluconate de potassium et 2g/l d'extrait de levure. Si nous connaissons bien l'action du mannitol et de l'extrait de levure nous ignorons le mode d'action du gluconate, dans nos conditions expérimentales.

Il est probable que le gluconate favorise la synthèse d' A.T.P. Cette action s'effectuerait par l'intermédiaire de la glucose deshydrogénase liée à une chaîne d'oxydation cellulaire, au niveau de la membrane(communication personnelle J.P. HORNEZ). La même hypothèse a été tout récemment émise par MATSUSHITA I979 (87) chez le genre Pseudomonas.

3 - Cultures de *Rhizobium meliloti* en milieux synthétiques.

L'utilisation de milieux complexes pour l'obtention de cellules bactériennes est souvent une solution valable, mais pour des études de métabolisme par exemple, il y a lieu d'utiliser un milieu de composition parfaitement connue. Les travaux portant sur le genre *Rhizobium* n'échappent pas à ces impératifs de recherche pure.

La production en grande quantité de ces bactéries pour les besoins de l'agriculture exige aussi un milieu bien défini et équilibré afin que l'on obtienne, d'une manière reproductible, le maximum de cellules dans un état physiologique parfait.

Comme nous l'avons déjà dit il n'est pas facile de trouver un milieu synthétique qui permet un bon développement et une bonne survie de toutes les souches de *Rhizobium*, même pour les souches de *R. meliloti*. COURTOIS 1975 (29) remarque qu'avec la souche M5NI et sur le milieu R fructosé, la phase de latence est longue, la population bactérienne finale et la production de polyosides toujours faibles. Après quelques repiquages sur ce milieu simple les souches de *R. meliloti* ne se développent plus de façon satisfaisante, ce qui prouve bien que d'autres constituants sont nécessaires.

Notre dessein, dans ce présent travail, n'est pas de mettre au point un nouveau milieu synthétique mais d'essayer de trouver, parmi ceux décrits par les auteurs, celui qui nous permettra d'obtenir rapidement de fortes densités bactériennes avec des souches de *R. meliloti* utilisables pour l'inoculation de la luzerne.

a) Recherche du milieu synthétique le plus favorable pour R. meliloti.

Les sept milieux de culture que nous avons essayés , répartis en tubes et en flacons, sont ensemencés comme nous l'avons vu plus haut. Aux différentes souches de R. meliloti déjà utilisées nous avons ajouté la souche M I - 5 ^{Str}.

L'inoculum important permet d'obtenir une population de départ de l'ordre de 10^7 bactéries par ml . L' incubation est réalisée en agitation à 30°C. Les cultures sont appréciées par simple observation optique du trouble toutes les 24 heures et par mesure de l'absorbance à 600 nm après 72 heures.

Des essais préliminaires nous ont montré que la densité optique optimale (D.O. max.) était également obtenue après 3 jours d'incubation , avec l'ensemble des souches utilisées, ceci dans nos conditions expérimentales.

Les résultats des cultures en tubes, rassemblés d'une manière simple dans le tableau 8 nous montrent que :

I°) les milieux permettant d'obtenir les cultures les plus abondantes, pour la majorité de nos souches, sont les milieux de RIGAUD (RI) , de SHERWOOD (SY) , et le milieu R.
Sur les milieux de PEDROSA et de FERRY les souches de R. meliloti se développent mieux que sur les milieux M_{9A} et M.O.P.S.

SOUCHES	MILIEUX DE CULTURE SYNTHETIQUES						
	FBO	RI	SY	R	M9A	MOPS	P
MI-5	+	++	++	+	±	±	±
MI-5 Str	±	+	++	+	-	-	±
M5NI	±	+	++	+	-	±	±
M9S	±	+	++	+	±	±	±
M9SmI Str	±	+	+	+	-	-	±
AI45	+	++	+	+	-	±	±
AI6I	+	++	+	+	±	±	±
M200I	±	+	+	+	-	-	±
M20II Str	±	+	±	±	-	-	±
M20IIS2	±	+	+	±	-	-	±

TABLEAU 8 : CULTURES DE RHIZOBIUM MELILOTI EN MILIEUX SYNTHETIQUES, EN TUBES, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

légende : - croissance peu différente du temps T=0 (env. 10^7 b/ml)

± culture assez dense (comprise entre 10^7 et 5.10^8 b/ml)

+ culture dense, supérieure à l'inoculum (env. 10^9 b/ml)

++ culture très dense (supérieure à 5.10^8 b/ml)

BUS LILLE

2°) que les cultures sur milieux synthétiques sont beaucoup moins importantes que celles obtenues sur les milieux complets, fait reconnu par de nombreux auteurs (28_34_122_). L'utilisation de tels milieux pour la production en masse en vue de l'inoculation paraît difficilement envisageable.

Dans le tableau 9 figurent les mesures d'absorbance à 600nm. et du pH après 72 heures d'incubation dans les 3 milieux synthétiques donnant les meilleurs résultats,cultures effectuées cette fois ci en flacons de façon à se rapprocher davantage des conditions de culture en fermenteur. D'après ce tableau les pH des cultures de 3 jours dans les 3 milieux testés restent assez proches de la neutralité. Il faut quand même remarquer une légère alcalinisation dans les milieux de RIGAUD et SHERWOOD et une faible acidification en milieu R . Le milieu de RIGAUD est le mieux tamponné.

Les résultats trés voisins obtenus dans les milieux de RIGAUD et de SHERWOOD d'une part,la comparaison des formules de ces milieux à celle du milieu R. d'autre part,nous ont conduit à étudier au plus vite la nature de la source d'azote; ceci avant même de connaître les temps de génération et les rendements cellulaires pouvant être atteints.

Pour RIGAUD 1965 (122) les cultures varient en fonction de la nature minérale ou organique de l'apport d'azote. Il note que les sels des acides glutamique et aspartique,comme l'avait déjà signalé BERGERSEN 1961 (7) donne des résultats supérieurs au sulfate d'ammonium et au nitrate de potassium.

SOUCHES	MILIEUX DE CULTURE SYNTHETIQUES.					
	R.		R.I.		S.Y.	
	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
MI-5	I,5	6,4	2,3	7,2	2,5	7,6
MI-5 Str	I,I	6,5	I,8	7,2	2,I	7,5
M5NI	I,2	6,3	I,9	7,0	2,2	7,5
M9S	I,7	6,7	I,9	7,4	2,I	7,7
M9SmI Str	I,6	6,8	I,7	7,5	I,6	7,5
AI45	I,4	6,6	2,0	7,I	I,8	7,9
AI6I	I,6	6,9	2,2	7,2	I,9	7,6
M200I	I,3	6,7	I,6	7,3	I,2	7,4
M20II Str	0,9	6,6	I,3	7,5	I,0	7,7
M20IIS2	0,9	6,8	I,5	7,3	I,3	7,I

TABLEAU 9 : MESURE DE L'ABSORBANCE A 600 nm ET pH DE CULTURES DE RHIZOBIUM MELILOTI , EN MILIEUX SYNTHETIQUES, EN FLACONS, APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

Néammoins les courbes de croissance obtenues dans ce milieu ne sont pas exactement superposables à celles obtenues avec des milieux complets. BERINGER 1974 (10)doit modifier le milieu de SHERWOOD pour l'adapter aux cultures de R. leguminosarum . Il l'utilise en remplaçant le sucre par le succinate de sodium et en l'enrichissant encore en vitamines.

JOHNSTON 1975 (69) doit aussi supplémenter ce milieu en acides aminés, en adénine, et en uracile pour la croissance de souches auxotrophes de R. leguminosarum.

Nous avons retenu le milieu R pour la poursuite de nos travaux pour les raisons que nous venons de citer, mais aussi parce qu'il est très utilisé dans le laboratoire et qu'il a besoin d'être amélioré. Notre but est donc maintenant de le modifier de façon à obtenir sur ce milieu une production de R. meliloti , et si possible des autres Rhizobium ,identique ou proche de celle obtenue en milieux complets.

b) Influence de la nature de la source d'azote pour la culture de R. meliloti en milieu synthétique.

C'est l'azote minéral qui semble avoir été le plus souvent employé sous forme nitratée (NORRIS (104)) ou ammoniacale (WEST et WILSON (167) FERRY (46))ou même en combinant les deux sels (LOWE et EVANS(78)).

Les sources organiques d'azote utilisées ont été essentiellement les acides glutamique et aspartique (PEDROSA (112)) et leurs sels de sodium ou de potassium (BERGERSEN(7)), RIGAUD(122),SHERWOOD(134).

Après quelques essais avec les acides glutamique et aspartique nous avons renoncé à les utiliser en raison des changements importants de pH qu'ils provoquent . Nous avons préféré nous servir de leurs sels.

Dans notre expérimentation l'azote est apporté, dans chaque série de cultures, à partir de composés minéraux ou organiques à,une concentration finale de I g/ l .

Suite aux travaux de RATCLIFFE I978 (119) montrant l'instabilité thermique de la glutamine , ces sources azotées sont préparées,stérilisées par filtration et ajoutées stérilement au moment de l'emploi au milieu R fructosé sans nitrate d'ammonium.

Nous avons donc préparé I6 milieux contenant comme source azotée les composés suivants :

I - Néant
2 - Nitrate d'ammonium
3 - Nitrate de potassium
4 - Nitrate de sodium
5 - Chlorure d'ammonium
6 - Sulfate d'ammonium
7 - Carbonate d'ammonium
8 - Phosphate monoammonique
9 - Phosphate diammonique
IO - Acetate d'ammonium
II - Citrate d'ammonium
I2 - Aspartate de sodium
I3 - Glutamate de sodium
I4 - Glutamate de potassium
I5 - Glutamate de sodium + Gluconate de potassium(I g/l)
I6 - Extrait de levure

Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de changement très appréciable du pH après addition du composé azoté.

SOUCHES	MILIEU R FRUCTOSE A I % + SOURCE D'AZOTE A O,I%															
	I*	2	3	4	5	6	7	8	9	IO	II	I2	I3	I4	I5	I6
MI-5		+	+	±		±	-	-	±	-	-	+	++	++	++	++
MI-5 Str		+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
M5NI		+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
M9S		+	±	±	±	+	-	±	±	-	-	+	++	++	++	++
M9SmI Str		+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
AI45		+	+	+	±	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
AI6I		+	±	-	±	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
M200I		+	±	-	-	±	-	±	±	-	-	+	++	++	++	++
M20II Str		±	±	+	-	±	-	-	±	-	-	+	++	++	++	++
M20IIS2		±	±	-	-	±	-	±	±	-	-	+	++	++	++	++

TABLEAU 10 : CULTURES DE R. MELILOTI SUR MILIEU SYNTHETIQUE R. FRUCTOSE A I% ,EN PRESENCE DE DIFFERENTES SOURCES D'AZOTE A O,I %,EN TUBES,APRES 72 HEURES D'AGITATION A 30°C.

Légende : - : croissance peu différente du temps T = O

± : croissance faible par rapport au temps T = O

+ : culture dense supérieure au temps T = O

++: culture très dense

* : voir texte p. 95

BUS LILLE

Les résultats obtenus avec les cultures de R. meliloti effectuées en tubes, inoculées et incubées comme habituellement , sont portés dans le tableau 10

La croissance,en présence de glutamate de sodium et de potassium, est très satisfaisante pour toutes les souches; elle est supérieure à celle obtenue avec l 'aspartate de sodium. Notons que l'addition de gluconate de potassium dans le milieu contenant le glutamate ne semble pas augmenter la croissance .

Les essais réalisés avec le nitrate, le chlorure et le sulfate d'ammonium montrent que si la croissance est possible elle n'est pas optimale après 72 heures de culture.

Le carbonate,l'acétate et le citrate d'ammonium ne permettent pas d'obtenir des cultures appréciables,même après 7 jours.

Avant d'adopter pour notre milieu le glutamate de sodium nous avons voulu rechercher si la dose était optimale et si d'autres sels de l'acide glutamique et de l'acide aspartique,ainsi que les amides de ces acides,n'amélioreraient pas cette croissance.

c) Influence de la quantité d'azote pour la culture de R. meliloti en milieu synthétique

Des quantités croissantes 0,5 - I et 2 g/l de glutamate et d'aspartate de sodium,de potassium et d'ammonium,d'asparagine et de glutamine, sont introduites dans les cultures. Pour des facilités de représentatation, nous avons tracé sur la fig. 9 p. 98 que les courbes les plus significatives pour la souche $M9Sm_1^{Str}$.

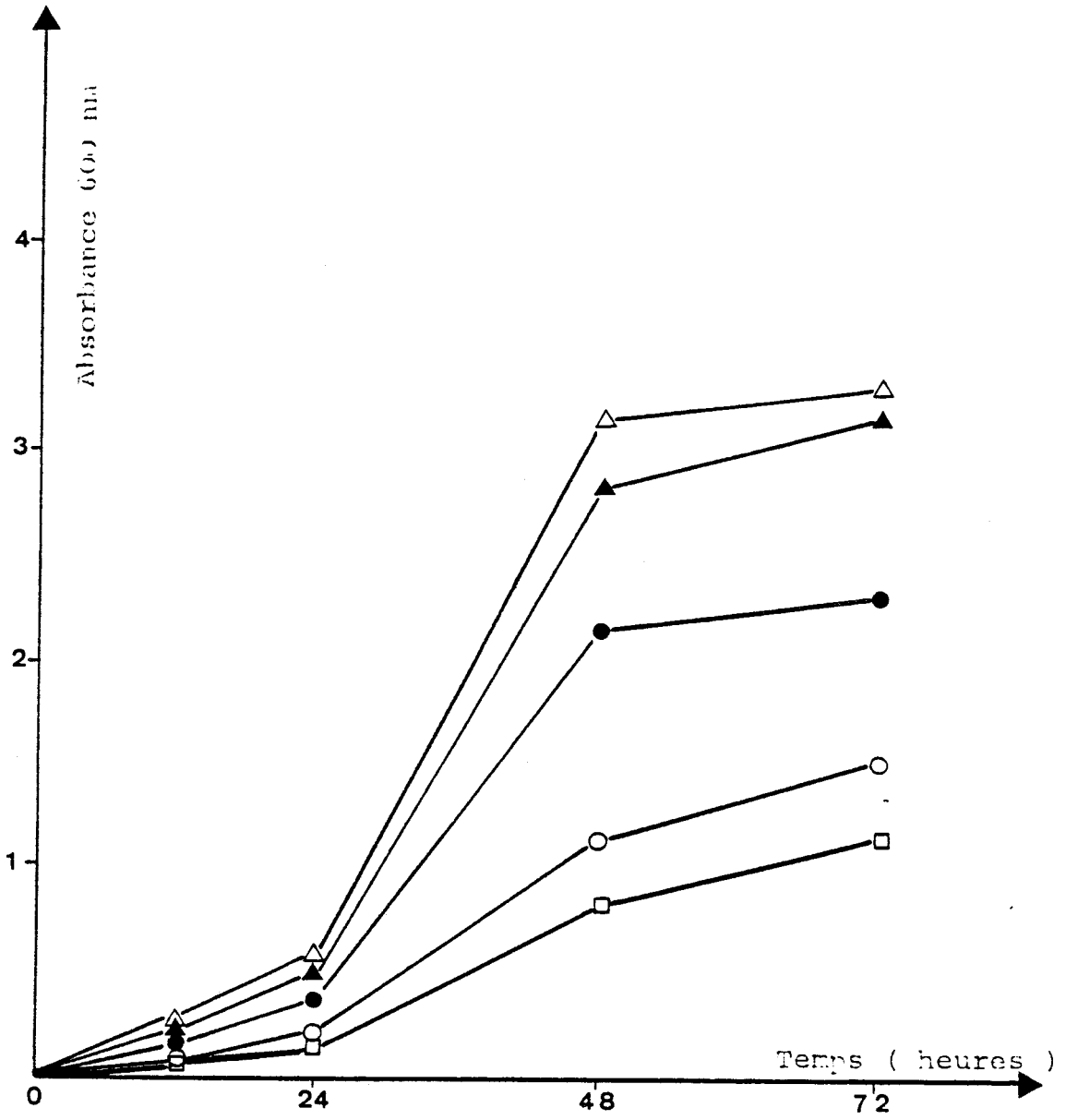


FIG.9 : INFLUENCE, SUR LA CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, EN MILIEU SYNTHETIQUE R.S. FRUCTOSE, DE LA SOURCE D'AZOTE : (△) GLUTAMINE I‰ ; (●) GLUTAMATE DE SODIUM I‰ ; (▲) GLUTAMATE DE SODIUM 2‰; (○) ASPARAGINE I‰ , (□) ASPARTATE DE POTASSIUM I‰ .

BUS LILLE

Les résultats sont très voisins avec les souches M I - 5^{Str} et 20II^{Str} . Il semble donc que l'on puisse utiliser le glutamate de sodium à 2 g / l .

La glutamine à I ‰ semble donner des résultats supérieurs au glutamate à 2 ‰ pour 20II ^{Str}, mais les méthodes de mesures utilisées nous permettent pas d'affirmer que les différences observées sont significatives .

Nos résultats paraissent en parfait accord avec BERGERSEN (7), RIGAUD (122), et confirment que le glutamate de sodium est une excellente source d'azote pour R. meliloti ; DELATTRE I97I (34) n'est pas tout à fait de cet avis, pour la souche M5NI .

Pour des raisons d'économie, de facilité de solubilisation , et de stabilité thermique, nous avons préféré utiliser le glutamate de sodium à 2 ‰ , ce qui correspond à I60 mg d'azote par litre de milieu.

BUS LILLE

d) Influence de la nature de la source carbonée pour la culture de R. meliloti en milieu synthétique.

Suite aux travaux de COURTOIS (28.29) et HORNEZ (61.62) , il nous a paru intéressant, dès le début de ce travail de travailler avec le fructose comme substrat carboné, ceci de façon à supprimer la formation des produits acides (acide2-céto gluconique avec le glucose) amenant un abaissement brutal du pH préjudiciable à la croissance.

Pour ces auteurs le fructose facilite le démarrage immédiat des synthèses bactériennes et favorise ainsi la division cellulaire. De plus c'est un substrat carboné qui assure à R. meliloti une croissance comparable à celle obtenue avec le glucose. Contrairement à ce qui se produit avec le glucose, le fructose donne une synthèse de polyosides notable. R meliloti oxyde une partie de ce substrat en dioxyde de carbone et en eau, le complément étant dirigé vers la voie de biosynthèse. Nous avons toujours constaté que lors de la dégradation du fructose par R. meliloti le pH des milieux d'incubation se maintenait bien aux environs de la neutralité.

Néanmoins nous avons voulu comparer les cultures de $M9Sm_1^{Str}$ et $2OII^{Str}$, en présence de substrats carbonés tels que le fructose, le glucose, le dulcitol, le sorbitol, l'arabinose, le saccharose, le mannitol et le glycérol, tous à la concentration finale de I% .

D'après la fig.10 qui représente l'évolution de la croissance et du pH pour R. meliloti $M9Sm_1^{Str}$, il apparaît que la meilleure vitesse de croissance et la D.O. maximale soient obtenues indifféremment avec le fructose, le glucose ou le mannitol. L'arabinose, le sorbitol et la saccharose permettent aussi des croissances convenables. Pour les deux souches étudiées les résultats sont analogues.

On remarquera également que le glutamate de sodium peut-être utilisé comme seule source de carbone par cette souche.

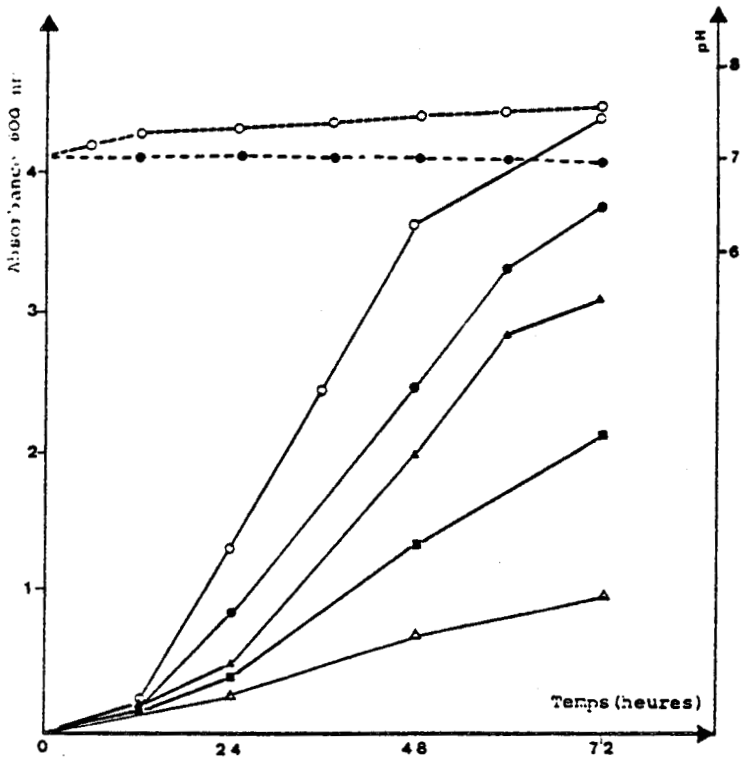


FIG.10 EVOLUTION DE LA CROISSANCE (——) ET DU pH (- - -) DES CULTURES DE R. MELILOTI $M_0Sm_1^{Str}$ SUR MILIEU R.S. EN PRESENCE DE 1% DE SOURCES CARBONEES : (o) FRUCTOSE, MANNITOL ; (●) SACCHAROSE ET GLUCOSE; (▲) ARABINOSE; (■) SORBITOL,DULCITOL, GLYCEROL ; (△) SANS SOURCE CARBONEE.

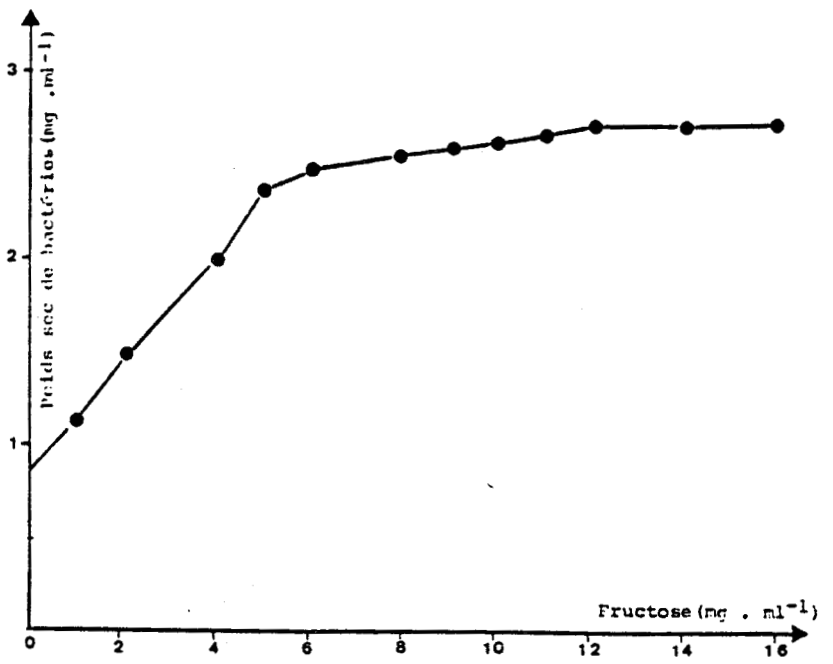


FIG.11 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FRUCTOSE SUR LE RENDEMENT EN CELLULES DE R. MELILOTI $M_0Sm_1^{Str}$, EN MILIEU R.S. APRES 72 HEURES DE CULTURE AGITEE A 30°C.

Enfin, la faible évolution du pH pour tous les substrats montre que notre milieu est bien tamponné, ce qui facilitera son utilisation en fermenteur.

e) Détermination de la quantité de fructose à apporter dans le milieu de culture .

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans les cellules bactériennes, 50% environ, alors que la teneur en azote varie entre 3 et I5 % . C'est donc la source de carbone qui représente la plus grande part du milieu de culture.

Pour éviter un prix de revient élevé il est nécessaire d'employer un substrat carboné relativement bon marché et de déterminer la quantité suffisante et nécessaire pour obtenir, en culture discontinue, un rendement cellulaire optimal.

Des quantités croissantes de O à I6g/l de fructose ont été introduites dans des cultures en flacons, ensemencées puis incubées dans nos conditions habituelles. Les résultats (fig 11) montrent qu'il est souhaitable d'utiliser 5 à IO g de fructose par litre de milieu pour obtenir une biomasse optimale.

f) Exigences en vitamines de la souche $M9Sm_I^{Str}$.

Le rôle de la biotine et de la thiamine sur la croissance de R. meliloti a été mis en évidence par de nombreux auteurs. WILSON I939 (170) précise que si la croissance est possible sans vitamine ,l'apport de biotine est nettement améliorante. FERRY I959 (46) montre que la biotine est le seul facteur indispensable à la croissance d'une souche S_{22} .

Dans une étude plus générale GRAHAM I963 (50) trouve que sur 63 souches de Rhizobium appartenant à différents groupes d'inoculation 35 exigent au moins une vitamine pour leur croissance; sur 23 souches de R. meliloti, 9 seulement ont besoin de biotine.

En fait, si le rôle de la biotine semble être prépondérant, cette vitamine peut-être considérée comme indispensable ou seulement stimulante selon la souche utilisée.

Nous avons mis en culture dans les conditions habituelles, nos trois souches dans le milieu sans vitamine. La croissance est très faible (fig. 12) après 72 heures. La croissance et la densité optique sont notablement améliorées dans le milieu additionné de IO µg/ l de biotine. Un apport croissant de cette vitamine ne conduit pas à une amélioration sensible des résultats .

La croissance obtenue après rapport simultané de thiamine (500 µg/l et de biotine (IO µg/l) est particulièrement bonne pour la souche $M9Sm_1^{Str}$. Dans d'autres essais nous avons obtenu des résultats analogues pour la souche $20II^{Str}$; l'effet favorisant semble moins net pour la souche $M\ I\ -5^{Str}$.

Il est intéressant de noter à ce sujet que le lot d'extrait de levure (Yeast extract Difco 633I26) que nous avons utilisé dans nos milieux complets apporte une quantité de biotine voisine de 4 µg/ g et une quantité de thiamine proche de IOO µg/ g .

Nous maintenons donc ces concentrations dans notre milieu pour la poursuite de nos travaux.

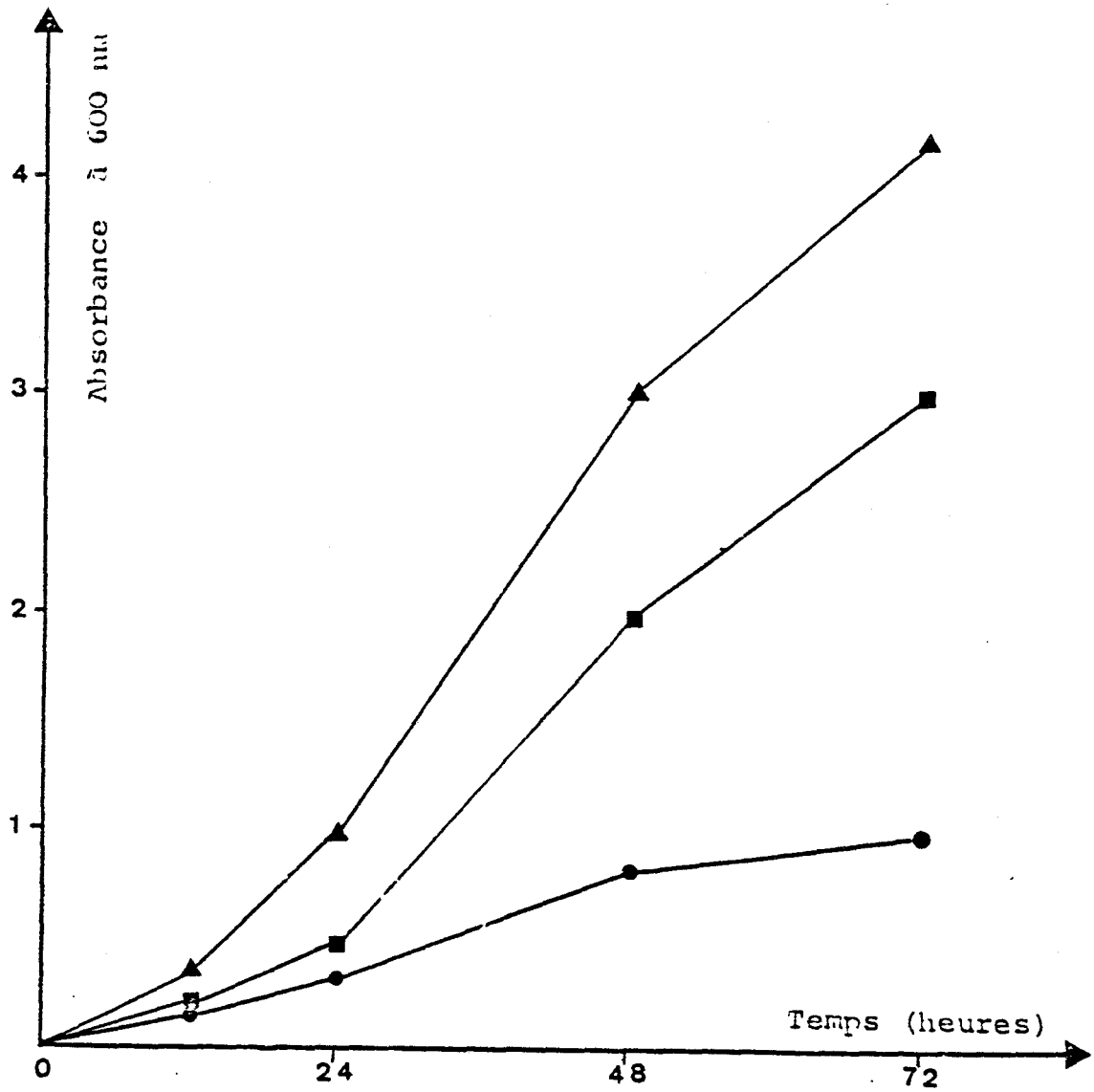


FIG.12 : INFLUENCE DES VITAMINES SUR LA CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, EN MILIEU SYNTHETIQUE R. FRUCTOSE .
(●) MILIEU SANS VITAMINES; (■) MILIEU AVEC BIOTINE (IO µg/l); (▲) MILIEU AVEC BIOTINE (IO µg/l) ET THIAMINE (500 µg/l).

BUS LILLE

4. Synthèse et conclusion

Tous nos essais aboutissent à définir comme suit un milieu de culture entièrement synthétique pour R. meliloti.

Nous l'appelerons R.S. (Rhizobium synthétique), sa composition par litre d'eau distillée est la suivante :

HK_2PO_4 (MERCK)	0,5	g
$MgSO_4$, $7H_2O$ (MERCK)	0,2	g
Glutamate de sodium (ORSAN)	2,0	g
Fructose (ROQUETTE)	IO,O	g
Biotine 5(ROCHE)	IO^{-5}	g
Thiamine HCl (ROCHE)	$5.IO^{-4}$	g

pH final à 25°C 7,2

Pour apprécier la valeur de ce milieu il convient d'abord de comparer les rendements en cellules viables qu'il est capable de produire avec ceux obtenus en milieux complets. Nous envisagerons ensuite l'étude de la validité vis-à-vis de quelques souches de R. meliloti .

Ces travaux de synthèse ont tous été effectués au biophotomètre avec un inoculum faible de l'ordre de IO^5 bactéries/ml.

a) Comparaison de la culture de R. meliloti en milieux complets et synthétiques.

Nous avons comparé les cultures des souches $M_9Sm_1^{Str}$, $2OII^{Str}$, M I - 5 ^{Str} obtenues sur ce milieu avec celles que donnent les milieux complets RC ,TY et d' ISWARAN , et le milieu synthétique R. couramment utilisé dans notre laboratoire.

Le tableau 11 donne les résultats (moyenne de deux cultures) pour $M_9Sm_1^{Str}$.

Les cultures ont été semblables pour les deux autres souches.

Ces résultats montrent que notre milieu RS est convenable. La croissance qu'il permet d'obtenir est beaucoup plus importante que sur le milieu R. fructosé et se montre même supérieure à celle obtenue sur milieu RC.

Pour la souche $M_9Sm_1^{Str}$ la croissance n'est pas exactement identique à celle obtenue avec les milieux complets T.Y. et d'ISWARAN. Il n'en reste pas moins que la quantité de bactéries obtenue après 48 heures,dans nos conditions expérimentales, est voisine de 2,5 x IO^9 bactéries /ml .

b) Validité du milieu synthétique R.S. pour la culture de R. meliloti.

Pour apprécier la validité de notre milieu nous avons comparé la croissance de IO souches de R. meliloti , au moyen du biophotomètre I.N.S.E.R.M.

MILIEUX	$D.O._{693}$	N x IO^9b/ml	P mg/ml	T heures	pH final
R.	0,6	0,53	I,26	4,64	6,8
R.S.	I,88	2,5I	2,62	I,68	7,7
ISWARAN	I,63	4,43	2,95	I,70	7,0
T.Y.	2,40	3,22	3,I4	I,6I	8,2
R.C. Fru.	I,54	I,I4	2,2I	2,37	6,8

TABLEAU 11 : CULTURES DE R. MELILOTI $M9Sm_I^{Str}$, AU BIOPHOTOMETRE, EN MILIEUX COMPLETS ET SYNTHETIQUES, APRES 48 HEURES D'AGITATION A 30°C .

légende : $D.O._{693}$: densité optique à 693nm
N : nombre de bactéries viables x IO^9/ml
P : poids sec des bactéries en mg/ml
T : temps de génération en heures.

SOUCHES	$D.O._{693}$	P mg/ml	SOUCHES	$D.O._{693}$	P mg/ml
MI5	I,74	2,4I	AI45	I,65	2,3I
$MI5^{Str}$	I,42	2,05	AI6I	I,92	2,76
M5NI	I,57	2,34	M200I	I,54	2,24
M9S	2,0I	3,07	$M20II^{Str}$	I,2I	I,68
$M9Sm_I^{Str}$	I,88	2,62	$M20IIS_2$	I,33	I,80

TABLEAU 12 : CULTURES DE R. MELILOTI EN MILIEU SYNTHETIQUE R.S., SUIVIES AU BIOPHOTOMETRE, RESULTATS OBTENUS APRES 48 HEURES D'AGITATION A 30°C.

légende : $D.O._{693}$: densité optique à693 nm
P. mg/ml : poids sec des bactéries en mg/ml

Le tableau 12 donne la moyenne des résultats pour deux cultures de chaque souche effectuées dans les mêmes conditions.

Ces résultats montrent que ce milieu est utilisable pour la production de cellules des différentes souches de R. meliloti testées. Le poids sec des bactéries obtenues après 48 heures de culture, dans ces conditions de laboratoire, est voisin de 2 à 3 mg/ml.

Les rendements plus faibles pour 20II ^{Str} et 20IIS2 correspondent à des taux de croissance moins élevés pour ces deux souches.

c) Discussion et conclusion.

Pour obtenir des rendements acceptables en cellules vivantes de Rhizobium, et en particulier de R. meliloti, nos essais de laboratoire nous ont conduit à retenir les milieux d'ISWARAN et TY. comme milieux complets, et le milieu R.S. comme milieu synthétique.

Ces trois milieux nous ont permis d'obtenir des quantités de bactéries supérieures à celles obtenues dans les milieux complets (R.C., Y.E.M.) et synthétiques (R., SY.) plus couramment utilisés dans les laboratoires.

Il faut remarquer que, dans l'ensemble, la croissance de R. meliloti dans le milieu synthétique que nous préconisons s'accompagne d'une production peu importante de polysaccharides par rapport aux milieux d'ISWARAN et R.C. (0,7 à I,25 mg/ml).

De plus dans ce milieu, nous n'avons jamais observé à l'examen microscopique, de formes " anormales " ressemblant à des bactéroïdes.

Pour choisir le milieu le mieux adapté à notre problème de production de bactéries en grande quantité nous envisageons, maintenant de rechercher les conditions physiques optimales de la culture dans le milieu R.S. Nous pensons que l'utilisation d'un milieu de composition parfaitement connue, équilibré, et surtout reproductible, est souhaitable aussi bien pour les besoins de l'agriculture que pour les études de laboratoire, à condition bien entendu, d'obtenir des rendements satisfaisants.

Néanmoins il sera nécessaire de poursuivre ces travaux de synthèse, effectués au laboratoire, par l'étude comparative des cultures dans ces trois milieux, au stade de la production de cellules en fermenteur.

B RECHERCHE DES CONDITIONS PHYSIQUES OPTIMALES POUR LA PRODUCTION DE CELLULES DE R. MELILOTI EN MILIEU SYNTHETIQUE.

Après avoir passé en revue les principaux facteurs chimiques pouvant intervenir sur la croissance de R. meliloti $M9Sm_I^{Str}$ dans le milieu synthétique RS, et avant d'entreprendre la mise au point de la production des cellules en fermenteur, il est nécessaire d'étudier les facteurs physiques les plus importants.

Nous essayerons, pour des cultures effectuées en fiole, de fixer successivement :

- l'importance de l'inoculum de départ.
- la température optimale de croissance.
- le pH initial du milieu de culture.

Enfin nous envisagerons le rôle important que peuvent avoir l'aération et l'agitation de la culture sur la quantité de cellules viables produites, cette étude ne peut-être envisagée que dans des cultures effectuées en fermenteur.

I. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'INOCULUM.

Il est bien connu depuis les travaux de MONOD 1942 (91) que la phase de latence d'une culture bactérienne est toujours plus longue avec des ensemencements faibles. La rapidité de production de cultures denses, surtout en milieu synthétique, dépend donc beaucoup de l'importance de l'ensemencement de départ.

Si la taille de l'inoculum influe grandement sur la durée de la phase de latence,elle n'intervient pas sur le taux de la croissance (I36,I37).

Pour essayer de déterminer l'importance de l'inoculum pour les fermentations,nous avons effectué des cultures de $M_9Sm_1^{Str}$ en erlenmeyer de 750 ml contenant 250 ml de notre milieu R.S.

Les milieux amenés au préalable à la température de 30°C, sont ensemencés avec des inoculums d'importance croissante. Ceux-ci sont préparés par dilutions à partir d'une culture de 24 heures en milieu R.S. contenant environ I,8 . IO^7 b/ml en pleine phase exponentielle.

Les effets de l'inoculum sur la croissance et la viabilité de Rhizobium sont évalués par mesure de la densité optique et par numération des cellules viables.

Les résultats (fig.13) montrent que la durée de la phase de latence est inversement proportionnelle à l'importance de l'inoculum . Dans nos conditions expérimentales la culture au départ ne doit pas contenir moins de IO^7 cellules viables par ml . Nous avons vérifié qu'un inoculum aussi important, introduit dans notre milieu synthétique, ne provoquait aucune modification appréciable du pH .

La réduction du temps de latence correspondant à une augmentation d'un facteur IO de la taille de l'inoculum (L_{IO} de SHIDA (136 -137) est d'environ 2 heures.

Une inoculation importante réduit donc le temps qu'il faut pour obtenir le maximum de cellules viables mais diminue aussi les chances de voir s'installer une contamination.

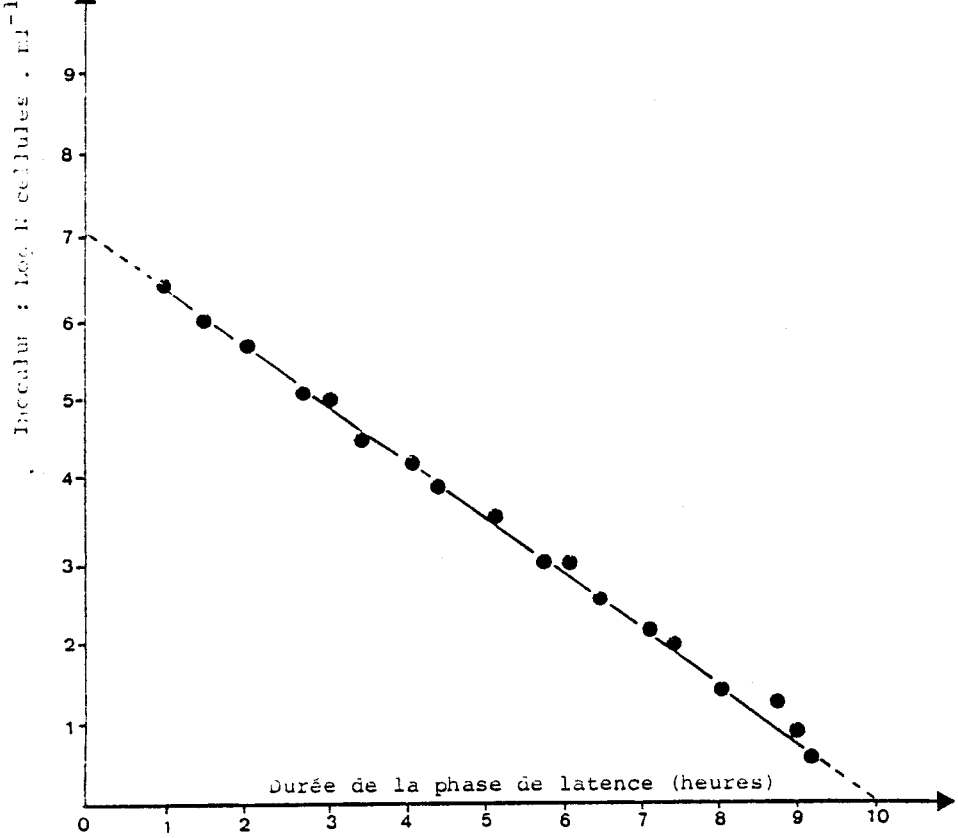


FIG. 13 : CULTURES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ EN MILIEU R.S. FRUCTOSE A 1%. RELATION ENTRE L'IMPORTANCE DE L'INOCULUM ET LA DUREE DE LA PHASE DE LATENCE.

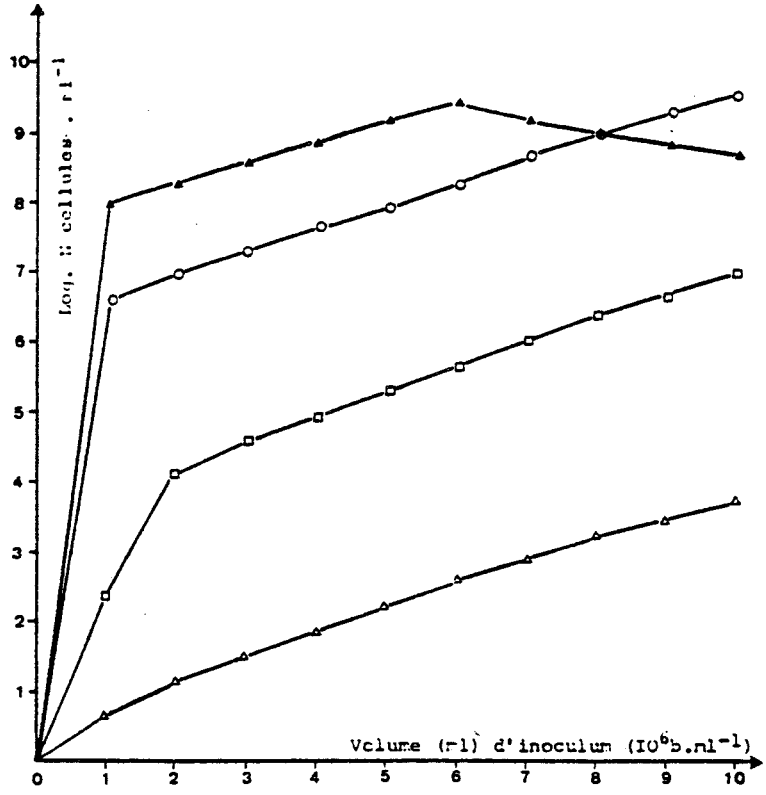


FIG. 14 : RELATION ENTRE LE NOMBRE DE CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ OBTENUES APRES 12 (▲), 24 (□), 48 (○), 72 (△) HEURES DE CULTURE EN MILIEU R.S. FRUCTOSE, EN FONCTION DE L'IMPORTANCE DE L'INOCULUM.

BUS LILLE

Un inoculum contenant plus de 0,8 . 10^7 bactéries/ml n'augmente pas considérablement le nombre de cellules viables obtenues (fig. 14) . Par ailleurs nous avons trouvé des résultats très voisins pour les souches M I-5^{Str} et 20II^{Str}.

II . INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION.

Les travaux de SHIDA 1975 (137) ont montré que la température d'incubation d'une culture bactérienne avait une influence , non seulement sur le taux de croissance de la bactérie,mais aussi sur la durée de la phase de latence de la culture. Si l'inoculum est "large" la température à laquelle s'effectue la culture peut avoir une grande importance sur les rendements bactériens. Elle intervient également sur la viabilité de ces cellules durant la culture (162) .

Pour rechercher la température la plus favorable à la production de cellules viables de R. meliloti $M_9Sm_I^{Str}$ dans notre milieu nous avons effectué des cultures,en flacons, à différentes températures et en agitation continue sur agitateur de KAHN (environ 30 rotations par minute). L'inoculum de départ est de l'ordre de 1,2 . 10^7 bactéries par ml . La croissance est appréciée par mesure de la densité optique à 600 nm et par dénombrement de cellules viables.

D'après les résultats de la fig. 15 il semble que, dans nos conditions expérimentales, le taux de croissance de $M_9Sm_I^{Str}$ soit optimal à 28°C : μ = 0,52 division / heure.

Le dénombrement des cellules viables après 60 heures de culture est par contre supérieur à 30°C; il est de l'ordre de $2,5.10^9$ bactéries par ml. Nous retenons donc cette température de 30°C pour nos cultures en fermenteur.

III. INFLUENCE DU pH INITIAL DE LA CULTURE.

Le mutant acido- tolérant $M9Sm_I^{Str}$ de RAKOTOARISOA(118) peut se développer à pH acide mais avec un temps de génération très long, de l'ordre de 10 heures dans le milieu RC fructosé à pH 5,9 .

Cet auteur signale que cette souche se développe plus vite quand le pH du milieu augmente,elle se divise en 2,56 heures à pH 7,0; la souche M9S dont il est issu se divisant dans les mêmes conditions en 1,7 heure.

Il est important de constater que malgré la croissance faible et l'acidité du milieu,le mutant ne perd pas de son infectivité et qu'il est aussi efficient à pH acide qu'à pH voisin de la neutralité.

Sachant cela nous avons essayé de déterminer le pH le plus favorable à la production de cellules viables de la souche de R.meliloti $M_9Sm_I^{Str}$ dans notre milieu synthétique. Des cultures en flacons agités à 30°C ont été effectuées à différents pH, avec un inoculum de départ de l'ordre de $1,2 - 10^7$ bactéries par ml. La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600nm et par dénombrement des cellules viables.

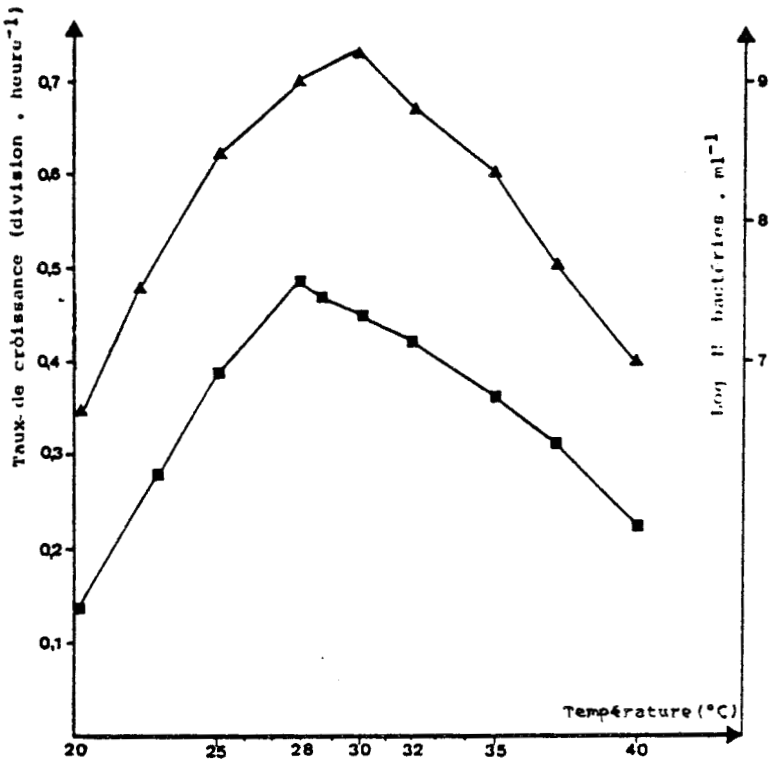


FIG.15 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION SUR LE TAUX DE CROISSANCE (▲) DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ ET SUR LE NOMBRE DE CELLULES VIABLES (■) OBTENUES APRES 60 HEURES DE CULTURE AGITEE EN MILIEU R.S. FRUCTOSE A 1% .

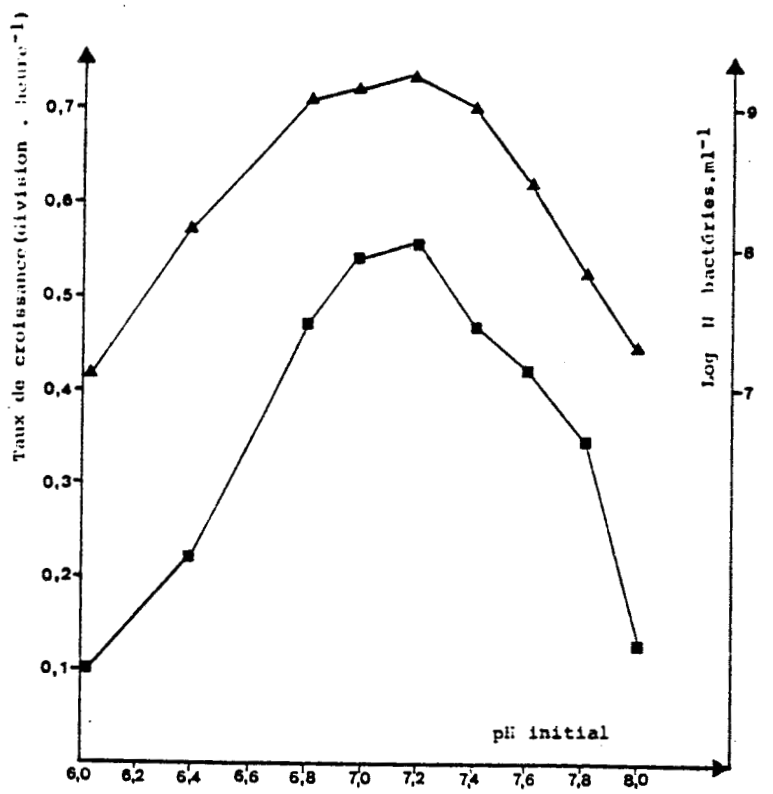


FIG.16 : INFLUENCE DU pH INITIAL DU MILIEU DE CULTURE SUR LE TAUX DE CROISSANCE (■) DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ ET SUR LE NOMBRE DE CELLULES VIABLES (▲) OBTENUES APRES 60 HEURES DE CULTURE AGITEE EN MILIEU R.S. FRUCTOSE A 1%.

D'après les résultats de la fig. 16 , il semble que dans nos conditions expérimentales, le taux de croissance de $M9Sm_I^{Str}$ soit optimal quand le pH initial du milieu de culture est voisin de 7 - 7,2.

On constate que la durée de la phase de latence est d'autant plus faible que le pH initial est proche de cette valeur.

Avant de retenir ce pH optimal de 7 - 7,2 il convient de vérifier si la population des cellules viables posséde toujours, après cette culture à pH neutre, la propriété d'acido-tolérance de la souche de départ.

<u>Vérification de l'acido- tolérance de $M9Sm_I^{Str}$ après culture à pH 7,2</u>

La souche de départ après culture sur le milieu R S pH 5,9 ($M9Sm_I^{Str}$ - 5,9) et la souche après culture dans le même milieu à pH 7,2 ($M9Sm_I^{Str}$ - 7,2) sont centrifugées. Le culot, repris et lavé en le mettant en suspension dans le tampon TNP est à nouveau centrifugé, puis repris dans différents tubes contenant IO ml de notre milieu à différents pH. L'inoculum de départ est de l'ordre de $I,I-IO^7$ bactéries par ml pour tous les tubes.

	$M9Sm_I^{Str}$ - 5,9					$M9Sm_I^{Str}$ - 7,2				
Temps (jours) / pH milieu	0	2	4	6	I2	0	2	4	6	I2
7,6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7,2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6,8	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6,4	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6,0	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5,6	-	±	±	±	±	-	±	±	±	±
5,3	-	±	±	±	±	-	-	±	±	±
5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 13 : DETERMINATION DU pH LIMITE DE CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_I^{Str}$ AVANT ET APRES CULTURE EN MILIEU R.S.

légende : + culture dense et supérieure à l'inoculum

± culture moyenne

- croissance peu différente du temps T=0

Ce tableau montre que la souche $M9Sm_I^{Str}$, après culture à pH 7,2 garde un pH limite approximativement identique à celui de la souche ayant cultivé à pH 5,9. On peut donc penser que globalement sa tolérance acide est maintenue.

BUS LILLE

IV INFLUENCE DE L'AERATION ET DE L'AGITATION .

Ce facteur ne peut-être étudié valablement que sur des cultures effectuées dans le fermenteur utilisé pour la production de cellules. En effet le transfert de l'oxygène au sein du milieu jusqu'au niveau cellulaire constitue un problème critique. Il ne dépend pas seulement du débit de l'air injecté et de la vitesse d'agitation,mais aussi de nombreux autres paramètres inhérents à la géométrie du réacteur.

1) notion de $K_L.a$

Les cultures sont agitées et aérées par injection d'air stérile,sous pression. A cause de la très faible solubilité de l'oxygène et de son absorption rapide par les bactéries il faut le remplacer continuellement .Si la concentration du milieu en oxygène descend en dessous d'une valeur critique,on peut constater des troubles métaboliques qui peuvent perturber la production et entraîner l'arrêt de la croissance .

Le facteur limitant la croissance est donc essentiellement la concentration en oxygène dissous dans le milieu.

Pour évaluer l'efficacité de l'aération on calcule, par la méthode de COOPER (137), le coefficient d'absorption (ou de transfert) volumétrique d'oxygène $K_L . a$. Il s'exprime en millimoles d'oxygène par heure et par litre de milieu.

Cette valeur donne une bonne approximation de la capacité d'oxygénation du milieu contenu dans le fermenteur.

La figure17 donne, en fonction de la vitesse d'agitation du fermenteur NEW - BRUNSWICK , modèle I9 , les valeurs du $K_L.a$, à 30°C.

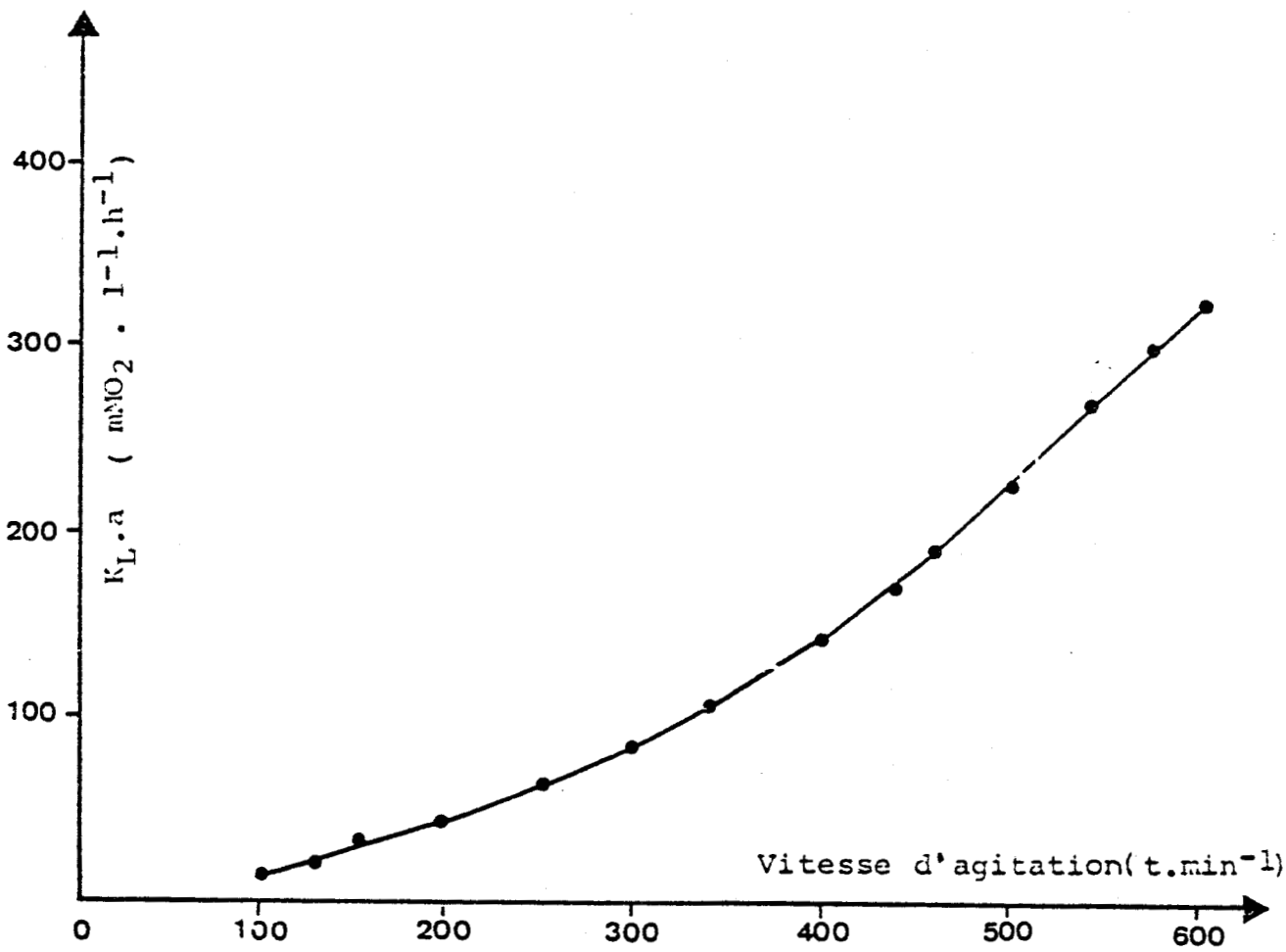


FIG.17 : COEFFICIENT DE TRANSFERT VOLUMETRIQUE D'OXYGENE ($K_L.a$) EN FONCTION DE LA VITESSE D'AGITATION DU FERMENTEUR NEW- BRUNSWICK MODELE I9 , POUR UN DEBIT D'AIR DE 3 l/min .

Les résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet l'usage montre que la valeur de l'absorption de l'oxygène par une suspension de cellules microbiennes dans un milieu contenu dans un fermenteur est en réalité plus faible que celle trouvé par la méthode au sulfite de COOPER . De plus l'augmentation de la viscosité du milieu par production de polyosides modifie aussi fortement le transfert d'oxygène.

2) recherche du K_L . a optimal .

Nous avons réalisé des cultures de $M_9Sm_I^{Str}$. dans notre milieu,en fermenteur NEW -BRUNSWICK M I9 . Les conditions expérimentales sont celles que nous avons déterminées par ailleurs:

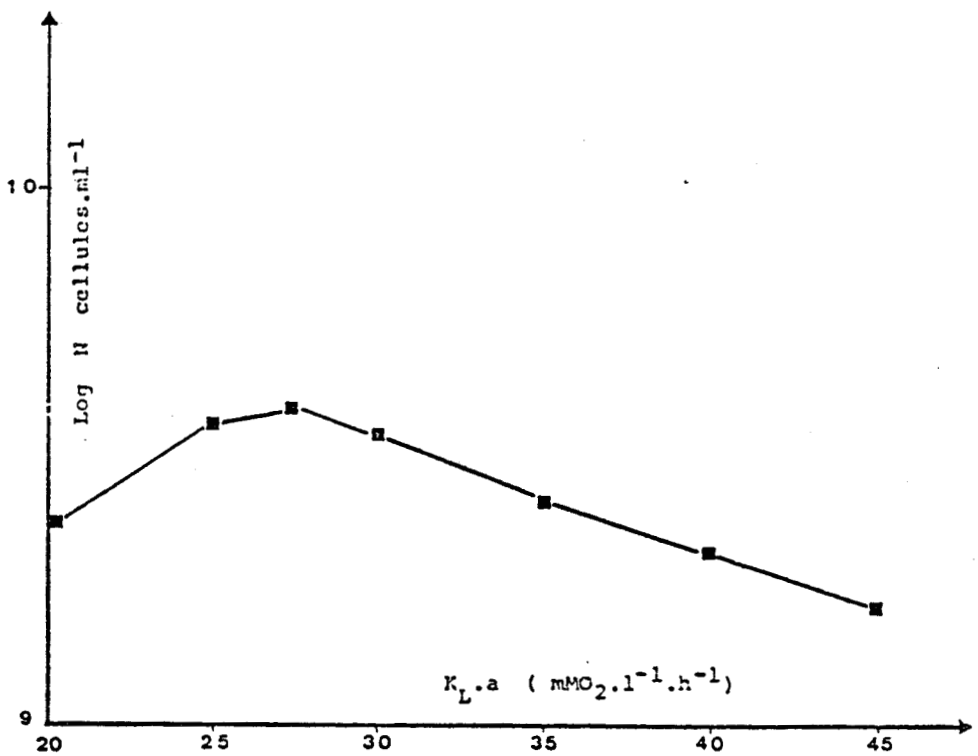
- IO litres de milieu de culture R.S.à pH 7,2
- inoculation par I litre de culture de 24 heures en fiole agitée,dans le même milieu, de façon à avoir I.IO^7bactéries par ml. au départ
- température : 30°C.

Pour chaque culture nous avons fait varier la vitesse du dispositif d'agitation tout en maintenant le débit constant (3l/min,durant toute la durée de la fermentation. Le tableau 14 et la figure 18 montrent l'influence du coefficient de transfert volumétrique d'oxygène sur la production de cellules de R. meliloti $M_9Sm_I^{Str}$ pour des cultures de 42 heures.

ESSAIS N°	Agitation t/min	$K_L.a$ $mMO_2/l.h$	N_o xIO^7b/ml	N xIO^7b/ml	P mg/ml
I	240	50	0,4	30	I,8
2	2IO	35	2,5	200	I,4
3	200	30	7,0	380	2,3
4	I80	28	2,8	360	2,5
5	I70	25	0,6	380	2,6
6	I50	20	0,3	220	I,6

TABLEAU 14 : INFLUENCE DE L'AERATION ET DE L'AGITATION SUR LA PRODUCTION EN FERMENTEUR DE CELLULES DE R.MELILOTI $M9Sm_I^{Str}$, MILIEU R.S. , pH 7,2 , 30°C.

légende $K_L.a$: coefficient de transfert volumétrique d'oxygène.
N_o : Nombre de bactéries viables au temps t = 0.
N : Nombre de bactéries viables au temps t = 42h.
P : Poids sec des bactéries au temps t = 42h.



BUS LILLE

Fig.18 : RELATION ENTRE LA VALEUR DU COEFFICIENT DE TRANSFERT VOLUMETRIQUE D'OXYGENE ($K_L.a$) ET LA PRODUCTION DE CELLULES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ EN FERMENTEUR (NEW-BRUNSWICK MI9 MILIEU R.S. CULTURES DE 42 HEURES A 30°C.

Les rendements les plus intéressants ont été obtenus pour des valeurs du $K_L.a$ voisines de 28 mM d'oxygène par litre et par heure. Cette valeur correspond, dans le modèle de fermenteur que nous utilisons et pour un débit d'air de 3l/min, à une vitesse d'agitation de I70 à 200 tours par minute.

Ces constatations nous ont d'abord étonné mais nous les avons vérifiées à plusieurs reprises. Dans les cultures aérobies habituelles l'augmentation de l'aération est indispensable au fur et à mesure que la culture se développe. Des cultures de Rhizobium effectuées dans ces dernières conditions ne nous ont pas donné des quantités de bactéries plus importantes. R.meliloti ne semble donc pas nécessiter pour sa multiplication une tension d'oxygène très importante. Nous pensons, comme de nombreux auteurs (34-35) que Rhizobium est une bactérie aérobie qui possède une tendance nette à la microaérophilie.

ERTOLA (44) a démontré que l'oxygène n'a une grande influence sur le taux de croissance de R. meliloti, qu'au dessous d'un taux de 29 ml O_2/ l.h. Cet auteur indique également qu'en présence d'une concentration quarante fois plus élevée les courbes de croissance restent identiques.

En fait VAN SCHREVEN (155) montre que les valeurs du débit d'air peuvent varier de 0,5 à I20 l d'air par litre de milieu et par heure, suivant les souches, le milieu, et les fermenteurs utilisés.

Une aération de 5l. d'air / l. h. semble être adéquate pour R. trifolii T.A 1

ROUGHLEY (127) indique, pour la souche de R. meliloti TA_I, que le nombre de bactéries viables passe de 0,I. IO^9 à 3,5 . IO^9 b/ml quand le débit d'air passe de I à 5 l par litre de milieu et par heure. Il n'y a toutefois aucune augmentation de rendement si le débit est porté à IOl d'air/l.heure

V. CONCLUSIONS.

Les conditions optimales requises pour obtenir des rendements élevés de cellules viables de R. meliloti $M_9Sm_I^{Str}$ dans notre milieu R.S.,sont donc :

I°) inoculation importante de l'ordre de IO^7b/ml à partir d'une préculture en phase exponentielle de croissance

2°) température de croissance optimale : 30°C

3°) pH initial du milieu de culture :7,0 - 7,2

4°) coefficient de transfert volumétrique d'oxygène : $K_L.a$ de l'ordre de 28 mMO_2/l.h.

C - PRODUCTION EN MASSE DE RHIZOBIUM MELILOTI EN FERMENTEUR .

I. PRODUCTION DE RHIZOBIUM MELILOTI EN MILIEUX COMPLETS ET SYNTHETIQUES.

Nous avons commencé par voir si les résultats obtenus précédemment au biophotomètre allaient se confirmer au stade de la production. Pour cela nous avons effectué différentes cultures en fermenteurs,dans les milieux complets et synthétiques que nous avons sélectionnés et dans les conditions optimales que nous avons définies pour la souche $M_9Sm_I^{Str}$ et le milieu R.S.

Les milieux R. et RC, couramment utilisés nous ont servi de milieux témoins.

Le sucre utilisé a toujours été le fructose . Pour chaque expérimentation le milieu de préculture,préparé en fiole à toxine,est identique à celui de la fermentation . La préparation de ces milieux a été décrite dans le chapitre II.Il est toujours ensemencé par IOml. de souche conservée à-20°C en milieu R.C. fructosé glycérolé. L'incubation de la préculture se poursuit 20 à 24 heures à 30°C, sur agitateur rotatif. (D.O. à 600 nm de 0,5 à 0,8).

Les milieux de fermentation sont toujours préchauffés à 30°C de façon à réduire la phase de latence.

Les résultats rassemblés dans la fig. 19 et le tableau 15 montrent que c'est le milieu empirique d' ISWARAN qui permet d'obtenir les rendements les plus importants en cellules viables pour la souche $M_9Sm_1^{Str}$. La production d'exopolysaccharides dans ce milieu apparaît rapidement (I2 à 24 heures) et atteint des taux élevés (2 à 3 000 µg/ml). Le milieu devient trés vite visqueux . Dans nos conditions de laboratoire nous n'avons jamais su récupérer convenablement la biomasse obtenue dans ce milieu.

Comme nous l'avions déjà vu antérieurement le milieu empirique T.Y. permet aussi d'obtenir rapidement un nombre important de cellules, mais elles sont trés vite lysées; l'examen au microscope de ces cellules montre un nombre important de cellules morphologiquement "anormales."

Le milieu synthétique R.S., dans les conditions optimales que nous avons définies, permet d'obtenir en fermenteur des quantités de cellules viables de R. meliloti trés satisfaisantes. Elles sont toujours supérieures à celles obtenues en milieu synthétique R et même en milieu complet R.C. Les rendements sur ce milieu sont assez analogues à ceux obtenus en milieu T.Y.

En milieu R.S. les quantités d'exopolysaccharides produites sont moyennes (0,7 à I,5 mg/ml en 48 heures). Jamais nous n'avons observé, à l'examen microscopique, de formes "anormales" ressemblant à des bactéroïdes .

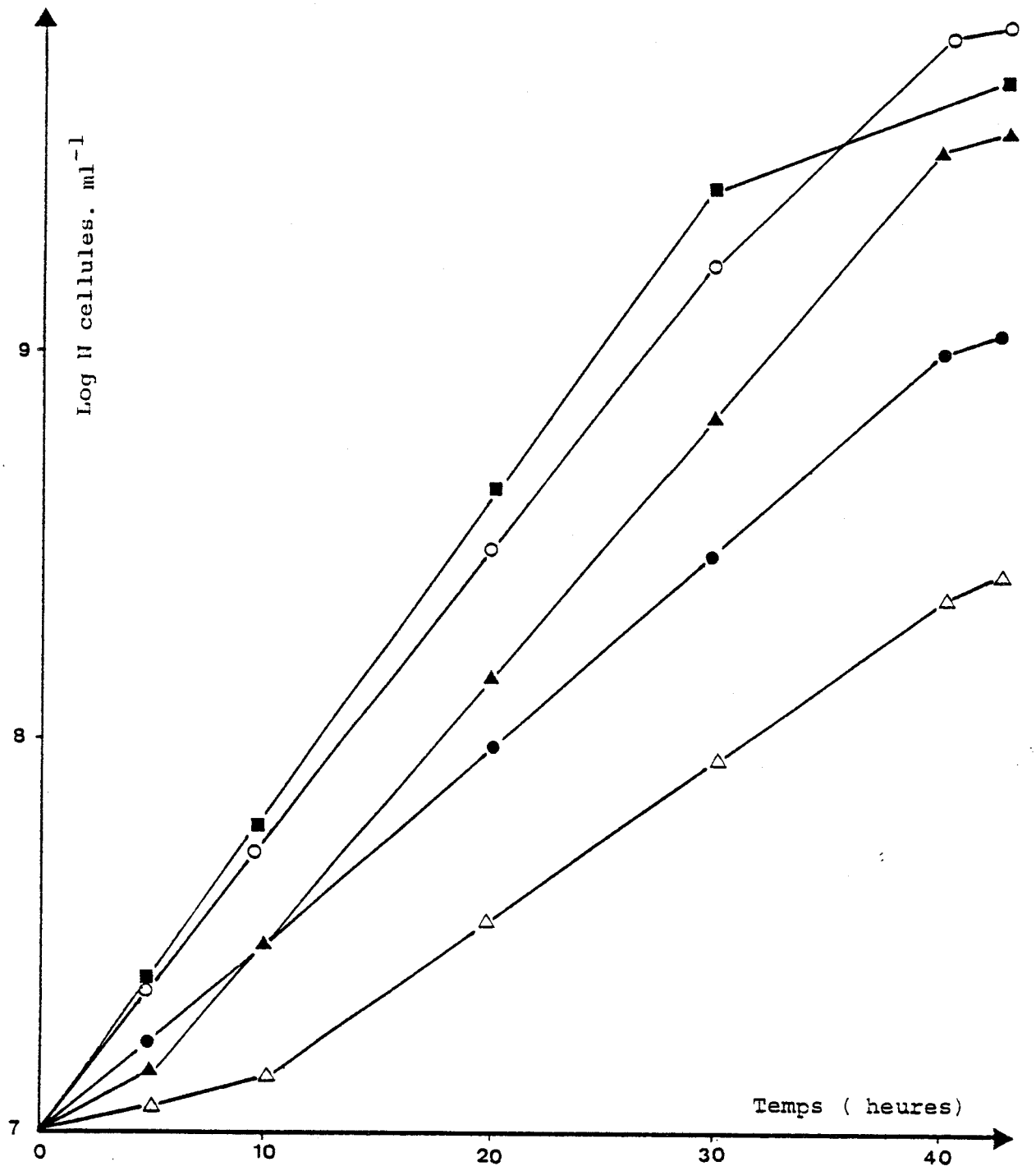


FIG. I9 : CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ EN FERMENTEUR NEW-BRUNSWICK M I9 , EN MILIEUX COMPLETS ET SYNTHETIQUES A 30°C -$K_L.a$ = 28mMO_2 $l^{-1}.h^{-1}$, (▲) MILIEU R.S.; (△) MILIEU R. (O) MILIEU D'ISWARAN; (●) MILIEU RC; (■) MILIEU TY.

BUS LILLE

Nous retrouvons bien ici, au stade de la production en fermenteur de laboratoire, les mêmes conclusions que nous avions obtenues pour les cultures en tubes et en flacons .

Le milieu synthétique R.S. nous sem ble donc être un milieu bien adapté à notre problème de production en grande quantité de cellules de R. meliloti, et en particulier pour la souche acido-tolérante $M9Sm_I^{Str}$.

II . PRODUCTION , EN MILIEU R.S., DE RHIZOBIUM MELILOTI $M9Sm_I^{Str}$

Le tableau 15 montre les résultats de 6 essais de cultures en fermenteur de la souche $M9Sm_I^{Str}$ de RAKOTOARISOA (118) dans des conditions expérimentales rigoureusement définies.

ESSAIS N°	CONCENTRATION		
	D.O.FINALE A 600 nm	POIDS SEC $mg.ml^{-I}$	NUMERATION FINALE N bactéries.ml^{-I}
I	7,50	2,7	$4,4 . IO^9$
2	8,20	3,2	$5,2 . IO^9$
3	7,82	2,5	$4,7 . IO^9$
4	7,80	2,3	$3,8 . IO^9$
5	7,02	2,8	$3,I . IO^9$
6	6,IO	2,4	$2,7 . IO^9$

TABLEAU 15 : PRODUCTIONS DE R. MELILOTI $M9Sm_I^{Str}$, APRES 42 HEURES DE CULTURE EN FERMENTEUR NEW-BRUNSWICK MI9, EN MILIEU R.S. ; A 30°C ; $K_L.a = 28 mMO_2.l^{-I}.h^{-I}$.

Un volume de préculture est introduit dans le fermenteur de façon à obtenir une D.O. à 600 nm. voisine de 0,0I , correspondant à environ I. IO ^{7} B/ml)

Toutes les conditions optimales définies ci-dessus sont rigoureusement respectées. Des prélèvements aseptiques effectués régulièrement permettent de pratiquer un contrôle de pureté par examen microscopique et les mesures d'évaluation de la croissance (D.O. à 600nm , poids sec de bactéries, numération des cellules viables). Dans certains cas de production importante déxopolysaccharides nous avons été amenés à connaître rapidement leur teneur, même approximative, dans le milieu, ainsi que la quantité d'ose résiduel extracellulaire.

MILIEUX	NOMBRE DE CELLULES VIABLES x IO^{9}. ml^{-I}		
	20II ^{Str_3}	M.I - 5^{Str}	$M_9Sm_I^{Str}$
R	0,6	I,I	0,9
R.S.	3,5	5,8	4,I
ISWARAN	5,I	8,6	6,4
T.Y.	3,3	5,2	4,7
R.C.	2,4	3,7	3,8

TABLEAU 16 : PRODUCTION DE R. MELILOTI ,APRES 42 HEURES DE CULTURES EN FERMENTEUR NEW -BRUNSWICK M I9, EN MILIEUX SYNTHETIQUES (R,R.S.) ET COMPLETS (ISWARAN, TY,R.C.) A 30°C ; $K_L.a$ = 28 mMO_2 l^{-I} . h^{-I} .

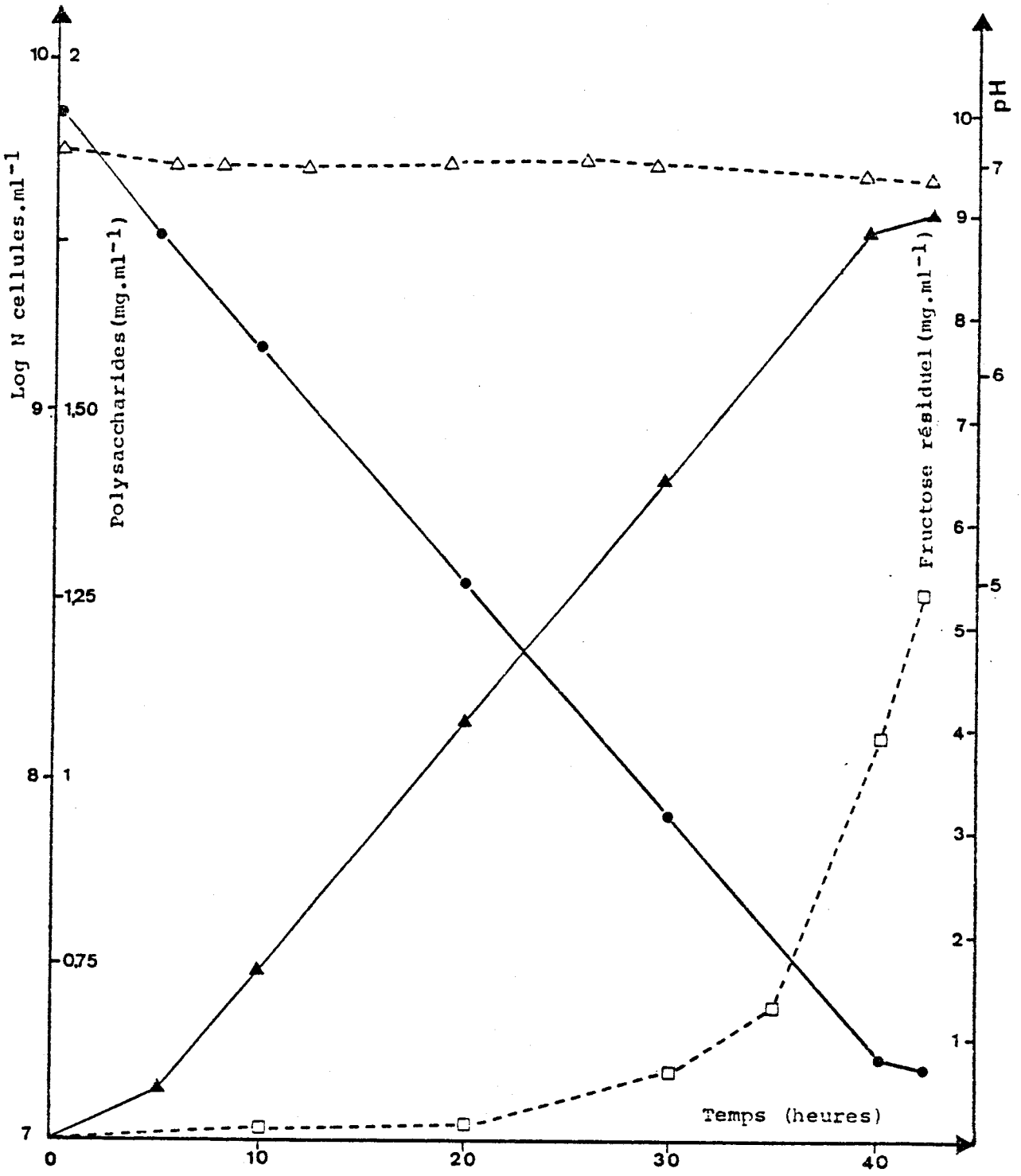


FIG.20 : CROISSANCE DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ EN FERMENTEUR NEW-BRUNSWICK M I9 - MILIEU R.S. - pH 7,2 - 30°C - K_L .a : 28mMO$_2$.l^{-1}.h^{-1} , (▲) EVOLUTION DU NOMBRE DE BACTERIES VIABLES ; (□) QUANTITE D'EXOPOLYSACCHARIDES, (●) FRUCTOSE RESIDUEL EXTRACELLULAIRE; (△) EVOLUTION DU pH DU MILIEU.

BUS LILLE

Après 40 à 42 heures il est possible de produire dans ce milieu, et ce ci de façon très reproductible ,un rendement de 3 à 5 x 10^9 bactéries par ml de milieu de culture.

Sur la figure 20 on peut voir que le pH du milieu, n'est que très peu modifié tout au long de la culture. Le fructose est entièrement utilisé après 40 heures pour la production de cellules et la synthèse de polysaccharides.

Le démarrage immédiat après l'inoculation confirme l'importance de conditions expérimentales définies antérieurement . On peut également noter l'importance de la longueur de la phase exponentielle de croissance qui dure pratiquement tout le temps de la fermentation .

D'aprés le tableau 15 il est possible aussi de constater que la mesure de densité optique,en milieu synthétique, est une méthode valable d'évaluation de la croissance. Nous avons vu qu'il n'en était pas toujours ainsi en milieu complet .

III. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

Dans le milieu synthétique R.S.,simple et parfaitement défini, il est possible de produire de façon reproductible des quantités importantes viables de Rhizobium.

Les conditions optimales de culture doivent cependant être suivies avec rigueur .

L' inoculation de départ est de 10^7 bactéries par ml. La température optimale de croissance des différentes souches de R. meliloti est de 30°C. Le pH final du milieu de culture fixé à 7,2 n'a pas besoin d'être régulé en cours de fermentation. Le $K_L.a$ convenable se situe au niveau de 25 à 30 mMO_2/ l.h;,ce qui correspond,dans nos fermenteurs, à une vitesse d'agitation de 170 à 200 tours/ min,à un débit d'air de 3l/ min. Dans ces conditions, après environ 40 heures de culture, la densité optique à 600 nm , sur 1 cm. d'épaisseur,peut atteindre 8,2, correspondant à 5,2 . 10^9 bactéries revivifiables par ml. Dans un fermenteur de 12 l de capacité utile on obtient donc, dans ces conditions, une production de l'ordre de 6.10^{13} cellules viables.

La durée relativement courte du cycle de fermentation est aussi intéressante car elle réduit à la fois le coût de production et diminue en même temps les risques de contamination.

L'absence de taux élevés d'extrait de levure et de certains acides aminés évite les éventuelles inhibitions et déformations cellulaires que l'on peut rencontrer dans certains milieux complets et industriels.

La synthèse d'exopolysaccharides par R. meliloti dans ce milieu est suffisante pour obtenir un effet protecteur (19) sur la survie des bactéries mais insuffisante pour provoquer des difficultés de récupération de la biomasse par centrifugation.

De plus il est souvent avantageux pour certains travaux de recherche, de disposer d'une phase exponentielle prolongée.

Une phase de latence courte montre que les substrats sont rapidement métabolisés et évite toute modification, par sélection, des caractères originaux des souches utilisées (I36) . Nous avons souvent vérifié que l'acido- tolérance de $M9Sm_1^{Str}$ n'était pas modifée par 40 heures de culture à pH 7,2, dans nos conditions expérimentales.

Enfin le milieu R.S. nous permet d'obtenir une population maximale de cellules viables aussi importante que celle obtenue en milieu complet. Ceci va nous conduire,en vue de la préparation d'inoculums convenables pour l'inoculation de la luzerne,à étudier et à améliorer la conservation de cette biomasse.

D - CONSERVATION DE LA BIOMASSE .

Il est certain que dans la pratique la conservation de la biomasse produite par fermentation doit être la plus longue possible . Pour cela il est possible d'envisager :

I°) la conservation des cellules de Rhizobium, dans le milieu de culture lui même , à basse température, sans concentration préalable (I)

2°) la conservation des cellules de Rhizobium , dans le milieu de culture, à basse température, après concentration préalable (2)

3°) la conservation des cellules de Rhizobium après dessiccation par lyophilisation (procédé témoin) ou atomisation (3) . Ces moyens feront l'objet de la partie 2 de ce chapitre.

Les types de conservation (I) et (2) peuvent permettre,mais toujours dans des délais très brefs,des inoculations directes de graines, par arrosage ou enrobage,mais aussi l'imprégnation de divers supports (tourbe, amendements,charbon, gels etc...) Les conditions d'hydratation toujours importantes dans ces modes de conservation limitent beaucoup leurs utilisations. Nous les envisagerons essentiellement comme des étapes préliminaires pour le type de conservation (3).

A notre avis ce dernier type peut résoudre de nombreux problèmes de conservation et de transport et permettre,après réhydratation,la réalisation des autres modes d'inoculation.

I. CONSERVATION DE LA BIOMASSE A +4°C, SANS CONCENTRATION PREALABLE.

Nous avons conservé à + 4°C les cultures obtenues par fermentation,de façon à connaître l'évolution du nombre de cellules viables dans ces conditions.

Si les quantités de cellules viables restent sensiblement identiques pendant I à 3 jours,après 60 à I20 jours de conservation dans ces conditions (figure 2I), il ne subsiste plus que IO^6 bactéries par ml de milieu. Le nombre de bactéries viables durant cette période a diminué de 4 à 5 puissances de IO . Il faut donc, dans la pratique,éviter de conserver à + 4°C les cultures plus de 48 heures.

II. CONSERVATION DE LA BIOMASSE CONCENTREE SUR CENTRI - THERM , A + 4°C .

Les cultures en fermenteur sont concentrées sur appareil Centri-Therm CTlB : 40 litres de culture bactérienne peuvent être ainsi réduits à IO l en l heure, à température ménagée.

On peut observer sur le tableau I7 que le nombre de cellules viables après concentration reste sensiblement constant.

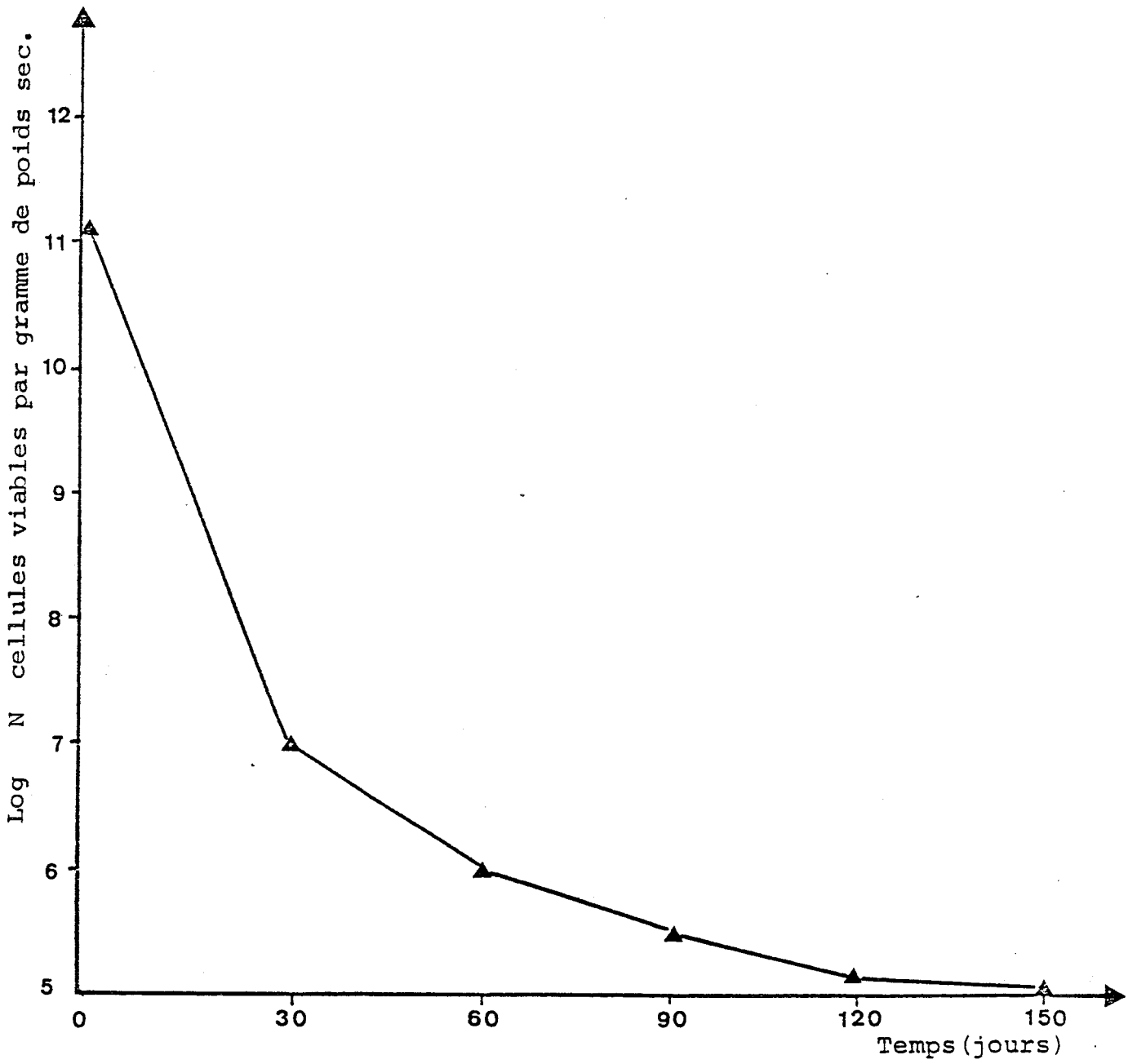


FIG. 21 : CONSERVATION DES CELLULES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ DANS LE MILIEU DE FERMENTATION R.S. , NON CONCENTRE, A + 4°C.

ESSAIS N°	NOMBRE DE BACTERIES / G DE POIDS SEC.			
	AVANT CONCENTRATION		APRES CONCENTRATION	
I	I,7	IO^{II}	I,4	IO^{II}
2	I,3	IO^{II}	I,I	IO^{II}
3	I,I	IO^{II}	7,8	IO^{IO}

TABLEAU 17 NOMBRE DE CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_I^{Str}$ AVANT ET APRES CONCENTRATION SUR CENTRI - THERM

CONSERVATION EN JOURS	NOMBRE DE BACTERIES / G DE POIDS SEC.			
	APRES CONCENTRATION		APRES CONSERVATION A +4°C	
I	I,I	IO^{II}	5,5	IO^{IO}
3	I,7	IO^{II}	9	IO^{IO}

TABLEAU 18 NOMBRE DE CELLULES VIABLES D'UN CONCENTRAT EFFECTUE SUR CENTRI - THERM, EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION A + 4°C.

La conservation des concentrats obtenus par cette méthode est également convenable à +4°C durant un temps suffisant pour l'imprégnation de supports et de graines, ou pour passer au procédé de déshydratation (tableau 18). Il faut quand même remarquer une diminution d'environ 50% du nombre de cellules viables, après 3 jours de conservation dans ces conditions.

Chapitre III

partie 2

PREPARATION ET CONSERVATION DE CELLULES DESHYDRATEES DE RHIZOBIUM MELILOTI

A PREPARATION ET CONSERVATION DES CELLULES DESHYDRATEES DE R. MELILOTI.

INTRODUCTION.

Nous avons essayé,en tenant compte des travaux déjà entrepris dans notre laboratoire (5_19_88_91)deux méthodes de conservation par dessiccation des cellules produites par fermentation:

- la lyophilisation (procédé témoin)
- l'atomisation ou spray-drying

Le but de ces expérimentations est la mise au point d'un procédé de séchage de Rhizobium, simple à mettre en oeuvre, utilisable industriellement,et peu coûteux . L'inoculum en poudre ainsi obtenu doit maintenir en vie, pendant un temps suffisamment long, un nombre convenable de cellules. Les propriétés originelles de la souche de départ doivent être intégralement conservées (acido-tolérance,infectivité,efficience) . Enfin la présentation physique de l'inoculum doit permettre une manutention et une conservation faciles,et une utilisation aussi large que possible.

I . CELLULES DESHYDRATEES PAR LYOPHILISATION.

a) Les essais réalisés.

Dans certaines de nos lyophilisations la biomasse récupérée par centrifugation réfrigérée est reprise dans du lait partiellement écrémé (IOO g/l) puis répartie en flacons particuliers (type Hémoculture) à raison de 5 ml par flacon.

Dans ce cas la durée totale du cycle de lyophilisation est d'environ 78 heures.

Les flacons spéciaux utilisés, d'une capacité de 75 ml, fermés par double bouchonnage, un opercule perforable en caoutchouc et une capsule vissée, assurent une parfaite étanchéité. Ils nous ont permis de soumettre facilement les produits à différentes conditions d'atmosphère de conservation : sous air , sous vide (IO^{-3} mm Hg) et sous (azote U, L'AIR LIQUIDE). Chaque série est ensuite conservée à + 4°C, + 30°C, et température ambiante (20 - 25°C).

Dans d'autres lyophilisations la biomasse concentrée sur Centri- Therm (matière sèche voisine de 50 g/l) est additionnée de différents supports protecteurs (50 g/l en concentration finale) puis répartie en flacons. Certaines séries ont été ainsi préparées sans aucun support et d'autres respectivement avec du lactose (LACTO - FRANCE), du lait (GALLIA) additionné de I% de chlorhydrate de cystéïne (MERCK), de malto - dextrine (M.D.O.$_I$ ROQUETTE), et d'amidon (ROQUETTE). Ces opérations ont duré environ 58 heures dont IO à I2 heures pour la congélation à - 20°C sur les plateaux du lyophilisateur.

b) Les résultats obtenus.

b.1 . Conservation des bactéries durant la lyophilisation.

AVANT LYOPHILISATION	IMMEDIATEMENT APRES LYOPHILISATION	
	Sans support	Avec support (M.D.O.$_I$)
I,I . IO^{II}	I. IO^8	4,5 . IO^8

TABLEAU 18* NOMBRE DE CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, APRES LYOPHILISATION, PAR GRAMME DE POIDS SEC.

Après la lyophilisation des cellules de $M_9Sm_I^{Str}$, concentrées auparavant sur Centri-Therm, la récupération en cellules viables est de l'ordre de 0,I à I% comme il est indiqué dans le tableau précédent. Ces taux faibles comparativement à ceux obtenus par BOUTELET (19) et MERCIER (88) sont explicables par les conditions proches du type industriel que nous avons suivies .

b.2 . Conservation des bactéries lyophilisées sans support, gardées à différentes températures.

1. conservées en présence d'air . voir fig.22

2. conservées sous vide. voir fig.23

3. conservées sous azote. voir fig.24

Les résultats les plus satisfaisants sont obtenus quand les cellules lyophilisées sont conservées sous azote. La conservation sous vide réduit de 2 à 3 fois le taux de cellules viables, à + 4°C comme à 20 - 25°C. La conservation en présence d'air n'est acceptable qu'à + 4°C.

b.3 . Conservation des bactéries lyophilisées sur différents supports.

Les résultats des numérations, toujours effectuées en deux exemplaires, sont indiqués dans le tableau 19

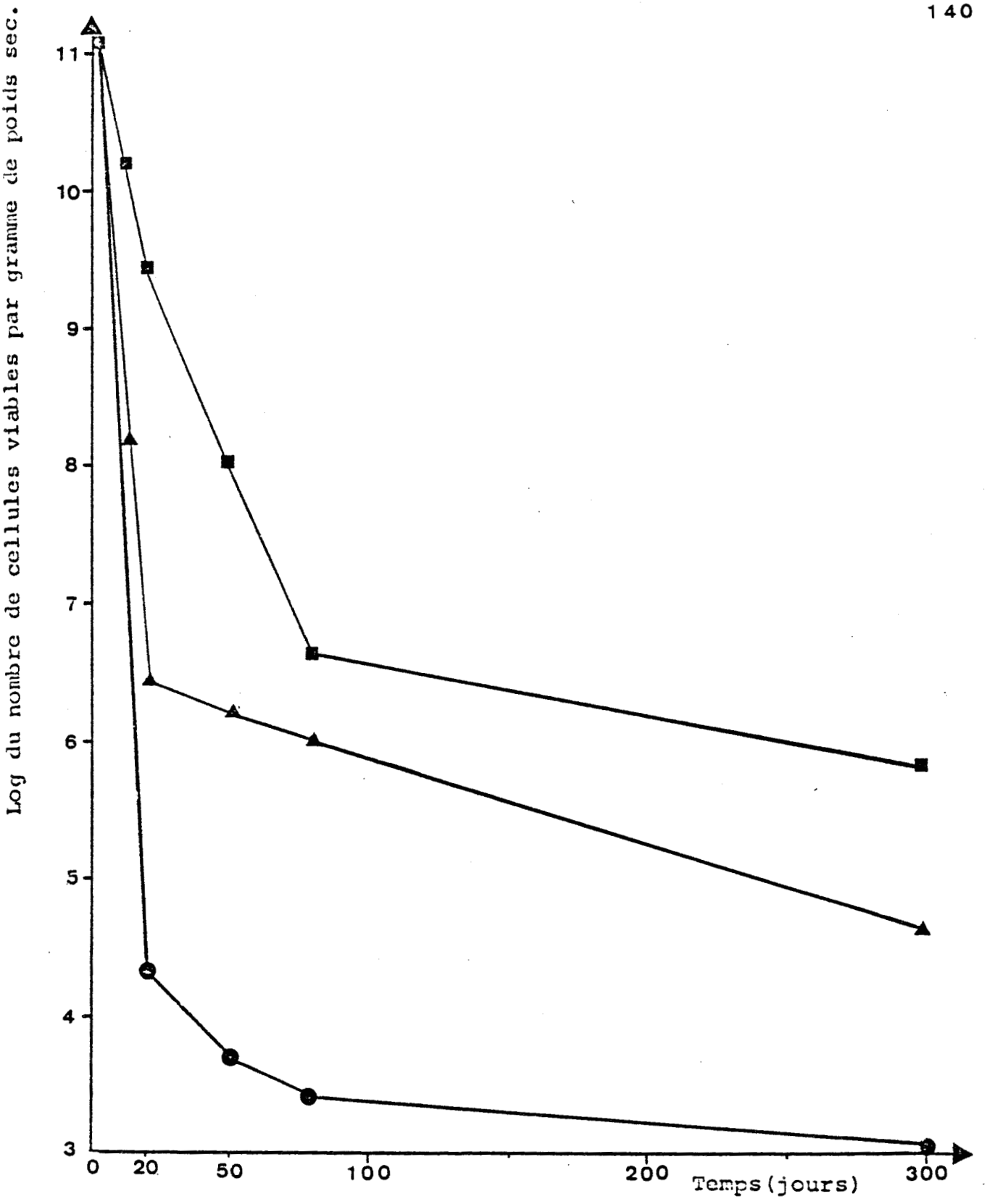


FIG.22 . CONSERVATION DES CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, DESSECHEES PAR LYOPHILISATION, CONDITIONNEES SOUS AIR ET CONSERVEES A DIFFERENTES TEMPERATURES : (■) + 4°C; (▲) 20 - 25°C ; (●) 30°C.

BUS LILLE

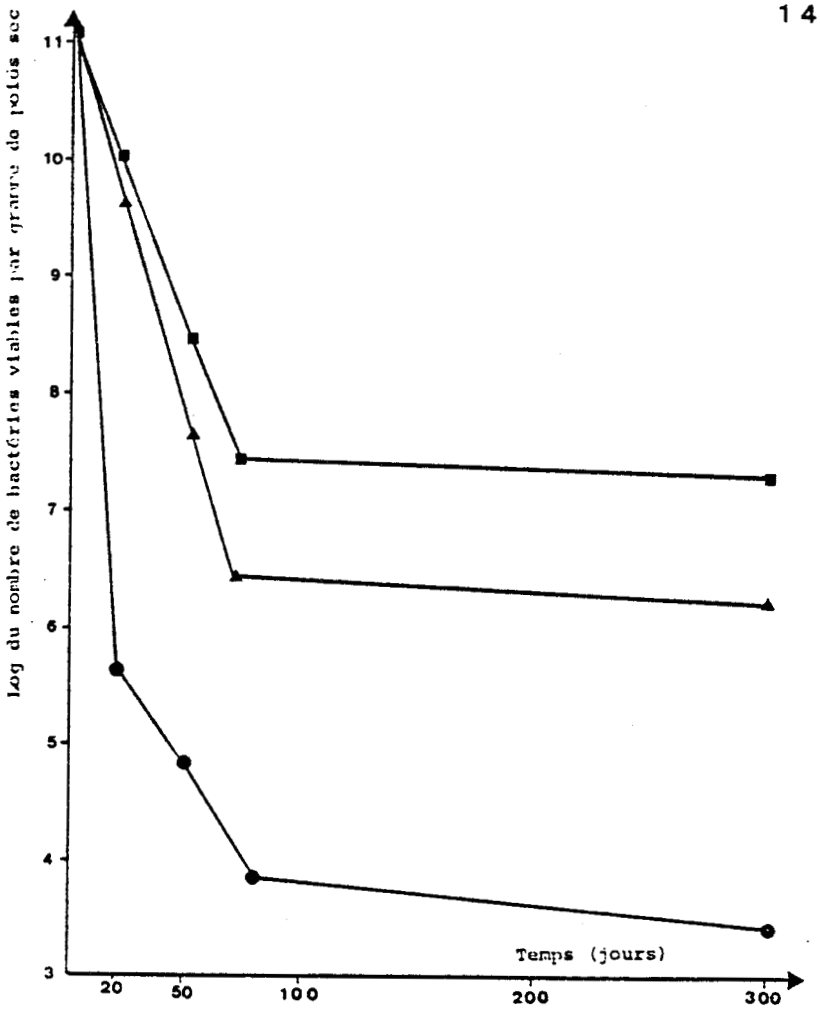


FIG 24 : CONSERVATION DES CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ DESSECHEES PAR LYOPHILISATION, CONDITIONNEES SOUS AZOTE, ET CONSERVEES A DIFFERENTES TEMPERATURES : (■) 4°C; (▲) 20-25°C (●) 30°C.

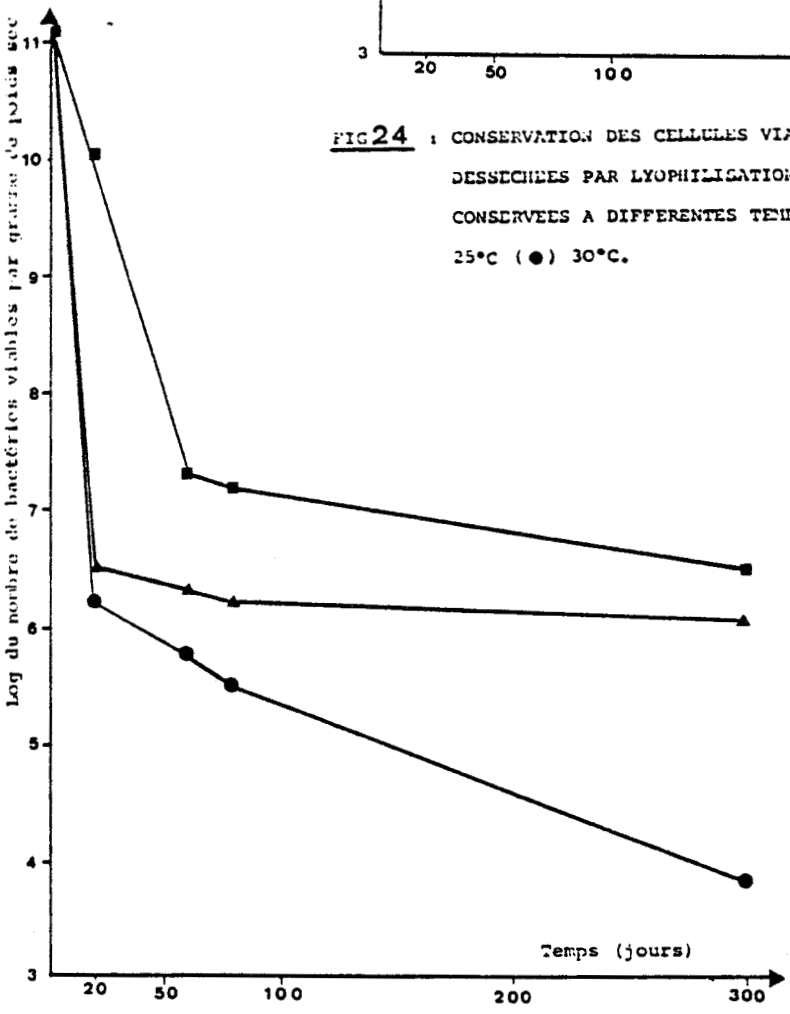


FIG 23 : CONSERVATION DES CELLULES VIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, DESSECHEES PAR LYOPHILISATION, CONDITIONNEES SOUS VIDE ET CONSERVEES A DIFFERENTES TEMPERATURES : (■) +4°C; (▲) 20-25°C; (●) 30°C.

CONSERVATION EN JOURS	Log DU NOMBRE DE CELLULES VIABLES / G DE POIDS SEC					
	AVANT LYOPHILISATION	APRES LYOPHILISATION				
		Sans support	Amidon soluble	Malto-dextrine	Lait I% cystéiné	Lactose
0	IO,20	8,04	8,88	8,65	8,82	8,79
I2	—	7,25	7,43	8,24	7,65	7,43
60	—	7,20	7,27	8,I3	7,I7	7,25
I20	—	6,I2	7,I5	8,OI	7,I2	7,I7

TABLEAU 19 INFLUENCE DE LA NATURE DU SUPPORT SUR LE NOMBRE DE CELLULES REVIVIFIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_I^{Str}$, OBTENUES PAR LYOPHILISATION ET CONSERVEES SOUS VIDE A 20-25°C.

C'est la malto-dextrine qui semble être le meilleur support de lyophilisation pour $M_9Sm_I^{Str}$, dans nos conditions expérimentales.

c) Conclusions.

Les meilleurs résultats pour la lyophilisation sont obtenus avec la malto-dextrine comme support . Le conditionnement sous azote ou sous vide, et la conservation pendant I20 jours à + 4°C (et à 20 - 25°C) permet de retrouver IO^7 à IO^8 cellules viables par gramme de poids sec. Ce taux reste ensuite relativement stable jusqu'à 300 jours .

II. CELLULES DESHYDRATEES PAR ATOMISATION.

a) Les essais réalisés.

La biomasse concentrée sur Centri- Therm (matière sèche voisine de 50 g/l) est additionnée de différents supports protecteurs (50 g/l en concentration finale). Les mélanges sont ensuite soumis à la déshydratation par atomisation. Certaines séries ont été ainsi préparées sans aucun support et d'autres avec les mêmes supports que pour la lyophilisation.

Les produits atomisés sont aussitôt répartis en flacons spéciaux et soumis aux différentes conditions d'atmosphère de conservation: sous air, sous vide, et sous azote. Chaque série est conservée à + 4°C, 30°C et température ambiante (20 - 25°C).

b) Les résultats obtenus.

b. 1 . Conservation des bactéries durant l'atomisation.

ESSAIS	AVANT ATOMISATION	IMMEDIATEMENT APRES ATOMISATION	
		SANS SUPPORT	AVEC SUPPORT (M.D.O.$_I$)
I	I,0. IO^{II}	I,8 IO^9	2,8 IO^9
2	0,78 IO^{II}	I,4 IO^9	I,8 IO^9
3	0,55 IO^{II}	I,2 IO^9	I,6 IO^9

TABLEAU 20 : NOMBRE DE CELLULES VIABLES PAR GRAMME DE POIDS SEC

R. MELILOTI $M_9Sm_I^{Str}$

Après l'atomisation dans ces conditions, (température d'entrée I40°C , température de sortie 75°C) de cellules de $M_9Sm_I^{Str}$ concentrées au préalable sur Centri-Therm, la récupération en cellules viables est de l'ordre de I,5 à 2% sans support, et de 2,5 à 3% avec support. Après atomisation il est donc possible d'obtenir une poudre contenant I,2 à 2,8 x IO^9 cellules viables par ~~ml~~ g.

b. 2. Conservation des bactéries atomisées, en fonction de la température d'entrée de l'air.

Nous avons réalisé une étude en faisant varier la température de l'air entrant dans l'atomiseur de I30°C à I70°C, la température de sortie varie de ce fait de 75° à 85°C.

Les cellules ont été conditionnées sous vide et gardées à température ambiante (20- 25°C).

Nous sommes partis d'une biomasse concentrée sur Centri-Therm, sans addition de support, contenant 5,5 x IO^{IO} cellules viables par ~~ml~~ g.

La fig. 25 montre que la récupération après atomisation, et la conservation dans le temps, sont les plus satisfaisantes si les températures d'entrée sont voisines de I30 - I40°C.

b. 3. Conservation des bactéries atomisées à I40°C sur différents supports.

Les résultats des numérations sur les poudres obtenues, sont indiqués dans le tableau 21

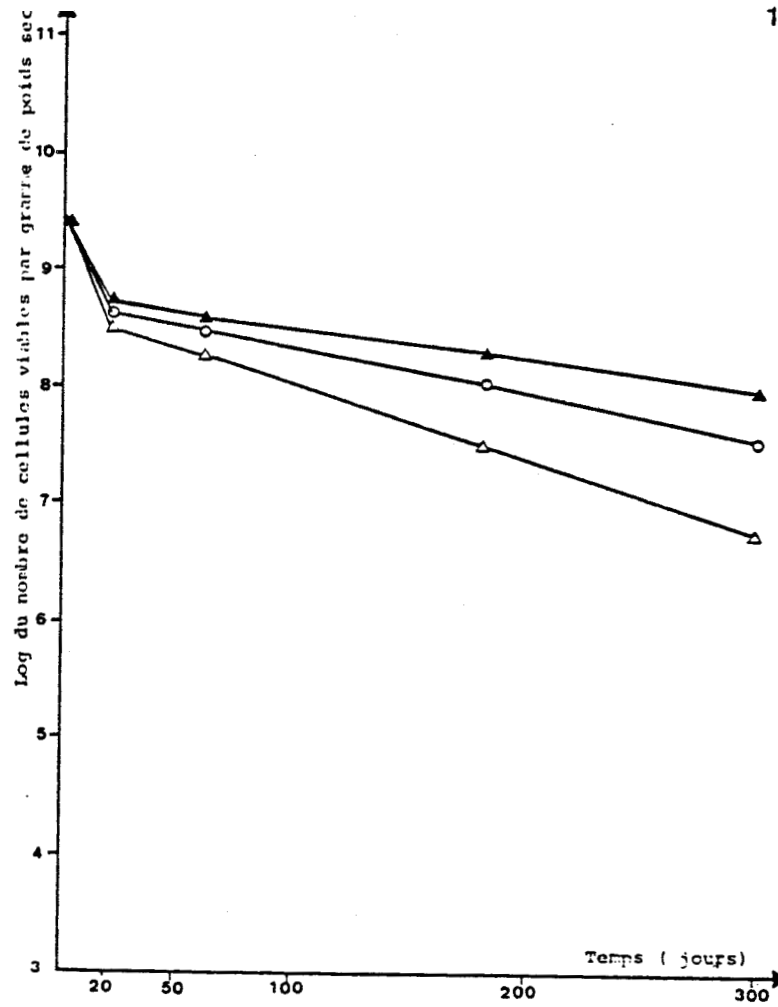
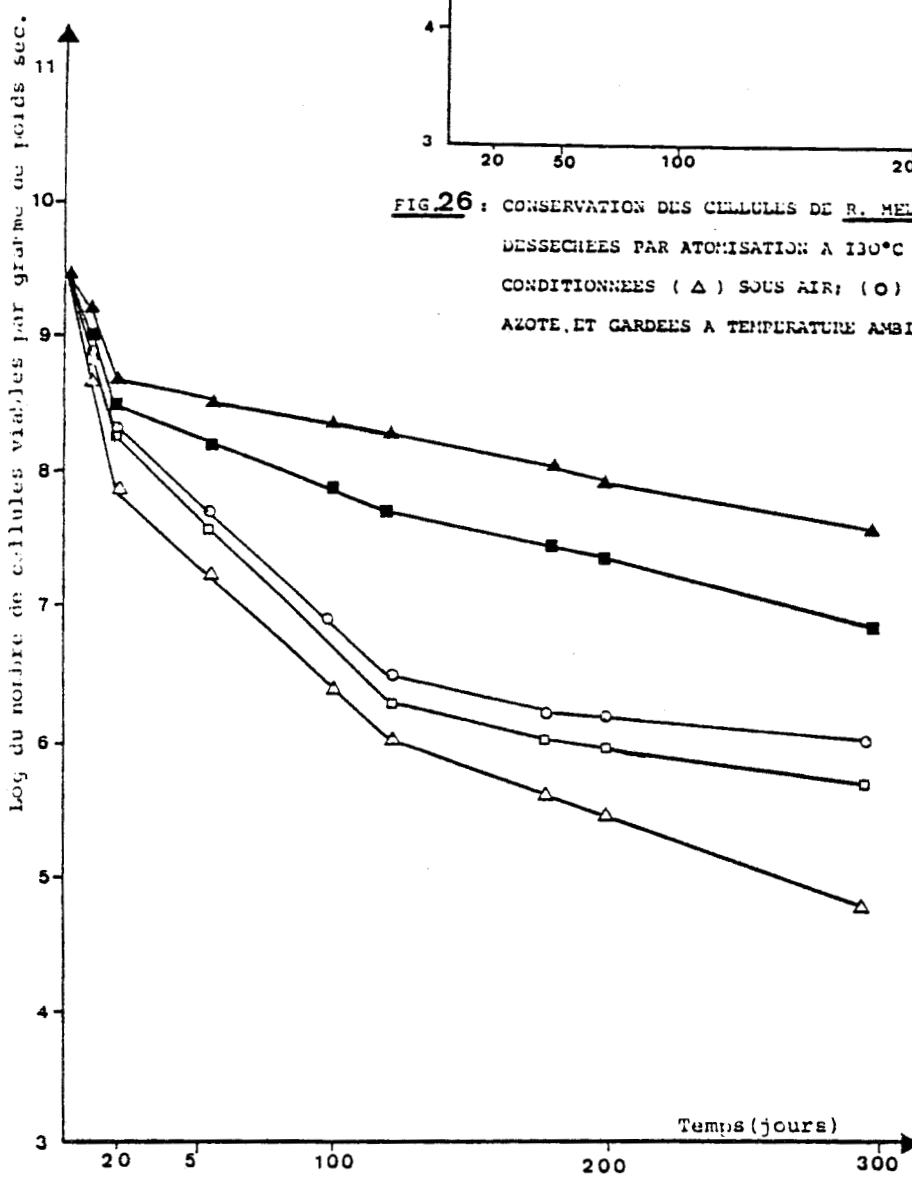


FIG.26 : CONSERVATION DES CELLULES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$, DESSECHEES PAR ATOMISATION A 130°C , SUR MALTO - DEXTRINE, CONDITIONNEES (△) SOUS AIR; (○) SOUS VIDE; (▲) SOUS AZOTE, ET GARDEES A TEMPERATURE AMBIANTE (20-25°C)



BUS LILLE

FIG.25 : CONSERVATION DES CELLULES DE R. MELILOTI $M9Sm_1^{Str}$, DESSECHEES PAR ATOMISATION A DIFFERENTES TEMPERATURES D'ENTREE : (▲) 130°C ; (■) 140°C ; (○) 150°C ; (□) 160°C ; (△) 170°C CONDITIONNEES SOUS VIDE, GARDEES A 20- 25°C.

CONSERVATION EN JOURS	Log DU NOMBRE DE CELLULES VIABLES/ G DE POIDS SEC.					
	AVANT ATOMISATION	APRES ATOMISATION				
		Sans support	Amidon soluble	Malto-dextrine	Lait I% cystéiné	Lactose
0	IO,74	8,I4	9,07	9,25	8,66	8,64
I2	-	7,48	7,63	8,94	8,30	8,I4
60	-	7,06	7,00	8,47	7,77	7,27
I20	-	6,46	7,04	8,30	7,4I	7,IO

TABLEAU 21 INFLUENCE DE LA NATURE DU SUPPORT SUR LE NOMBRE DE CELLULES REVIVIFIABLES DE R. MELILOTI $M_9Sm_I^{Str}$, OBTENUES PAR ATOMISATION ET CONSERVEES SOUS VIDE A 20 - 25°C.

Comme pour la lyophilisation c'est la malto - dextrine qui semble être le meilleur support de ~~lyophilisation~~ d'atomisation pour $M_9Sm_I^{Str}$, dans nos conditions expérimentales. Après I20 jours de conservation sous vide à 20 -25 °C le taux de cellules viables est voisin de IO^8 par gramme.

b. 4. Conservation des bactéries atomisées à I30°C, sur malto-dextrine, et conservées à 20 -25°C.

La fig. 26 montre que les résultats les plus satisfaisants sont obtenus quand les cellules atomisées dans ces conditions, sont conservées sous azote. La conservation sous vide est encore très satisfaisante.

Après 300 jours de conservation sous vide ou sous azote, à 20 - 25°C le taux de cellules viables est toujours voisin de 10^7 à 10^8 bactéries par gramme de poids sec . La conservation en présence d'air n'est pas recommandable.

III . DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

Les travaux antérieurs effectués au laboratoire,dans ce domaine (5-19-88-91)ont montré des différences quelquefois importantes dans la survie des cellules déssechées. Ces auteurs ont toutefois travaillé avec des souches (M I-5 , 2 OII Str) et des milieux différents du nôtre (R.C., T.Y. ,milieux industriels) et bien souvent dans des conditions de culture en fiole,plus difficilement reproductibles. Ces variations peuvent,par exemple, être dues à des différences d'aération. RAY 1973 (120) montre en effet que l'aération de la culture peut avoir une grande influence sur la survie des bactéries lyophilisées. Nos efforts ont donc d'abord porté sur la standardisation de la production de la masse bactérienne,par fermentation. Le pourcentage de survie de R. meliloti est aussi fonction du nombre de cellules avant séchage. La réussite de la dessiccation dépend donc d'abord de la concentration cellulaire initiale.

Dans tous nos essais de deshydratation de cellules nous n'avons pas étudié l'influence de l'âge des cellules sur la conservation, AMARGER 1972 (1) ayant démontré que la conservation de R.meliloti est meilleure quand la dessiccation est pratiquée sur des cellules prélevées en début de phase stationnaire plutôt qu'en phase exponentielle.

Pour MERCIER I978 (88) le milieu de culture lui même est un bon support de dessiccation,il peut jouer un rôle protecteur certain dans la conservation. BARNET I978 (5) précise même que le rôle des polysaccharides dans la protection des cellules au cours du séchage est négligeable à côté de celui du milieu qui a servi à la culture.

Nous pouvons penser qu'il existe vraisemblablement une action synergique de tous les éléments présents (polysaccharides, produits de sécrétion du métabolisme, macromolécules de lyse cellulaire). Cette action peut-être encore renforcée par l'utilisation d'un support judicieusement choisi :la malto-dextrine dans notre cas. Cet agent protecteur semble aussi valable pour la lyophilisation que pour le séchage par atomisation.

Certains auteurs, comme LION et BERGMANN I96I (75_76)pensent qu'il est possible d'obtenir des taux de survie élevés en l'absence d'agent protecteur, à condition d'éviter tout contact entre les cellules et l'oxygène,ce qui est difficilement envisageable industriellement .

L'effet letal serait explicable par la formation de radicaux libres ou d'altérations des acides nucléiques,irréversibles en présence d'oxygène. Dans la pratique nous nous sommes rendus compte que l'évolution de la mortalité après traitement suit une loi exponentielle, et il est impératif de mettre, sous vide ou sous azote, rapidement les cellules deshydratées.

Il faut aussi insister à ce sujet sur le choix important des techniques de " revivification " à utiliser pour dénombrer les les cellules réellement viables. Il est certain que toutes les cellules vivantes dans un tel inoculum ne sont pas revivifiables.

Nous pensons donc, comme FRY et GREAVES I95I (49) que la nature de l'agent protecteur est très important sur la survie .

De très nombreux produits ont déjà été utilisés pour protéger les bactéries pendant et après séchage : lait, sérum,dextrine, divers hydrates de carbone etc..... Il faut remarquer que le glutamate de sodium est largement utilisé pour la conservation du vaccin BCG pour les régions tropicales,OBAYASHI I957, I96I (107_108)

Différentes hypothèses ont été émises pour essayer d'expliquer l'efficacité des agents protecteurs:

I°) Pour SCOTT I960 (133) et MARSHALL I974 (85) ces agents agissent en neutralisant les groupements carbonyl. La cause essentielle de la mort des bactéries durant le séchage et la conservation serait due à des réactions entre ces groupements et les groupements aminés des protéines cellulaires.

2°) Pour REDWAY et LAPAGE (121) l'efficacité des agents protecteurs tels que les hydrates de carbone est essentiellement due à leur pouvoir de retention d'eau.

3°) Pour MORICHI I970 (92) ,cet effet peut-être dû à la création de ponts hydrogène, assurant la stabilité entre divers constituants cellulaires, à la place des molécules d'eau en phase hydratée.

4°) Pour ORNDORFF et coll. 1973 (109) le maintien par les additifs d'une matrice amorphe dans les cellules deshydratées est le facteur le plus important influençant les taux de survie.

En fait nos résultats satisfaisants de séchage de cellules par atomisation sont à rapprocher de ceux de BOUSFIELD 1976 (18). Cet auteur trouve que le séchage à partir d'une phase liquide, sans congélation préalable, donne des taux de survie plus élevés que ceux obtenus par lyophilisation de suspensions similaires. Il utilise la méthode de ANNEAR 1958 (2) pour conserver des bactéries qui supportent mal la lyophilisation. Cette méthode couramment appelée " L - drying " est largement utilisée par les souchiers internationaux. LAPAGE 1970 (74) maintient à 20°C la suspension bactérienne pour éviter qu'elle ne se congèle sous vide. Cette méthode est en fait une évaporation rapide de l'eau de suspension, comme au cours de l'atomisation.

Il est important maintenant d'évaluer l'infectivité et l'efficience des inoculums en poudre que nous avons préparés.

B. EVALUATIONS DE L' INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DES CELLULES DESHYDRATEES.

Après I20 jours de conservation sous vide à température ambiante (20 - 25°C)les numérations montrent qu'il reste dans les inoculums séchés par atomisation environ IO^8 bactéries viables par gramme de poids sec. Ce taux semble rester assez stable pendant 300 jours. Les simples comptages bactériens ne sont pourtant pas suffisants . Comme nous l'avons déjà dit il est important de déterminer la concentration exacte en Rhizobium infectants et efficients dans les inoculums préparés et conservés,et de vérifier si les qualités originelles des souches ne sont pas modifiées.

I . EVALUATION DE LA CONCENTRATION EN RHIZOBIUM INFECTANTS DANS LES INOCULUMS DESHYDRATES.

A partir des poudres conservées 300 jours en flacons sous vide (0,5 g /flacon) on réalise des suspensions-dilutions en tampon T.N.P La suspension mère est réalisée en injectant 50 ml. du tampon à travers l'opercule du flacon (dilution IO^{-2}). A usage de témoins,des dilutions sont également réalisées à partir de suspensions contenant IO^8 bactéries par ml.,avec les souches M9S , MI-5^{Str} , 20II ^{Str3} et $M_9Sm_I^{Str}$. Dix plantules de luzerne ,cultivées aseptiquement sur milieu de NICOL et THORNTON à pH 7,2 sont inoculées avec I ml. de ces dilutions . Les pourcentages de plantules bien développées et pourvues de nodosités sont déterminés après 40 jours de culture.

D'après les résultats figurant dans le tableau 22 on constate que les bactéries séchées par atomisation et lyophilisation ,et conservées 300 jours sous vide,peuvent déclencher normalement la symbiose sur la luzerne, dans nos conditions expérimentales . Les dilutions limites pour lesquelles les plantules sont bien développées et présentent des nodules rougeâtres (présence probable de leghémoglobine) sont voisines de 10^{-6} et 10^{-7}. La poudre de Rhizobium meliloti atomisée présente donc des qualités satisfaisantes de conservation.

PLANTULES INOCULEES PAR	DILUTIONS DECIMALES							
	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0
M9S *	100	100	100	100	100	90	10	0
MI-5 ^{Str} *	100	100	100	100	100	100	0	0
20II ^{Str3} *	100	100	100	100	100	90	10	0
M9Sm$_I$ ^{Str} *	100	100	100	100	90	80	0	0
M9Sm$_I$ ^{Str} lyophilisé	100	100	100	90	80	20	0	0
M$_9$Sm$_I$ ^{Str} atomisé	100	100	100	100	70	10	0	0

TABLEAU 22 : POURCENTAGES DE PLANTULES DE LUZERNE (MEDICAGO SATIVA) POURVUES DE NODULES, 40 JOURS APRES L'INOCULATION DE SUSPENSIONS - DILUTIONS DE CELLULES FRAÎCHES ET DESHYDRATEES DE R. MELILOTI.

* souches non deshydratées.

II. EVALUATION DE L'INFECTIVITE, DE L'EFFICIENCE, ET DE L'ACIDO - TOLERANCE DES CELLULES DESHYDRATEES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$.

Des essais sur plantules cultivées sur milieu de NICOL et THORNTON à pH 7,2 et à pH 6 sont réalisés avec les mêmes souches de R. meliloti que précédemment et les cellules deshydratées de $M_9Sm_I^{Str}$. Chaque souche est éprouvée sur 6 plantules . Celles-ci sont inoculées avec environ 10^6 cellules de souches témoins et I ml. de la dilution 10^{-2} pour les inoculums deshydratés.

La fixation est appréciée, après 40 jours de culture, par mesure :

a) du nombre moyen de nodules par plantule.
b) du poids sec moyen des plantules.
c) de la fixation d'azote par le test de réduction de l'acétylène.

Les résultats rassemblés dans les tableaux 23 et 24 , montrent tout d'abord que pour toutes les plantules inoculées la souche $M_9Sm_I^{Str}$ deshydratée par atomisation (et lyophilisation) ne perd pas de son infectivité et reste aussi efficiente à pH 6 qu'à pH voisin de la neutralité. Les procédés de culture en masse, de concentration sous vide, et de dessication ne modifient donc pas les qualités symbiotiques des souches de R. meliloti.

A pH 6, toutes les valeurs trouvées pour $M_9Sm_I^{Str}$, deshydratée ou non, sont supérieures à celles des témoins et en particulier à celles de M9S dont elle est issue.

	TEMOIN NON INOCULE	M9S *	M I-5 Str *	M2OII Str *	M9Sm1 Str *	M9Sm1 Str lyophilisé	M9Sm1 Str atomisé
Nombre de plantules	6	6	6	6	6	6	6
Plantules nodulées (%)	O	IOO	IOO	IOO	IOO	IOO	IOO
Nombre moyen de nodules plantule $^{-I}$	O	7,IO	9,4O	5,2O	IO,IO	9,2O	9,4O
Poids sec mg . plantule $^{-I}$	8,4I	I3,89	I9,24	IO,86	I2,24	II,73	I2,I8
△Q:éthylène produit n moles . plantules $^{-I}$. heure $^{-I}$	2,O3	48,24	63,42	33,84	4O,I4	39,27	4I,I2

TABLEAU 23 : EFFICACITE SYMBIOTIQUE DE LA LUZERNE (MEDICAGO SATIVA), APRES 4O JOURS DE CULTURE EN MILIEU DE NICOL ET THORNTON A pH 7,2 , INOCULEE PAR DIFFERENTS R. MELILOTI.

* souches non deshydratées.

	TEMOIN NON INOCULE	M9S *	M I-5 Str *	M2OII Str *	M9Sm1 Str *	M9Sm1 Str lyophilisé	M9Sm1 Str atomisé
Nombre de plantules	6	6	6	6	6	6	6
Plantules nodulées (%)	O	IOO	IOO	IOO	IOO	IOO	IOO
Nombre moyen de nodules plantule $^{-1}$	O	5,IO	7,O5	4,3O	8,6O	8,2O	7,9O
Poids sec mg . plantule $^{-1}$	5,88	I4, 72	I5,35	9,87	I6,O5	I5,89	I5,43
ΔQ:éthylène produit n moles . plantule $^{-1}$. heure $^{-1}$	I,6O	44,I3	46,45	3I,23	53,IO	47,78	5I,48

TABLEAU 24 : EFFICACITE SYMBIOTIQUE DE LA LUZERNE (MEDICAGO - SATIVA), APRES 4O JOURS DE CULTURE EN MILIEU DE NICOL ET THORNTON A PH 6,O , INOCULEE PAR DIFFERENTS R. MELILOTI.

* souches non deshydratées.

Il ne semble donc pas y avoir non plus de modification de l'acido-tolérance de cette souche. On remarquera toutefois que pour toutes les souches essayées l'acidité inhibe partiellement la nodulation,moins de nodules apparaissent à pH 6 qu'à pH 7,2 . L'efficience satisfaisante de la souche M I - 5 ^{Str},tant à pH 7,2 qu'à pH 6,et les travaux de RAKOTOARISOA (118) nous font croire qu'il peut être intéressant d'envisager la mise au point d'un inoculum deshydraté mixte contenant à la fois la souche acido-tolérante $M_9Sm_I^{Str}$ et la souche très efficiente MI-5^{Str}.

Comme MARTINEZ (86) nous constatons le manque de corrélations entre le nombre de nodules chez la luzerne et l'efficience des souches de R. meliloti . Par contre les plantes ayant des nodules rosés réduisent plus intensément l'acétylène que les nodules incolores.

Il est nécessaire de remarquer que la méthode de réduction de l'acétylène,certes très pratique et utile,manque souvent de précision et est sujette parfois à d'importantes variations opératoires. De plus les nombres réduits de plantules utilisées ne nous permettent pas de donner une valeur statistique à nos résultats.

Il est évident que ces évaluations très partielles doivent être complétées par des vérifications plus étendues ,au laboratoire mais aussi en champs expérimentaux.

C TENTATIVE DE SELECTION D'UNE SOUCHE DE $M_9Sm_1^{Str}$ "ANHYDRO -RESISTANTE."

Nous avons vu précédemment que la déshydratation par atomisation conduit à la perte d'un nombre important de cellules, essentiellement par destruction thermique. Le séchage par lyophilisation provoque également une perte,mais ici plutôt par choc thermique et oxydation élevée des bactéries présentes. En séchant, par atomisation,ou lyophilisation,une culture de Rhizobium , même en l'absence de support,il subsiste un certain nombre de cellules survivantes dans la poudre. La proportion de ces bactéries survivantes par rapport aux bactéries initiales varient beaucoup suivant les critères de lyophilisation et d'atomisation adoptés.

Nous n'avons retenu,pour des raisons d'ordre pratique, que le procédé de lyophilisation pour nos essais de sélection de R. meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ "anhydro-résistants".

Si l'on reprend une poudre lyophilisée (L_1) pour en faire une nouvelle culture abondante en milieu R.S.,que l'on sèche à nouveau par lyophilisation, le pourcentage de cellules survivantes dans cette poudre (L_2) est plus élevé que dans la première. Avec cette deuxième poudre on procède à une troisième culture dans les mêmes conditions. Cette culture séchée à son tour donne une poudre (L_3) dont le taux de bactéries vivantes est encore plus élevé que celui de la deuxième poudre.

La fig.27 représente les résultats que nous avons obtenus après 6 lyophilisations successives. La dernière poudre obtenue a non seulement un pourcentage de Rhizobium vivants important$ (47%) mais ceux-ci possèdent des propriétés d'infectivité et d'efficience comparables aux cellules initiales.

On peut donc penser que la cryorésistance et l'"anhydro-résistance" sont accrues après plusieurs lyophilisations successives,dela même façon que la thermorésistance de certaines espèces microbiennes est augmentée après plusieurs stérilisations incomplètes successives ; il ne s'agit pas seulement,croyons nous,de résistance au froid ou au choc thermique,mais aussi à la déshydratation des bactéries.

Dans le cas ou l'on désire faire une inoculation avec deux souches il est possible d'envisager les mêmes opérations sur chacune des deux souches séparément et de procéder ensuite au mélange des deux poudres dans le rapport souhaité.

Il est vraisemblable que ces cellules de Rhizobium qui supportent mieux l'effet de la lyophilisation,auront un taux de mortalité plus faible et qu'elles resteront plus longtemps en vie ,non seulement dans la poudre mais aussi sur les graines des légumineuses ou dans le sol. Nous envisageons de poursuivre nos travaux dans ce domaine et d'appliquer le même principe au séchage par atomisation.

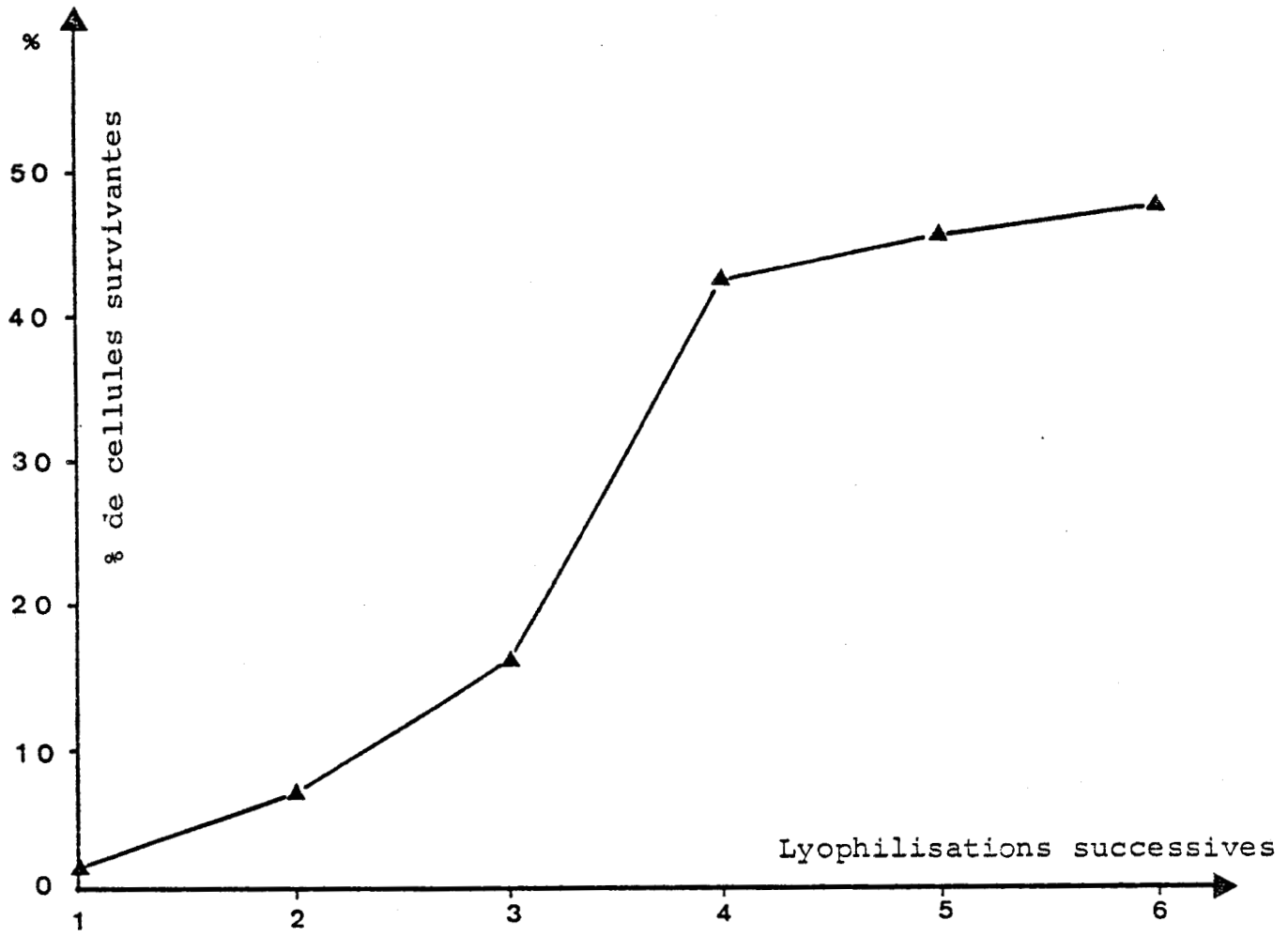


FIG.27 SELECTION DE CELLULES DE R. MELILOTI $M_9Sm_1^{Str}$ " ANHYDRO -RESISTANTES " PAR LYOPHILISATIONS SUCCESSIVES.

LILLE

D DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

Les technologies de culture en fermenteur, et de deshydratation par atomisation de cellules de R. meliloti que nous avons mises au point sont simples et peuvent être envisageables en continu . Nous avons supprimé les étapes nombreuses,longues et coûteuses des procédés habituels : centrifugation, lavage et reprises des cellules, utilisation de support liquide stérile; elles sont souvent la source de contamination.

Le milieu de culture synthétique contenant un nombre élevé de cellules viables est tout d'abord concentré,ce qui condense en même temps les substances protectrices présentes dans le milieu de fermentation . Puis après addition de malto- dextrine en poudre pratiquement stérile, il est déshydraté par atomisation contrôlée. Le taux de survie et la stabilité dans le temps des cellules bactériennes dépendent des températures du traitement et des conditions physiques de conservation de la poudre : atmosphère et température de conservation essentiellement .

L 'atomisation réalisée dans des conditions adéquates nous a donné des résultats au moins aussi satisfaisants que ceux obtenus par les moyens de lyophilisation à notre disposition.

Après 300 jours de conservation sous vide, à la température de 20 - 25°C, notre inoculum en poudre,dont l'humidité résiduelle est voisine de I6%,contient IO^7 à IO^8 bactéries viables par gramme.

Les procédés de culture, de dessiccation, et de conservation que nous avons mis en oeuvre ne semblent pas modifier, selon nos expérimentations, les propiétés particulières ni l'efficience des souches de Rhizobium .

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par BONNIER, CORNET et coll. 1980 (17) avec R. meliloti M I-5 et R. japonicum 3 -I5 et 3 -I5B3 . Pour ces auteurs un inoculum peut-être considéré comme satisfaisant s'il renferme 10^6 bactéries viables par gramme (communication personnelle, BONNIER C. 1979)

Chapitre IV

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE.

L'utilisation d'inoculum contenant un grand nombre de de cellules de R. meliloti sélectionnées et ayant une capacité élevée de fixer symbiotiquement l'azote avec la luzerne (Medicago-sativa) est l'une des conditions à l'établissement de cette culture dans beaucoup de sols.

Après étude des cultures de Rhizobium en milieux complets nous avons trouvé, dans nos conditions expérimentales, que :

- le milieu de LURIA ne permet pas une croissance abondante pour l'ensemble du genre Rhizobium.
- le milieu T.Y. permet une croissance satisfaisante, mais favorise le développement de cellules "anormales" de type "bactéroïdes".
- la production de cellules viables de Rhizobium dans le milieu d'ISWARAN est toujours abondante, mais le taux important d'exopolysaccharides formés peut provoquer des difficultés technologiques de récupération dues à la viscosité.

La recherche du milieu synthétique le plus favorable pour la croissance de R. meliloti nous a conduit à définir un nouveau milieu entièrement synthétique : le milieu R.S.

Sa composition en gramme par litre d'eau distillée est la suivante :

HK_2PO_4 (MERCK) ..... 0,5 g

$MgSO_4$, $7H_2O$ (MERCK)..... 0,2 g

Glutamate de Sodium (ORSAN)..... 2,0 g

Fructose (ROQUETTE) .....IO,O g

Biotine (ROCHE)..... IO^{-5} g

Thiamine HCl (ROCHE) .....5. IO^{-4} g

pH final à 25°C.....7,2

Nous avons utilisé des produits facilement disponibles et peu onéreux.

Ce milieu nous a permis d'obtenir des quantités de cellules de R. meliloti supérieures à celles obtenues dans les milieux synthétiques connus et très proches de celles produites en milieux complets.

Les conditions optimales de production sont :

- un ensemencement important de l'ordre de IO^7b/ml réalisé à partir d'une préculture,en phase exponentielle,dans le même milieu.
- une température d'incubation de 30°C
- un pH initial du milieu de 7,O - 7,2
- un coefficient de transfert volumétrique d'oxygène (K_L.a) voisin de 25 à 30 mMO_2/l.h.

Dans ces conditions expérimentales une fermentation de 12 litres permet de recueillir,après 40 heures et sans modification de pH,une biomasse d'environ 6. IO^{I3} cellules bactériennes.

L'absence totale d'extrait de levure et de doses élevées d'acides aminés évite les inhibitions et les altérations cellulaires rencontrées avec certains milieux complets et industriels.

La synthèse d'exopolysaccharides dans notre milieu R.S. est suffisante pour protéger les cellules bactériennes et compatible avec les opérations de récupération.

Le milieu de culture contenant un nombre élevé de cellules viables est d'abord concentré par centrifugation sous vide. Après addition de malto- dextrine comme support protecteur il est deshydraté par atomisation. Le taux de survie et la stabilité des bactéries déshydratées sont les plus satisfaisants quand la température de l'air entrant dans l'atomiseur est voisine de I30 - I40°C .

L'inoculum en poudre ainsi préparé contient encore, après 300 jours de conservation sous vide à température ambiante (20 à25°C), IO^7 à IO^3 bactéries viables par gramme. Celles ci restent capables de déclencher le phénomème symbiotique dans nos conditions d'expérimentation.

La sélection d'une souche " anhydro-résistante " par lyophilisations successives nous a permis de préparer un inoculum présentant un taux de survie très amélioré (45%). La faible dose nécessaire pour son utilisation, estimée à 50g/ha ,l'encombrement réduit de sa présentation, doivent permettre de l'expédier à longue distance et dans les pays en voie de développement.

Notre inoculum peut être facilement utilisé pour l'absorption sur un substrat solide ou pour l'imprégnation ou l'enrobage des graines.

L'étude économique de la méthode industrielle que nous préconisons est en cours de réalisation.

Dans le cadre de la poursuite de ces travaux de laboratoire nous envisageons de rechercher le mode d'application le mieux adapté. Si les résultats que nous avons obtenus sont bien reproductibles il est indispensable de porter à une échelle plus importante les essais d'inoculation. Nous pensons également mettre au point des procédés nouveaux d'inoculation à l'aide de bactéries mélangées à des fertilisants ou incluses dans des composés pouvant les libérer progressivement. Nous éviterions ainsi les techniques d'imprégnation des graines, toujours difficiles à effectuer convenablement.

L'obtention d'un inoculum convenable va nous permettre d'étudier plus facilement les phénomènes de compétition intervenant dans le sol. En effet, quels que soient les progrés réalisés dans la sélection génétique des souches et dans la mise au point des inoculums ,le problème majeur de leur compétitivité vis-à-vis des souches sauvages indigènes subsiste.

Bibliographie

(I) AMARGER N., JACQUEMETTON M., BLOND G. (I972). Influence de l'âge de la culture sur la survie de R. meliloti à la lyophilisation et à la conservation après lyophilisation . Archiv.für Mikrobiol., 8I : 36I-366

(2) ANNEAR D.I. (I958). Observations on drying bacteria from the frozen state and from the liquid state . Aust. J. of Exp. Biol. and. Med. Science 36 : 2II - 22I

(3) ARIAS A.; MARTINEZ-DRETS G. (I976). Glycerol metabolism in Rhizobium. Can. J. Microbiol. 22 : I50-I53

(4) BALDWIN I.L.; FRED E.B. Nomenclature of the root nodule bacteria of Leguminosae J. Bact , I7 : I4I - I50

(5) BARNET J. (I978) Mémoire de fin d'études. Institut Supérieur Industriel . Anderlecht. Belgique

(6) BECHET M. (I979). Recherches sur l'acide désoxyribonucléique de Rhizobium meliloti . Thèse de 3ème cycle . Université des Sciences et Techniques de Lille I .

(7) BERGERSEN F.J. (I96I) . The growth of Rhizobium in synthetic media. Aust. J. Biol. Sci., I4 : 349 - 360

(8) BERGERSEN F.J. (I970). Quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene - reduction Aust.J. Biol. Sci. 23(5) : IOI5-IO25

(9) BERINGER J.E. (I973) . Genetic studies with R.leguminosarum. Thesis Dr Philosophy University of East-Anglia. USA.

(IO) BERINGER J.E. (I974) . R. Factor Transfer in Rhizobium leguminosarum . J. Gen. Microbiol., 84: I88 -I98

(II) BERSTEIN L. , OGATA, G. (I966). Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans and alfafa. Agron. J., 58 : 20I -203

(I2) BONNIER C. (I960). Symbiose Rhizobium-légumineuses. Aspects particuliers aux régions tropicales. Ann. Inst. Pasteur Paris, 98 : 538 -556

(I3) BONNIER C. (I962). Relation entre la spécificité et l'efficacité des souches de Rhizobium . Ann. Institut Pasteur Paris, I03 : 403

(I4) BONNIER C., LALOUX R.,LEBRUN F., WEICKMANS L.(I964).Bull. Inst. Agron. Stat. Rech. Gembloux, 32 : I63-I70

(I5) BONNIER C.,LEBRUN F. (I965) Influence du nombre de Rhizobium inoculés sur la production des luzernières. Ann. Inst. Pasteur supt. n° 3 : 95- I02

(I6) BONNIER C., BRAKEL J. (I969) Lutte biologique contre la faim. Légumineuse-Rhizobium . Les Presses Agronomiques de Gembloux A.S.B.L. Ed. Duculot S.A. Gembloux.

(I7) BONNIER C., CORNET D., SAIVE R. (I980) Rapport d'activité,Comité pour l'étude de la fertilité biologique du sol(I.R.S.I.A). Publication du centre d'étude des Légumineuses N° I4 : I-7

(I8) BOUSFIELD I.J., A.R. Mac KENZIE(I976). Inactivation of Bacteria by Freeze-drying In Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes 328 -344 . Eds. F.A. Skinner and W.B. Hugo Academic Press. London. New-York .

(I9) BOUTELET F. (I977) Mémoire de fin d'études Inst. Sup. d'Agric. de Lille. Univ. Sc. et Tech. Lille I

(20) BRAKEL J. , MANIL P. (I964) Fumure azotée et fixation symbiotique d'azote chez Phaseolus vulgaris Rev. de l'Agric. I7(4): 465 -469

(2I) BRAKEL J. (I965) Un dispositif pour l'étude de la symbiose Rhizobium-légumineuses en conditions aseptiques . Biologie du sol Bull.Int. Inform. 4 : 22-29.

(22) BRAKEL J.,MANIL P (I965) La fixation symbiotique de l'azote chez le haricot (phaseolus vulgaris L.). Essais de bactérisation par Rhizobium phaseoli.Bull. Inst. Agron. Stat. Rech. Gembloux 33 : 3 -25

(23) BRAKEL J. (I966) La fixation symbiotique chez le haricot (Phas. vulg. L.). Comparaison de l'activité fixatrice de diverses souches de Rhizobium Bull. Rech. Agron. Gembloux,N.S. I :525-529

(24) BROCKWELL J. (I977). Application of Legume Seed Inoculants. In. "A Treatise on Dinitrogen Fixation". Section IV.Agronomy and Ecology : 277-305

(25) BURRIS,R.H.,WILSON P.W. (I957). Methods for mesurement of nitrogen fixation. In: Methods in Enzymology.Vol.4. S.P. Colowick and N.O. Kaplan.Eds. Academic Press,New York: 365-367

(26) BURTON J.C. (I976). Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In. P.S. Nutman, Symbiotic. nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press,Cambridge 7 : I75 - I89

(27) CORNET D. , DEROY J.,HERMAN A. (I980) Rapport d'activité. Comité pour l'étude de la fertilité biologique du sol (I.R.S.I.A.) Publication du centre d'Etudes des Légumineuses I4 : I - 7

(28) COURTOIS B., DERIEUX J.C., HORNEZ J.P.(I975). Etude des polyosides de Rhizobium à croissance rapide. Ann.Institut Pasteur, Paris,I26 (I) :I - I5

(29) COURTOIS B. (I975) Etude des polyosides de Rhizobium.Thèse de 3ème cycle.(Université des Sciences et Techniques LilleI.)

(30) COURTOIS B.,HORNEZ J.P.,DERIEUX J.C. (I979) Effet de la synthèse d'acide-2-céto-gluconique sur la production d'exopolysaccharides par une souche de R.meliloti . Can. J. microbiol. 25 (IO) : II9I - II96.

(3I) DATE, R.A. (I968) In " Transactions of the Ninth International Congress of Science Transactions" Ed. J.W. JONES) vol. 2, pp.75-83. ISSS/ Aug. and Roberton. Sidney. Cité par STRIJDOM (144)

(32) DATE,R.A. (I972) Sources and quantities of yeast extract for growth of Rhizobia.J. Appl. Bacteriol.,35 : 379 -387

(33) DAVIDSON,F.,REUZER,H.W. (I978), Persistence of Rhizobium japonicum on the soybean seed coat under controlled temperature and humidity. Appl. and Env. Microbiol., 35 (I): 94-96

(34) DELATTRE J.M. (I97I) Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium. Thèse de Docteur Ingénieur (Université des Sciences et Techniques deLille).

(35) DELATTRE J.M., DELEPLANQUE A. (I97I). Etude des caractères physiologiques et biochimiques de 63 souches isolées de nodules de légumineuses. Ann. Inst. Pasteur. Lille, 22 : 2I5 -230

(36) DEFIVES C. (I977). Etude de la cryorésistance des spores de Bacillaceae . Thèse de 3ème cycle. (Université des Sciences et Techniques de Lille).

(37) DINO, J.C. (I972). Le séchage par atomisation (document Niro-Atomizer).

(38) DILWORTH M.J. (I966) Acetylen reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum , Biochem. Biophys. Acta, I27 : 285 -294

(39) DÖBEREINER J. , CAMPELO A.B. (I977) Importance of Legumes and their contribution to Tropical Agriculture. In " A Treatise on Dinitrogen Fixation Section IV: Agronomy and Ecology" (Ed. Hardy R.W.F. and GIBSON A.H. : I9I-220

(40) DÖBEREINER J. (I966) Manganèse toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (Phaseolus vulgaris L.) in acid soils. Plant and soil, 24 :I53 - I66

(4I) DOMMERGUES Y.R., HOANG G. DIEM, DIVIES C., (I979). Polyacrylamide-Entrapped Rhizobium as an Inoculant for Legumes. Appl. and Env. Microbiol. 37 (4): 779-78I

(42) DUDMAN W.F. (I959) Cellulose production by Acetobacter antigenus and others Acetobacter spp. J. Gen. Microbiol., 2I : 327-337

(43) DUDMAN W.F. (I964). Growth and Extracellular polysaccharide production by R.meliloti in Defined Medium. J. of. Bacteriol., 88 : 640 -645.

(44) ERTOLA R.J., LA MAZZA, A.P. BALATTI, C.M. CUEVAS, DAGUERRE R. (I969). Effect of composition of medium and oxygen supply rates on growth of R. meliloti. Soil. Science, I08 : 373 - 380

(46) FERRY P., BLACHERE H., OBATON M., (I959) Un milieu de culture synthétique pour R.meliloti. Ann. Agro., II :2I9 -233 .

(47) FRASER M.E. (I966). Pré-inoculation of lucerne seed. J. Appl. Bact. 29(3) : 587-595

(48) FRED E.B., BADLDWIN I.L. Mac COY E.(I932) In "Root,nodule bacteria.and leguminous plants".Univ. Wisconsin Press, Madison.

(49) FRY,R.M, GREAVES,R I.N. (I95I) The survival of bacteria during and after drying. J. of Hygiene 49 : 220 -246

(50) GRAHAM,P.H. (I963). Vitamin requirements of root nodule bacteria. J. Gen. Microbiol., 30 :245-248

(5I) GROS F, JACOB F, ROYER. P. (I979), in "Sciences de la vie et Société" rapport présenté à M. le Président de la République . La documentation française. Paris.

(52) GULATI, S.L., SETH,V.K. (I973) . An improvised portable fermentor for small-scale production of Rhizobium culture. Curr. Sci. 42 : 394 -397.

(53) GULATI,S.L. (I978). A comparative study of different factors involved in mass cultivation of Rhizobium , using shakers and fermentors. Zbl. Bakt.,II Abt, Bd. I33 : 638 - 642.

(54) GULATI,S.L., SETH,V.K.(I978) Some aspects of fermentation of Rhizobium leguminosarum with reference to economy of ingredients in the substrate. Zbl.Bakt. II Abt., Bd. I33: 643 -646

(55) GULATI S.L. (I979) New Non-Synthetic Medium for Rhizobium Culture Production from Wastes. Biot. and Bioengin. 2I(9):I507-I5I5

(56) HADJIPETROU L.P.,LIGERI P.,GERRITS,J.P., TEULINGS F.A.G., STAUTHAMER A.H.(I964) J. Gen. Microbiol.,36 :I39-I50

(57) HALE,C.N.,HASTINGS H,(I978) Legume Seed inoculation. NZ Journal of Agric.,I36(7) : 26-27

(58) HAMDI ,Y.A (I969) Effect ofD,L, and D.L-methionine on growth and efficiency of R.meliloti strains.Plant soil.3I:III-I2I

(59) HARDY,R.W.F.,HOLSTEN,R.D.,JACKSON,E.K.,BURNS,R.C.(I968) The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation : Laboratory and field evaluation. Plant physiol., 43 : II35-I207

(60) HOLDING,A.J. LOWE,J.F.(I97I). Some effects of acidity and heavy metals on the Rhizobium -leguminous plant association. Plant Soil,Special volume :I53-I66

(6I) HORNEZ,J.P. (I976). Etude des voies de dégradation du glucose et et du fructose chez Rhizobium meliloti.(Thèse de 3ème cycle (Université des Sciences et Techniques.Lille.)

(62) HORNEZ,J.P., COURTOIS,B. et DERIEUX,J.C.(I976). Mise en évidence de voies de métabolisme différent à partir du glucose ou du fructose chez Rhizobium . CR. Acad. Sci. Paris, 283 :I559-I562

(63) IMSHENETSKII.A.A., PARIISKAYA,A.N., GORELOVA.O.M. (I976) Study of survival of Rhizobium meliloti using Genetic Markers . Microbiology,45 : 945 -946.

(64) ISWARAN V., JAUHRI K.S.(I969). Malt extractas a source of carbon for large scale production of Rhizobium inoculants.Curr. Sci. , 38 : 67 -72

(65) ISWARAN,V., SUNDARA RAO W.V.B.,JAUHRI,K.S., MAGHU,S.P.(I970) . Effect of temperature on survival of Rhizobium japonicum in soil and peat . J. Agric. Sci.,4 : I05 - I07

(66) ISWARAN,V. SEN A., APTER,R. (I973) A simple medium for quick growth of R. japonicum Zbl. Bakt. II I28(5) :23-24

(67) ISWARAN V., APTE R., SEN,A (I973) Use of sodium for culture of Rhizobium spp. Zbl. Bakt. Abt.II , I28 . 240 -242

(68) JENSEN ,H.L. (I96I) Survival of Rhizobium meliloti in soil culture. Nature , I92 : 682- 683

(69) JOHNSTON A.W.B.,BERINGER J.E.,(I975) Identification of the Rhizobium Strains in Peat Root Nodules Using Genetic Markers J. Of Gen. Microbiol., 87 :343 -350

(70) JORDAN D.C. Studies on the legume root nodule bacteria II the Studies on the legume root nodule bacteria II The production and behavior of colonial mutants produced by X - ray irradiation C.J. Bot I952 30 I25 - I30

(70) JORDAN ,D.C.(I962) -The Bacteroids of the genus Rhizobium . Bact. Rev., 26(2) : II9 -I4I

(7I) KEELE,B.B.,HAMILTON,P.B., ELKAN,G.H.(I969) Glucose Catabolim in Rhizobium japonicum . J. Bacteriol., 97 : II84 - II9I

(72) KOCH, B., EVANS,H.J. (I966) Reduction of acetylene to ethylene by soybean and root nodules. Plant Physiol.,4I : I748 -I749

(73) LAIRD,D.J.(I932) Bacteriophage and the root nodule bacteria Arch. Mikrobiol.,3 : I59 - I93

(74) LAPAGE,S.P. , SHELTON , J.E., MITCHELL,T G MAC KENZIE,A.R. (I970) . Culture collections and the preservation of bacteria, In "Methods in Microbiology "Vol. 3A. Eds Norris,J.R. and Ribbons,D.W.Academic Press.London and New York.

(75) LION,M.B., BERGMANN,E.D.(I96I) I-The effect of oxygen on freeze-dried E. coli . J. Gen. Microbiol.,24:I9I-200

(76) LION,M.B.,BERGMANN,E.D.(I96I) 2-Substances which protect lyophilized E.coli against the lethal effect of oxygen. J. of.Gen. Microbiol.,25 : 29I-296

(77) LION ,M B. (I963) Quantitative of the protection of freeze-dried E.coli against the toxic effect of oxygen. J.of Gen.Microbiol., 32 : 32I-329

(78) LOWE R.H. ,EVANS H.J., SHAUKAI A. (I960) The effect of cobalt on the growth of R. japonicum Bioch. Biophys. Res. Com. 3 675-684

(79) LOWE J.F.,HOLDDING A.J.(I970) In proceedings symposium white clover Research. Ed. J.Lowe British Grassland Soc. Hurley:79-80

(80) LURIA S.E.,BURROUS,J.W.(I957) Hybridization between Escherichia coli and shigella J. Bacteriol., 74 : 46I -476

(8I) MACKINNON P.A.,ROBERTSON J.G.,SCOTT. D.J. ,HALE C.N. (I976) Legume inoculant usage in New Zealand.N Z journal of Exper. Agric. 5 : 35-39

(82) MALETTE M.F. (I969) Evaluation of growth by physical and chemical means.In "Methods in Microbiology" Academic Press, London New York I: 527-539

(83) MAOUI K.R. (I980) Etude du transfert génétique de l'efficience chez Rhizobium meliloti. Thèse de 3ème cycle (Université des Sciences et Techniques Lille I

(84) MARAIS B.(I980) Dispositif de photomètrie automatique pour la mesure de cinétiques en microbiologie - Biophotomètre. Thèse de 3ème cycle.Univ. du Droit et de la Santé de Lille II.

(85) MARSHALL,B.J.,COOTE,G.C., SCOTT W.J.(I974)A study of factors affecting the survival of dried bacteria during storage. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia. Division of Food ResearchTechnical Paper.39 : I -29

(86) MARTINEZ,C.I. (I97I) Statistical evaluation of factors affecting symbiotic nitrogen fixation by alfafa (Medicago sativa) and soybean(glycine max. Merr.)Ph. D. Thesis,University of Wisconsin, Madison, Wisc.

(87) MATSUSHITA K. ,ADACH. O, SHINAGAWAE., AMEAYN A.M.,(I979) Membran bound. D - gluconate deshydrogenase from Pseudomonas Aeginosa Purification and structure of cytochrom binding form. J. biochem,85 : II73 - II8I

(88) MERCIER G. (I978) Mémoire de fin d'études U.E.R. des Sciences Agricoles. Univ. Sc. et Tech. Lille I

(89) MILLER J.H. (I972) Experiments in molecular genetics.Cold Spring Harbor N.Y: p. 43I - 432

(90) MOHAMMEL T. BEN BRAHIM (I980) Contribution à l'étude des bacteriophages de R. meliloti Thèse Dr. d'Université . Uni.Sci. Tech. de Lille I .

(9I) MORENO T.M. (I979) Contribution à l'étude de la préparation de cellules déshydratées de R. meliloti pour l'inoculation de la luzerne. D.E.A. Univ. Sci. et Tech. de Lille I

(92) MORICHI,T. (I970) Nature and action of protective solutes in freeze -drying of bacteria. In "Culture Collections of Microorganisms ,3 Eds Iisuka,H, Hasegawa T. Baltimore and Manchester University Park Press.

(93) MOSELEY B.E.B. ,MATTINGLY A.(I97I) Repair of Irradiated. Transforming Deoxyribonucleic Acid, in Wild type and a Radiation-Sensitive Mutant of Micrococcus radiodurans.J. of. Bacteriol, I05(I) : 976 -983

(94) MULDER EG. ,LIE T.A, HOUWERS A. I977 Importance of Legumes under Temperate conditions. In " A Treatise on Dinitrogen.Fixation Section IV:Agronomy and Ecology (Ed.Hardy R.W.F. and Gibson A.H.) p.p: 22I -242

(95) MUNNS, D.N.(I965) . Soil acidity and growth of a legume. I: Interactions of lime with and phosphate on growth of Medicago sativa .

(96) MUNNS,D.N. (I968) Nodulation of Medicago sativa in solution culture. I. Acid sensitive steps. Plant and soil,28 : I29-I46

(97) MUNNS,D.N. (I968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture.II. Compensating effect of nitrate and of prior nodulation. Plant and Soil,28,N.2: 246 -257.

(98) MUNNS D.N.(I968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. II. Effect of nitrate on root hairs and infection. Plant ans soil. 29 :33-47.

(99) NEIDHARDT F.C.,BLOCH. P.L., SMITH,D.F., (I974) Culture Medium for Enterobacteria. J. of Bacteriol.,II9(3) : 736-747

(IOO) NEUMANN, C (I902) Landew. Vers Sta., 56 : I87-202

(IOI) NICOL ,L.H. and THORNTON, H.G.(I94I) Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume hostProc. Roy. Soc. London ,BI30 :32-59

(IO2) NORRIS,D.O. (I958) Rhizobium needs Magnesium, not calcium.Nature, I82 :734- 735.

(IO3) NORRIS,P.S. (I965) Acid. production by Rhizobium A unifying concept. Plant and Soil,22 : I43-I66

(IO4) NORRIS,D.O. (I97I) Acid and Alkali Production by Rhizobium . Rhizobium News letters I2 : 30 -32

(IO5) OBATON M. ,BLACHERE H. (I963) Observations sur l'inoculation des légumineuses en France. Ann. Inst. Past. PARIS 282-290

(IO6) OBATON M. (I97I)use of spontaneous mutants resistant to antibiotics for the ecological study of Rhizobium. CR. Acad. Sc. série D 272 : 2630 -2633

(IO6') OBATON M. (I97I) Influence de la composition chimique du sol sur l'utilité de l'inoculation des graines de luzerne avec R.meliloti. Plant and Soil. Special.vol.:273-285

(IO7) OBAY. ASHI,Y ,CHO.C. (I957) Further studies on the adjuvant for dried BCG vaccine. Bull. of the. W.H.O. I7 : 255 -274

(IO8) OBAY.ASHI,OTA,S,ARAI,S. (I96I) Some factors affecting the preservability of freeze-dried bacteria J. of. Hygiene.59:77-9I

(IO9) ORNDORFF,G.R. Mac KENZIE,A.P. (I973) The function of the suspending medium during the freeze-drying preservation of E. coli Cryobiology,IO :475-487

(IIO) PACZKOWSKI M.N.,BERRY HILL DL (I979) Survival of Rhizobium phaseoli in coal based legume inoculants. Appl. and. Env. Microbiol.,38(4) : 6I2 -6I5

(III) PATTISON,A.C. , SKINNER,F.A. (I974) The effects of antimicrobial. substances on Rhizobium spp and their use in selective media. J. Appl. Bact.,37: 239 -250

(II2) PEDROSA F.O.,ZANCAN G.T. (I974) L- Arabinose Métabolism in R. japonicum.J. of Bacteriol,II9 :336-338

(II3) PENA CABRIALES,J.J.,ALEXANDER M. Survival of Rhizobium in soils undergoing drying ,Soil Sci. Soc. Am. J. 43 : 962 -966

(II4) PHILPOTTS H. (I976) Filter Mud as a Carrier for Rhizobium Inoculâts.J. of Appl. Bacteriol 4I : 277 - 28I

(II5) PIEN,J. (I979) Les produits laitiers deshydratés: le yaourt, la crème, les fromages: I Le yaourt. La technique laitière : 2I-22

(II6) PRAMANIK M,ISWARAN V. (I973) Survival of Rhizobium japonicum in various carriers.Zbl. Bakt.Abt.II BdI28 :232-239

(II7) QUADLING,C. (I960) Preservation of Xanthomonas by freezing in glycerol broth. Can.J. Microbiol., 6 :475 -478

(II8) RAKOTOARISOA R.R. (I980) Etude d'un mutant acido- résistant de Rhizobium meliloti.Thèse de 3ème cycle. Université des Sci. et Tech. de Lille I

(II9) RATCLIFFE H.D. ,J.W. DROZD (I978) The utilization of L- glutamine and the products of its thermal decomposition by Klebsiella pneumoniae and Rhizobium leguminosarum F.E.M.S. Microbiol 3 : 65-69

(I20) RAY.B.,SPECK M.L. (I972) Metabolic Process During the Repair of Freeze -Injury in E. coli Appl. Microbiol.,24(4) :585 -590

(I2I) REDWAY,K.F, LAPAGE,S.P.(I974) Effect of carbohydrates and related compounds on the long term preservation of freeze-dried bacteria Cryobiology, II :73 -79

(I22) RIGAUD J. (I965) Contribution à l'étude d'un milieu synthétique pour Rhizobium.Ann. Inst. Pasteur ,I09(Supt. 3) : 272-279

(I23) ROBSON,A.D. , LONERAGAN J.F.(I970). Nodulation and growth Medicago truncatula on acid soils.Effects of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of Medicago truncatula on a moderately acid soil. Aust. J. Agric. Res., 2I : 427-434

(I24) ROOS P. (I968) Mise au point d'une unité pilote de fermentation Diplôme d'Etudes approfondies.(Université Sci. et Tech. Lille)

(I25) ROPONEN,I., VALLE,E., ETTALA T. (I970) Effect of temperature on the culture medium,on growth, and nitrogen fixation of inoculated legumes and Rhizobia.Physiol. Plant.,23 : II98-I205.

(I26) ROUGHLEY R.J.VINCENT J.M. (I967) Growth and survival of Rhizobium spp. inPeat Culture. J. appl.Bact.,30 (2) 362-376.

(I27) ROUGHLEY R.J. (I968) Some Factors Influencing the growth and Survival of Root-Nodule Bacteria in Peat Culture J. Appl. Bact. 3I :259 -265.

(I28) ROUGHLEY,R.J. , DART P.J. (I969)Reduction of acetylene by nodules of trifolium subterraneeum as affected by root temperature, Rhizobium strain,and host cultivar. Arch. Mikrobiol.,69 :I7I-I79

(I29) ROUGHLEY R.J.,(I970) The preparation and use of legume seed inoculants.Plant Soil,32 :675-70I

(I30) ROUGHLEY R.J. (I976) In " Symbiotic nitrogen fixation in plants" (ED. P.S. NUTMAN),International Biological Programme 7, pp. I25-I36 Cambridge University Press. Cambridge

(I3I) ROUGHLEY R.J. ,THOMPSON J.A.(I978) The relation ship between the numbers of Rhizobium in broth and the quality of Peat based Legume Inoculants J.of. appl. Bacteriol.;44 :3I7 - 3I9

(I32) SCHÖLLHORN ,BURRIS,R.H. (I967) Acetylen as a competitive inhibitor of N_2 fixation.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,58 :2I3-2I6

(I33) SCOTT W.J. (I960) A mecanism causing death during storage of dried microorganisms. In"Recent Research in Freezing and Drying" eds Parkes,A.S. et Smith,A.V. Oxford : Blackwell Scientific Publications.

(I34) SHERWOOD M.T. (I970) Improved synthetic medium for the growth of Rhizobium J.of Appl. Bacteriol., 33 : 708-7I3

(I35) SHERWOOD M.T. (I972) Inhibition of R.trifolii by yeast extracts or glycine is prevented by calcium.J. of Gen. Microbiol. , 7I:35I-358.

(I36) SHIDA T, KOMAGATA K, MITSUGI K. (I975) Reduction of lag time in bacterial growth.I. effect. of inoculum size and nutrients. J.Gen. Appl. Microbiol. ,27 : 75 - 86

(I37) SHIDA T,KOMAGATA K.MITSUGI K.,(I975) Reduction of lag time in bacterial growth . 2. Effects of inoculum size,and glucose and sodium chloride supplemented in culture media, initial pH of media, and cultural temperature. J. Gen. Appl. Microbiol., 2I : 293 - 303

(I37) SIMON P.,MEUNIER R. (I970) Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique. Masson et Cie Ed. p.259

(I38) SKINNER F.A.,ROUGHLEY R.J. Effect of Yeast Extract Concentration on Viability and Cell Distortion in Rhizobium spp.J. appl. Bactériol. ,43 :287-297

(I39) STEINBORN,J, R.J. ROUGHLEY (I974) Sodium chloride as a cause of low numbers of Rhizobium in Legume Inoculants J. appl. Bact. 37 : 93 - 99

(I40) STEINBERG J. (I938) Applicability of nutrient-solution purification to the study of trace-element requirements of Rhizobium. J. Agric. Research ,57 46I - 467

(I4I) STEWARD,W.D.P., FITZGERALDS,G.P.,BURRIS R.H. (I967) In situ studies on the fixation using the acetylene reduction technique Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,58 : 207I -2078

(I42) STRIJDOM B.W.,ALLEN O.N.,(I965) Medium supplementation with L-and D- Amino Acids relative to growth and efficiency of R. meliloti Can. J. Microbiol. I2 :275 -283

(I43) STRIJDOM B.W.,ALLEN O.N. (I969) Propertiesof strains of R. trifolii after cultivation on media supplemented with -amino-acids. Phytophylactica,I ,I47 -I52

(I44) STRIJDOM B.W.,DESCHODT C.C.(I976). In"Symbiotic nitrogen fixation in plants"(Ed.P.S.NUTMAN),International Biological Programme 7, ppI5I -I68. Cambridge University Press.Cambridge

(I45) SUBBA RAO,LAKSHMI-KUMARIM, SINGH,L.S. MAGU,S.P. (I972). Nodulation of lucern (Medicago sativa L.) under the influence of sodium chloride Ind. J. Agric. Sci.,42: 384 -386

(I46) SUTHERLAND,I.W.(I972). In "Advances in microbial. physiology" Ed A.H. Rose .Vol. 8 I43-2I3 Academic Press Inc. (London) Ltd

(I47) SVOBODOVA J. (I966) Storing of lyophilised root-nodule bacteria SPISY. Fac. Univ. J.E. Purkyne Brno .Tchec. K 38 :475-476

(I48) THOMPSON J.A.,VINCENT J.M. (I967) Methods of detection and estimation of Rhizobia in soil.Plant and Soil 26 : 72 -84

(I49) TOSHIRO,S,KAZUO,K. ,KOJI, M. (I975) Reduction of lag time in bacterial growth.I. Effect. of inoculum size and nutrients.J. Gen. appl.Microbiol.,2I 75-86

(I50) TOHSHIRO ,S. KAZUO K. , KOJI,M. (I975) Reduction of lag time in bacterial growth.I. Effect. of inoculum size, and glucose,and sodium chloride supplemented in culture media ,initial pH media, and cultural temperature .J. Gen. Appl.Microbiol.2I:293-303

(I5I) UCKER D.S (I977) Physiological and genetic studies of the symbiotic nitrogen fixing bacterium R. meliloti . Thesis Massachussett Institute of Technology.Cambridge U.S.A.

(I52) UCKER D.S.,SIGNER E.R.,(I978) Catabolite -Repression- Like Phenomenon with R.meliloti J. of Bacteriol. I36(3):II97 - I200

(I53) VANDENBOSSCHE C.(I978) Etude et formulation de composés vitreux susceptibles de libérer lentement des macro-éléments utilisables par les végétaux . Mémoire de Diplôme Ingénieur C.N.A.M. Lille

(I54) VAN EGERAAT A.W.S.M. (I976) Response of Rhizobium spp and pea seedlings to glycine . Plant ans Soil 45 :I9I- I99

(I55) VAN SCHREVEN,D.A. G.W. HARMSEN ,D.S.LINDENBERG ,OTZEN D.(I953) Experiments on the cultivation of Rhizobium in liquid media for use on Zuidersee polders.Antonie van Leeuwenhoek I9:300-308

(I56) VAN SCHREVEN D.A.,OTZEN D., LINDENBERGH D.J.,(I954) On the Production of Legume Inoculants in a Mixture of Peat and Soil. Antonie van Leeuwenhoek 20 : 33 -57

(I57) VAN SCHREVEN ,D.A. (I964) The effect of some Actinomycetes on Rhizobia and Agrobacterium radiobacter. Plant and Soil,2I:283-30

(I58) VAN SCHREVEN ,D.A. (I970) Some factors affecting growth and survival of Rhizobium spp in soil peat cultures. Plant and Soil, 32 : II3-I30

(I59) VINCENT ,J.M. (I958) Survival of root nodule bacteria . In "Nutrition of the legumes ".(ed. Hallsworth)Butterworths, London : I08- I23

(I60) VINCENT J.M. (I962) Influence of Ca and Mg on the growth of Rhizobia. J gen. Microbiol.,28 : 653 - 663

(I6I) VINCENT ,J.M. (I965)Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legumes. Pages 384-435 in W.V. Bartholomew and F.E. Clarck,eds. Soil nitrogen. Agronomy N. IO Amer. Soc. Agron. Inc.,Madison. Wis.

(I62) VINCENT J.M., (I970) A Manual for the Practical Study of the Root Nodule-Bacteria, IBP Handbook I5, Blackwell Sci. Publ. Oxford .

(I63) VINCENT ,J.M. (I977) Rhizobium general microbiology. In "A treatise on Dinitrogen Fixation,Section III. Biology."Eds. Hardy,R.W.F. and Silver,W.S., pp. 277-366 Wiley Interscience.New-York

(I64) VINCENT J.M.(I980) Australian Studies of the Leguminous Rhizobia Symbiosis.Rh. Newsletters 25(I) :I2 -26

(I65) VIRTANEN A.E., NORDLUND M.,HOLLO E. (I934) Fermentation of sugar by the root-nodule bacteria.Biochem. J., 28 :796 - 802

(I66) WERQUIN M. MOHAMED T.B.B. et DRAGA KRSMANOVIC (I977). Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti . C.R. Acad. Sci. Paris I85I-I854

(I67) WEST, A.M., WILSON ,J.K. (I939) Growth factor requirements of the root-nodule bacteria . J. Bact., 37 : I6I - I72

(I68) WIERINGA ,K.T. (I963) Organismes isolés du sol des Apennins, producteurs d'antibiotiques envers diverses scuches de Rhizobium Ann. Inst. Pasteur.Paris ,I05 : 4I7 - 425.

(I69) WILKINS ,J. (I967) The effects of high temperatures on certain root-nodules bacteria Aust. J. Agric. Res. I8 : 299-304

(I70) WILSON P.W. I937 Symbiotic Nitrogen-Fixation by the Leguminosae The Botanical Review; III(8) :365-399

(I7I) WILSON,D.O. ,REISENAUER,H.M. ,(I970).Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of Rhizobium meliloti . Plant and Soil , 32 :8I -89

(I72) WILSON,D.O., REISENAUER,H.M.(I970) Effetcs. of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium.J. Bacteriol.,I02 :729-732

(I73) WRIGHT W.H. (I926) The nodule bacteria of soybean.I. Bacteriology of Strains.. Soil Science ,20: 95 -I29

(I74) YADAN,N.K., VYAS.S.P. (I973).Salt and pH tolerance of Rhizobia. Folia Microbiol. ,I8 :242_ 247

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE