

N° d'ordre : 1099

50376
1983
49

50376
1983
49

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : «Amélioration et Transformation des Productions Végétales et Microbiennes»

MICROBIOLOGIE

par

Patrice MARY

INFLUENCE DE L'ACTIVITE DE L'EAU SUR LA CONSERVATION ET LA CROISSANCE DE *RHIZOBIUM MELILOTI*



Soutenue le 3 Novembre 1983 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	J. GUILLAUME	Président
		R. TAILLIEZ	Rapporteur
		C. BONNIER	Examineurs
		D. RICHARD-MOLARD	

Je dédie ce travail à mes parents
et à Pascale pour les nombreux sacrifices
qu' ils ont consentis au cours de ces années.

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous lui sommes reconnaissant de nous avoir accordé sa confiance et prodigué encouragements et conseils permanents. Nous lui exprimons toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ de nous avoir fait bénéficier de ses connaissances des phénomènes de dessiccation, d'avoir consacré une bonne partie de son temps à la lecture attentive du manuscrit et d'accepter d'être le rapporteur de cette Thèse.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Recteur C. BONNIER, de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, qui nous a fait l'honneur de participer à notre Jury.

Notre reconnaissance s'adresse également à Monsieur D. RICHARD-MOLARD, Chargé de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Nantes, qui a accepté avec amabilité de juger notre travail.

Que Monsieur D. OCHIN, soit remercié de la disponibilité et de l'intérêt qu'il nous a toujours témoignés au cours de ces trois années.

Il nous tient à coeur d'exprimer ici toute notre gratitude à Mademoiselle M. DELECOURT qui a réalisé les travaux de dactylographie de ce Mémoire. C'est avec beaucoup de gentillesse, de patience et de compétence qu'elle a accepté cette charge.

Que Mesdames F. BECHET, C. BERTOUT, P. LETOQUART, V. THUNT et Monsieur A. DECQ trouvent ici nos chaleureux remerciements pour l'amitié qu'ils nous ont constamment témoignée.

Il nous est impossible de clore ces remerciements sans mentionner tous nos amis de D.E.A. et de Thèse avec qui nous avons passé des moments inoubliables.

ERRATA

- Légende de la figure 9 à la page 74

● déshydratation lente et conservation sous air
△ déshydratation rapide incomplète (teneur résiduelle
en eau de 5 mg), réhydratation et déshydratation
lente puis conservation sous air
■ déshydratation rapide incomplète (teneur résiduelle
en eau de 5 mg) suivie d'une déshydratation lente
et d'une conservation sous air

- Abscisse de la figure 18 à la page 101

Temps en jours

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	1
GENERALITES	
I. - NOTIONS SUR L'ACTIVITÉ DE L'EAU, L'HUMIDITÉ RELATIVE ET LE POTENTIEL CHIMIQUE DE L'EAU ..	3
A. - STRUCTURE DE L'EAU	3
B. - DEFINITIONS : CHEFTEL et CHEFTEL (30), LONCIN (61) ET BIZOT ET MULTON (19)	3
1 - L'activité de l'eau	3
2 - L'humidité relative : H.R.	4
3 - Potentiel chimique de l'eau	5
4 - Isothermes de sorption et phénomène d'hystérésis	6
II. - TOLÉRANCE DES MICROORGANISMES À LA DÉSHYDRATATION	6
A. - QUELQUES FACTEURS INHERENTS A LA BACTERIE POUVANT INTERVENIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION ..	6
1 - Production de polysaccharides extracellulai- res	6
2 - Formation de microcolonies	8
3 - Age physiologique	9
4 - Tolérance à la dessiccation de <i>Rhizobium</i> suivant le groupe d'inoculation	10
5 - Rôle de l'eau résiduelle chez <i>Rhizobium</i> soumis à différents degrés de dessiccation ..	11
B. - FACTEURS EXTERNES A LA BACTERIE POUVANT INTERVE- NIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION	14
1 - Les argiles	14

2 - Conditions rencontrées dans le sol	15
a) Aridité du site d'origine des souches	15
b) Déshydratations et réhydratations cycliques	16
c) Rapidité de la déshydratation	16
3 - Capacité à se développer à faible a_w et tolérance à la sécheresse	17
4 - Autres agents protecteurs	18
C. - NATURE DES DEGRADATIONS CAUSEES PAR LA DESHY- DRATATION	19
1 - Déshydratation par lyophilisation	19
a) Congélation-décongélation	20
b) Lyophilisation	20
2 - Déshydratation sous vide à partir d'une phase liquide (L. drying)	21
3 - Déshydratations sous différentes H.R.	21
 III. - INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES	 24
A. - EVOLUTION DES COURBES DE CROISSANCE EN FONCTION DE L'ACTIVITE DE L'EAU	24
B. - ACTIVITE DE L'EAU LIMITE DE CROISSANCE DES MICROORGANISMES DES ALIMENTS	25
1 - Quelques exemples et leurs significations ...	25
2 - Interférence avec d'autres facteurs	28
C. - VALEURS SEUILS D' a_w POUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM	29
1 - Quelques exemples	29
2 - Importance du soluté utilisé pour diminuer l' a_w du milieu de base	31
3 - Adaptation à des milieux ayant des a_w de plus en plus faibles	31
E. - EFFETS DU CHLORURE DE SODIUM SUR LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE	32
F. - MECANISMES DE TOLERANCE AUX FAIBLES a_w	36
1 - Résistance au choc osmotique	36
2 - Adaptation à la croissance à faible a_w	36
a) Quelques exemples d'adaptations	36

b) <i>Les bactéries halophiles</i>	37
c) <i>Les bactéries non halophiles</i>	39
BUTS DU TRAVAIL	42
MATERIEL ET METHODES	
I. - LES SOUCHES BACTÉRIENNES ÉTUDIÉES	43
II. - LES MILIEUX DE CULTURE	44
III. - LE TAMPON DE NON PROLIFÉRATION : T.N.P. ...	45
IV. - LES PRÉCULTURES ET CULTURES	45
V. - LES MÉTHODES D'ÉVALUATION DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE	46
A. - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES	46
B. - METHODES MICROBIOLOGIQUES	46
VI. - LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONSERVATION DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> À DIFFÉRENTES a_w	47
A. - SOLUTIONS ETALONS D' a_w	47
B. - SOLUTIONS SATURÉES DE SELS OU DE SOLUTES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE	48
C. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL RETENU LORS DE CETTE ETUDE	48
VII. - LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> EN MILIEUX DE DIFFÉRENTES a_w	51
A. - PRINCIPE	51
B. - REALISATION DE MILIEUX A DIFFERENTES a_w	52

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - ÉTUDE DE QUELQUES PARAMÈTRES INTERVENANT DANS LA CONSERVATION DE RHIZOBIUM MELILOTI 2011 À DIFFÉRENTES a_w	56
A. - ETUDE DE LA PERTE EN EAU DES ECHANTILLONS DANS DES ENCEINTES A DIFFERENTES HUMIDITE RELATIVE ...	56
B. - INFLUENCE DE L'OXYGENE SUR LA CONSERVATION DE RHIZOBIUM MELILOTI 2011 A DIFFERENTES a_w	59
C. - INFLUENCE DE LA VITESSE DE DESHYDRATATION SUR LA SURVIE DE RHIZOBIUM CONSERVE A DIFFERENTES a_w ...	64
1 - Etude de la létalité, observée en conser- vation, en fonction de la vitesse de déshydratation	64
2 - Détermination de l'étape de perte en eau où apparaissent les dommages subis après déshydratation rapide	70
a) <i>Estimation des taux de survie, observés en</i> <i>conservation, après déshydratation rapide,</i> <i>réhydratation et déshydratation lente</i>	70
b) <i>Estimation des taux de survie, observés en</i> <i>conservation, après déshydratation rapide</i> <i>jusqu'à une teneur en eau de 5 mg et</i> <i>déshydratation lente, jusqu'à la teneur</i> <i>caractéristique de l'a_w</i>	71
D. - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES SUR LA TOLERANCE A LA CONSERVATION A DIFFERENTES a_w	75
E. - INFLUENCE DE LA PRESENCE DE POLYSACCHARIDES SUR LA SURVIE DE RHIZOBIUM MELILOTI CONSERVE A DIFFERENTES a_w	79
F. - MUTATIONS OBSERVEES, APRES DESHYDRATATION ET CONSERVATION A L'ETAT DESHYDRATE, CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI	82
1 - Influence de l'âge physiologique sur l'appa- rition de mutants M2011, résistants à la streptomycine, juste après déshydratation ...	83
2 - Influence d'une conservation, à 30°C sous différentes a_w , sur l'apparition de mutants M2011 streptomycine résistants	83
3 - Influence d'une conservation à 30°C sous différentes a_w sur l'apparition de révertants chez la souche M5N1m3	86

4 - Conclusion	86
G. - CONCLUSION	88
II. - INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM	90
A. - ACTION DE L' a_w SUR LA CROISSANCE DE QUELQUES SOUCHES DE RHIZOBIUM	90
1 - a_w minimale et optimale de croissance de <i>Rhizobium meliloti</i> M2011	90
a) a_w minimale de croissance	90
b) a_w optimale de croissance	91
2 - a_w minimale de croissance de <i>Rhizobium</i> <i>meliloti</i> M.1.5	95
3 - a_w minimale de croissance de <i>Rhizobium</i> <i>japonicum</i> J5	98
B. - EFFETS DE LA PROLINE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOTI M2011 EN MILIEU R. D' a_w DIFFERENTES	98
C. - INFLUENCE DE L' a_w DU MILIEU DE CULTURE SUR LA SURVIE DE RHIZOBIUM CONSERVE A L'ETAT DESHYDRATE.	100
D. - CONCLUSION	102
CONCLUSION GENERALE	106
BIBLIOGRAPHIE	109

TABLE DES TABLEAUX

	PAGES
TABLEAU 1 - a_w MINIMALE DE CROISSANCE DES MICROORGANISMES ASSOCIES AUX ALIMENTS D'APRES LEISTNER et RÖDEL (58)	26
TABLEAU 2 - a_w LIMITE DE CROISSANCE DE DIVERSES SOUCHES DE RHIZOBIUM, EN MILIEU LIQUIDE, SELON CERTAINS AUTEURS	30
TABLEAU 3 - TOLERANCE A LA SALINITE DE QUELQUES PLANTES AGRICOLES D'APRES BERNSTEIN (18) RAPPORTE PAR SINGLETON et coll. (85)	34
TABLEAU 4 - DISTRIBUTION DES PRINCIPAUX SYSTEMES OSMOLYTIQUES ..	38
TABLEAU 5 - ACTIVITE DE L'EAU DES SOLUTIONS SATUREES POUR TROIS TEMPERATURES. COLLATIONNE D'APRES LES DONNEES LES PLUS SURES DE LA LITTERATURE SELON BIZOT et coll. CITES PAR MULTON et coll. (72)	49
TABLEAU 6 - DIMINUTION D' a_w CAUSEE PAR DIFFERENTS SOLUTES, D'APRES LEISTNER ET RÖDEL (58)	53
TABLEAU 7 - a_w DE DIVERSES SOLUTIONS AQUEUSES PURES DE SOLUTES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS, D'APRES ROBINSON et STOKES CITES PAR MICHAUD-GOUBLET (70)	54
TABLEAU 8 - CONCENTRATIONS, EXPRIMEES EN %, DE DIFFERENTS SOLUTES POUR OBTENIR DES BAISES D' a_w CROISSANTES	55
TABLEAU 9 - TEMPS NECESSAIRES A L'OBTENTION DES EQUILIBRES ET PERTES EN EAU PAR HEURE, POUR DES ECHANTILLONS AYANT UNE TENEUR INITIALE EN EAU DE 70 mg, DANS DES ENCEINTES A DIFFERENTES H.R. A 30°C	60
TABLEAU 10 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET FREQUENCE DE MUTANTS Str^R CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI 2011, A DEUX AGES PHYSIOLOGIQUES, SOUMIS A DIFFERENTS NIVEAUX DE DESHYDRATATION	84
TABLEAU 11 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET FREQUENCE DE MUTANTS Str^R INDIQUEE ENTRE PARENTHESE, CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI 2011 APRES DES TEMPS DE CONSERVATION SOUS DIFFERENTES a_w	85
TABLEAU 12 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET TAUX DE REVERSIONS POUR LES CARACTERES ARGININE, TRYPTOPHANE ET ISOLEUCINE-VALINE, CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI M5N1m3 APRES DES TEMPS DE CONSERVATION SOUS DIFFERENTES a_w .	87

TABLEAU 13 - CULTURES DE <i>R. MELILOTI</i> SOUCHE M2011, EN MILIEUX DE DIFFERENTES a_w PROVOQUEES PAR TROIS SOLUTES, APRES 45 HEURES D'INCUBATION A 30°C	94
TABLEAU 14 - INFLUENCE DE L'APTITUDE A SE DEVELOPPER EN MILIEUX DE FAIBLES a_w SUR LES TAUX DE SURVIE OBTENUE POUR LES SOUCHES M.1.5 ET M2011 APRES 72 HEURES DE CONSERVATION A a_w 0	103

TABLE DES FIGURES

	PAGES
FIGURE 1 - ISOTHERMES D'ADSORPTION	12
FIGURE 2 - COURBES DE CROISSANCE D'UN MICROORGANISME EN FONCTION DE L' a_w	24
FIGURE 3 - EVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU TEMPS, DANS DES ENCEINTES A PRESSION ATMOSPHERIQUE ET A DIFFERENTES H.R.	57
FIGURE 4 - EVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU TEMPS, DANS DES ENCEINTES SOUS VIDE PARTIEL A DIFFERENTES H.R.	58
FIGURE 5 - INFLUENCE DE L'OXYGENE SUR LA CONSERVATION DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 A DIFFERENTES a_w	62
FIGURE 6 - EFFETS DE DESHYDRATATIONS LENTES SUR LA SURVIE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	67
FIGURE 7 - EFFETS DE DESHYDRATATIONS RAPIDES SUR LA SURVIE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	68
FIGURE 8 - EFFETS D'UNE DESHYDRATATION RAPIDE SUIVIE D'UNE REHYDRATATION ET D'UNE DESHYDRATATION LENTE SUR LA SURVIE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	72
FIGURE 9 - EFFETS D'UNE DESHYDRATATION RAPIDE INCOMPLETE SUIVIE D'UNE DESHYDRATATION LENTE SUR LA SURVIE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	74
FIGURE 10 - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M2011 SUR LA SURVIE LORS DE CONSERVATIONS SOUS VIDE A DIFFERENTES a_w	77
FIGURE 11 - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M2011 SUR LA SURVIE LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	78
FIGURE 12 - INFLUENCE DE LA PRESENCE D'EXOPOLYSACCHARIDES SUR LA SURVIE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 APRES CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w	81

FIGURE 13 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M2011	92
FIGURE 14 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M2011	93
FIGURE 15 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M 1.5	96
FIGURE 16 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i> M 1.5	97
FIGURE 17 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DEUX SOLUTES) DU MILIEU T.Y. SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM</i> <i>JAPONICUM</i> J5	99
FIGURE 18 - EFFETS DE L'ADDITION DE PROLINE OU D'ACIDE GLUTAMI- QUE (1 mM) SUR LA CROISSANCE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M2011 EN MILIEUX RHB ₁ DE DIFFERENTES a_w	101

I N T R O D U C T I O N

La symbiose certainement la mieux connue associe des bactéries du genre *Rhizobium* à des plantes de la famille des Légumineuses. Cette symbiose débute par une multiplication active des *Rhizobium* à proximité des radicelles de Légumineuse. Grâce à leur propriété d'infectivité, les *Rhizobium* pénètrent par les poils racinaires et induisent la formation de nodosités. Ces bactéries s'y transforment alors en bactéroïdes et acquièrent ainsi leurs propriétés d'efficience. Ces derniers, grâce au complexe enzymatique de la nitrogénase, réduisent l'azote atmosphérique en ions ammonium.

Les cultures de Légumineuses présentent de nombreux intérêts. Elles peuvent se révéler utiles pour la couverture et l'enrichissement des sols. Utilisées comme fourrage, elles servent de nourriture pour bétail (production de viande). Enfin, elles peuvent être directement utilisées en alimentation humaine (Pois, Haricot ou Soja).

La présence de souches infectives et fortement efficaces de *Rhizobium* est un facteur primordial qui influence beaucoup l'établissement de ces cultures et l'obtention de récoltes de bonne qualité. HALE (46) souligne que les souches naturellement présentes dans les sols, bien que plus aptes à former des nodules, possèdent un niveau d'efficience relativement peu élevé. C'est pourquoi de nombreux auteurs recommandent la pratique de l'inoculation artificielle (21 et 46). Parmi les souches indigènes un certain nombre de caractères dont l'infectivité, l'efficience, la compétitivité et la tolérance aux facteurs chimiques, physiques et biologiques du sol sont sélectionnés. De telles souches constituent alors la source d'inoculats qui offrent les meilleures chances de réussite lors d'une réintroduction massive au milieu d'origine par inoculation artificielle.

Les conditions de succès d'une inoculation se situent à trois niveaux (46) :

- qualité de l'inoculum et survie du *Rhizobium* lors de son stockage ;
- survie de *Rhizobium* sur la graine avant l'ensemencement ;
- survie et multiplication sur ou à proximité de la graine avant la nodulation.

Un standard minimum, variant suivant l'espèce de Légumineuse, mais rarement inférieur à 10^5 *Rhizobium* par graine au moment de l'ensemencement, est généralement retenu.

Dans certaines régions, le bénéfice de l'inoculation artificielle est perdu dans l'année même (64).

Une bonne survie de *Rhizobium* lors des différentes étapes de l'inoculation et une multiplication sur ou à proximité de la graine sont donc très souhaitables. Parmi les facteurs physiques et chimiques, la dessiccation et la salinité affectent particulièrement la survie et la multiplication de *Rhizobium* au cours de ces étapes.

Toute étude portant sur l'influence de l'humidité relative, exprimée en terme d'activité de l'eau, semble donc intéressante à mener, d'une part pour apprécier la survie, et d'autre part pour vérifier que les propriétés originelles de la souche sont intégralement préservées.

Dans les différents habitats naturels, non seulement la quantité d'eau varie, mais aussi sa disponibilité exprimée en terme d'activité de l'eau. Les deux phénomènes sont par ailleurs plus ou moins liés. Or la prolifération des microorganismes nécessite la présence d'eau libre. Il semblait donc intéressant d'envisager l'influence de l'activité de l'eau sur la croissance de *Rhizobium*, compte tenu du fait que la multiplication de ce microorganisme est souvent souhaitable au cours des différentes étapes de l'inoculation.

G E N E R A L I T E S

I. - NOTIONS SUR L'ACTIVITÉ DE L'EAU, L'HUMIDITÉ RELATIVE ET LE POTENTIEL CHIMIQUE DE L'EAU

A. - STRUCTURE DE L'EAU

A l'état de vapeur, la molécule d'eau est un monomère.

A l'état solide, les molécules d'eau sont liées entre elles par des liaisons hydrogène. Elles constituent alors un polymère de structure cristalline.

Par la nature polaire de sa molécule, l'eau présente des aptitudes à se lier sous forme d'hydrate avec des ions ou par des ponts hydrogènes avec des substances dissoutes (sucre, sels, ...) ainsi qu'avec les macromolécules comme les protéines.

Les liaisons hydrophiles diminuent donc le nombre de molécules d'eau libre, ainsi que certaines liaisons hydrophobes (les molécules d'eau s'organisant autour d'un groupement non polaire).

B. - DEFINITIONS : CHEFTEL et CHEFTEL (30), LONCIN (61) ET BIZOT ET MULTON (19)

1 - L'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w pour activity water) est définie de la manière suivante :

$$(1) \quad a_w = \frac{f_w}{f'(T)}$$

où f_w : fugacité de l'eau dans le milieu

$f'(T)$: fugacité de l'eau pure à la température T et à la pression totale p

Dans le domaine des faibles pressions de vapeur d'eau qui nous concerne ici, les fugacités s'identifient aux pressions partielles de vapeur d'eau, et (1) devient :

$$(2) a_w = \frac{p}{p^\circ}$$

où p : pression partielle de vapeur d'eau d'une solution, d'un échantillon,

p° : pression de vapeur d'eau pure à la même température

Selon la loi de Raoult :

$$p = Xp^\circ$$

où X est la fraction molaire de solvant liquide dans la solution :

$$a_w = X = \frac{\text{Nombre de moles d'eau}}{\text{Nombre de moles d'eau} + \text{nombre de moles de soluté}}$$

Exemples : - pour l'eau pure $a_w = 1$
 - pour une solution molaire de saccharose $a_w = 0,98$

Mais cette relation ne s'applique (ainsi que la loi de Raoult) qu'à des solutions idéales à l'équilibre.

2 - L'humidité relative : H.R.

Elle est définie comme étant le rapport du titre molaire X (ou de la pression p) de la vapeur d'eau dans l'air, au titre molaire X' (ou à la pression saturante p') de l'air saturé à la même température :

$$\text{H.R.} = \left(\frac{X}{X'} \right)_T \times 100 = \left(\frac{p}{p'} \right)_T \times 100$$

sous réserve que X reste inférieur à X' , ce qui exclut le cas des brouillards.

Le terme d'H.R.E. (Humidité Relative d'Equilibre) est souvent employé pour rappeler qu'il s'agit de l'état d'équilibre du système (61).

Bien que mesurés sur deux échelles analogues (0 à 100 % pour l'H.R.E. et 0 à 1 pour l' a_w), ces deux paramètres n'ont pas la même signification physique : l'H.R.E. est relative à la phase gazeuse, cependant que l' a_w se réfère à la phase condensée de l'eau adsorbée et à la variation de potentiel chimique qu'elle a subie. Cependant, en supposant que la vapeur d'eau soit un gaz parfait, on admet que l' a_w dans un produit solide ou dans une solution s'identifie à l'H.R. de l'atmosphère, en équilibre avec la phase condensée, à la température considérée, avec une erreur inférieure à 0,2 % :

$$a_w \approx \frac{\text{H.R.E. \%}}{100} = \left(\frac{p}{p'}\right)_T$$

3 - Potentiel chimique de l'eau

L'activité de l'eau est un paramètre thermodynamique qui se définit par rapport au potentiel chimique de l'eau :

$$\mu_w(p,T) - \mu'_w(p,T) = RT \text{ Log } \frac{f_w}{f'_T} = RT \text{ Log } a_w$$

où $\mu'_w(p,T)$: potentiel chimique de l'eau pure liquide à la température T et à la pression totale p (état de référence)

$\mu_w(p,T)$: potentiel chimique de l'eau dans le milieu étudié à la même température et à la même pression totale

R : constante des gaz parfaits
et T : température absolue (°K)

4 - Isothermes de sorption et phénomène d'hystérésis

Une isotherme d'adsorption (ou de désorption) est la courbe qui indique, à l'équilibre et pour une température déterminée, la quantité d'eau retenue par un échantillon en fonction de l'humidité relative qui l'entoure.

Selon que l'on part d'un échantillon sec ou d'un échantillon humide, on obtient une courbe d'adsorption ou de désorption.

Pour une température donnée, l'isotherme de désorption n'est pas superposable à l'isotherme d'adsorption. Ce phénomène est appelé hystérésis et se manifeste dans les régions intermédiaires des isothermes où l'eau ne serait que faiblement liée.

II. - TOLÉRANCE DES MICROORGANISMES À LA DÉSHYDRATATION

A. - QUELQUES FACTEURS INHERENTS A LA BACTERIE POUVANT INTERVENIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION

1 - Production de polysaccharides extracellulaires

Les bactéries qui synthétisent des polysaccharides extracellulaires possèderaient, d'après WILKINSON (104) et SUTHERLAND (92), un certain nombre d'avantages écologiques. Parmi ces avantages nous pouvons citer une protection envers la phagocytose, une absorption plus aisée des ions par la bactérie et une dispersion plus grande donc une colonisation plus importante des bactéries. Les polysaccharides extracellulaires pourraient également, si le besoin s'en fait sentir, servir de sources de carbone et d'énergie.

Enfin, les polysaccharides extracellulaires et plus particulièrement les polysaccharides capsulaires agiraient en tant que "système tampon" prévenant la perte ou le gain en eau trop rapide qui causerait la destruction des cellules (104).

KILBERTUS et coll. (56) analysent *in situ*, en microscopie électronique à transmission, les transformations subies par les micro-organismes du sol, en particulier les bactéries à gram négatif, après dessiccation à l'air ambiant (H.R. \approx 50 %). Ces auteurs confirment le rôle protecteur des exopolysaccharides renforcé par la présence à leurs surfaces de minéraux argileux.

VINCENT et coll. (97) ainsi que BUSHBY et MARSHALL (25a) attribuent un rôle secondaire à la production d'exopolysaccharides. Les souches de *R. trifolii* testées et leurs mutants, incapables de produire des polysaccharides, présentent cependant une différence de tolérance à la dessiccation ; les souches produisant le polymère seraient légèrement plus tolérantes.

PENA-CABRIALES et ALEXANDER (76) remarquent que des cellules de *R. trifolii* suspendues dans leurs propres polysaccharides puis inoculées dans un sol soumis à dessiccation survivent mieux que les mêmes cellules dépourvues du polymère qu'elles ont synthétisé.

Par contre, DAVIDSON et REUSZER (39) constatent que l'addition de polysaccharides de *R. trifolii* à des cellules de *R. japonicum* n'augmente pas la survie de ces dernières sur des graines de soja pendant le "ressuyage".

OSA-AFIANA et ALEXANDER (75) soutiennent la thèse d'une corrélation étroite entre la production d'exopolysaccharides et la sensibilité à la dessiccation parmi différentes souches de *Rhizobium* du groupe "cowpea". Les polysaccharides seraient synthétisés aux dépens de réserves intracellulaires qui feraient cruellement défaut pendant le stress de déshydratation. Cependant, lors de ces travaux, les mécanismes d'inoculation (avec ou sans la quantité d'exopolysaccharides caractéristiques des souches) n'étant pas clairement précisés, ces résultats ne sont pas nécessairement en contradiction avec les travaux précédents.

2 - Formation de microcolonies

FRASER (42) constate des taux de survie supérieurs lors de la conservation quand *R. meliloti* est cultivé directement sur le support (granules de pierre ponce ou de $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) plutôt qu'en milieu liquide puis inoculé sur les granules. De même, un certain nombre d'auteurs préconisent une prémultiplication de *Rhizobium* dans les supports composés de tourbe. PENA-CABRIALES et ALEXANDER (76) observent qu'une croissance préalable dans le sol de *Rhizobium* (3 semaines à 29°C) détermine une tolérance plus élevée à la déshydratation.

Ce type de tolérance pourrait être en relation avec la formation de microcolonies. Les cellules situées à l'intérieur de la microcolonie seraient protégées de la dessiccation de manière plus efficace que les cellules en périphérie ou les cellules isolées. Dans le cas des cellules inoculées dans le sol et soumises immédiatement à la déshydratation, ce mécanisme serait inexistant.

Par opposition SOULIDE et ALISON (86) rapportent que le séchage à l'air d'un sol est plus létal envers la microflore tellurique quand le sol a été incubé auparavant, ce qui permet le développement de cellules végétatives jeunes. Ce dernier point ne remet cependant pas en cause le mécanisme de protection sous forme de microcolonie qui dépend en effet de la durée d'incubation. De nombreux auteurs dont DYE (41) soulignent, d'autre part, que des cellules mortes peuvent avoir un effet protecteur notable sur les cellules survivantes.

Les travaux de ces différents auteurs mettent l'accent sur l'influence de l'âge physiologique du microorganisme sur la sensibilité à la dessiccation.

3 - Age physiologique

RECORD et coll. (79) montrent qu'*E. coli* serait plus sensible au séchage sous vide lorsque les cellules sont prélevées en phase logarithmique de croissance. ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN (5) observent, après déshydratation et conservation, une meilleure tolérance des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance.

Récemment, ZIKMANIS et coll. (110) établissent une relation inverse entre le degré d'insaturation des acides gras, qui dépend de l'état physiologique, et la survie de *Saccharomyces cerevisiae* à la dessiccation.

AMARGER et coll. (1) soutiennent la thèse d'une meilleure conservation de *R. meliloti* quand la lyophilisation est pratiquée sur des cellules prélevées en début de phase stationnaire.

Par contre VINCENT et coll. (97) ne constatent que peu ou pas de différence entre une culture en milieu liquide de un jour et quatre jours sur la capacité des cellules de *R. trifolii* à supporter la dessiccation. La survie de *Rhizobium* après lyophilisation n'est affectée ni par la concentration cellulaire initiale ni par l'âge physiologique (41).

Notons cependant que de nombreux auteurs (6, 31, 38, 75 et 76) utilisent généralement des cultures prélevées en phase stationnaire de croissance lors de leurs essais de conservation de *Rhizobium*.

Un certain nombre d'auteurs (64, 25a et b, 54 et 41), travaillant sur la survie de *Rhizobium* à la dessiccation, cultivent les cellules sur "tranches d'agar". Ce mode opératoire rend mal aisée l'interprétation de l'âge physiologique. En tout état de cause, il faut bien admettre que l'influence de l'âge physiologique sur la tolérance à la dessiccation demeure une donnée expérimentale de laboratoire et peut difficilement s'appliquer sur le terrain.

4 - Tolérance à la dessiccation de *Rhizobium* suivant le groupe d'inoculation

MARSHALL (64) et BUSHBY et MARSHALL (25a) démontrent que les *Rhizobium* à croissance rapide (*meliloti* et *leguminosarum*) sont plus sensibles à la dessiccation rapide et sévère (inférieure à 5 % H.R. en douze heures) en sol sablonneux que les souches à croissance lente.

De tels résultats ne sont pas confirmés lorsque la déshydratation est menée de manière plus lente (en onze jours). Cependant, *Rhizobium phaseoli* présenterait la plus grande sensibilité (76).

JANSEN VAN RENSBURG et STRIJDOM (54) constatent que les souches à croissance rapide survivent mieux que les souches à croissance lente lorsqu'elles sont soumises à une déshydratation lente sous $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ soit une H.R. de 31 %. A des pressions de vapeur inférieures dans un four à courant d'air forcé, les résultats sont inversés et les souches à croissance lente survivent mieux. Ce qui confirme les résultats précédents (25a) Parmi les souches à croissance lente les *R. japonicum* apparaissent les plus sensibles. Des différences marquées dans la tolérance se produisent également dans ce groupe, le groupe "cowpea" et les *Rhizobium* à croissance rapide montrent des réponses plus homogènes.

Si la tolérance à la dessiccation des espèces de *Rhizobium* est en relation avec le taux de croissance, il est concevable que des différences dans la sensibilité à la dessiccation parmi les souches d'une même espèce le soit également. OSA-AFIANA et ALEXANDER (75) n'ont pas réussi à vérifier cette hypothèse sur le groupe cowpea soumis à dessiccation rapide (\approx en 24 heures) dans un sol sablonneux. Ces auteurs constatent également, qu'au sein du groupe cowpea, les souches diffèrent largement dans leur tolérance à la dessiccation et considèrent ce groupe comme sensible à la déshydratation.

Dans un tout autre domaine, DYE (41) montre une tolérance à la lyophilisation plus importante chez une souche du groupe cowpea. Une sensibilité croissante serait observée dans l'ordre cowpea, *meliloti*, *trifolii* et *phaseoli*. Mais là encore l'utilisation d'une seule souche par espèce ne permet pas de généraliser.

Les essais de conservation de différentes espèces bactériennes sur papier filtre désseché sous CaCl_2 (H.R. = 31 %), réalisés par ANTHEUNISSE et coll. (6), permettent de retrouver :

- 80 % des souches de *R. meliloti*,
- 33 % des souches de *R. japonicum* et *lupini*,
- 12 % des souches de *R. leguminosarum* et *trifolii*

après quatre ans de conservation.

- *R. phaseoli* se révèle, encore une fois, le plus sensible puisque seulement 25 % des souches se conservent après deux ans et 0 % après quatre ans.

Les différences quantitatives, observées pour différentes souches d'un même groupe, paraissent suffisamment grandes pour permettre une sélection de souches de *Rhizobium* tolérantes à la dessiccation.

5 - Rôle de l'eau résiduelle chez *Rhizobium* soumis à différents degrés de dessiccation

BUSHBY et MARSHALL (26) entreprennent une étude détaillée du statut de l'eau chez *Rhizobium*.

La différence de résistance à la dessiccation parmi les espèces de *Rhizobium* ne peut se justifier par la vitesse des échanges d'eau (déterminée par R.M.N.), car peu de résistance au passage des molécules d'eau est observée chez toutes les espèces de *Rhizobium*.

L'osmolarité des constituants internes chez les *Rhizobium* à croissance lente est supérieure à celle observée chez les *Rhizobium* à croissance rapide. Chez *Rhizobium*, cette osmolarité dépend essentiellement des composés ioniques et non des glycoprotéines.

Les données dérivées de l'étude des isothermes d'adsorption indiquent que la sensibilité à la dessiccation serait en relation avec la quantité d'eau retenue à différentes a_w (fig. 1).

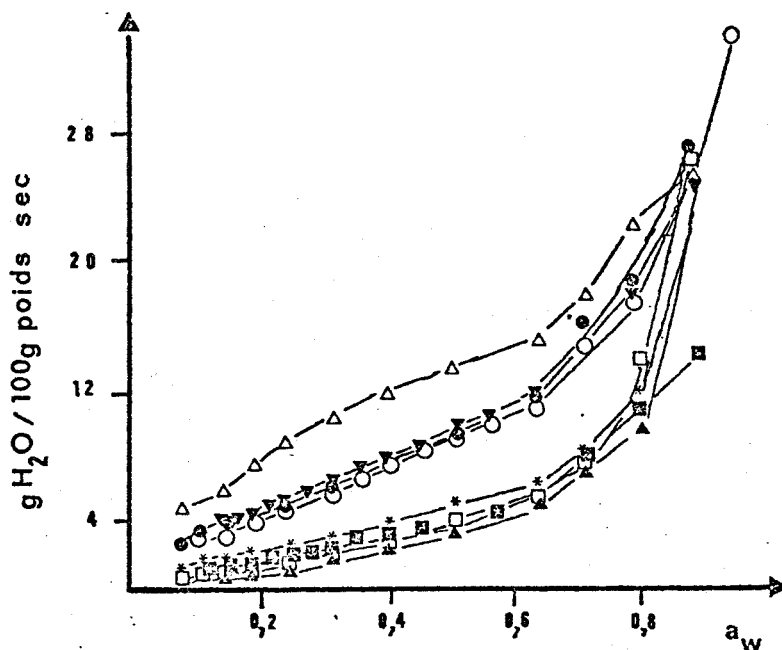


FIGURE 1 - ISOTHERMES D'ADSORPTION DE :

Δ Montmorillonite calcium, ∇ *R. trifolii* SU 297/32B (polysaccharide négatif), \circ *R. trifolii* SU 297/31A (polysaccharide positif), \bullet *R. leguminosarum* TA 101, \blacksquare et $*$ *R. lupini* UT12, \square *R. japonicum* QA 372 et \blacktriangle *R. lupini* UT2, d'après (26).

Les *Rhizobium* à croissance rapide retiennent des quantités d'eau supérieures à toutes les a_w (inférieures à 0,9 cependant). Or ces *Rhizobium* présentent une sensibilité plus grande à la dessiccation (cf. A, 4) et l'addition d'argile améliore leur tolérance (cf. B, 1).

Les auteurs suggèrent qu'une teneur intracellulaire en eau plus faible à H.R. basse implique une capacité supérieure de tolérance à la dessiccation par réduction des enzymes capables de fonctionner à des H.R. relativement faibles.

La survie des *Rhizobium* à croissance rapide pourrait être augmentée en réduisant leur teneur en eau intracellulaire. Comme la Montmorillonite Ca présente une plus grande affinité pour l'eau que les *Rhizobium* (fig. 1), ces auteurs postulent que l'argile protège les *Rhizobium* à croissance rapide de la dessiccation en diminuant leur teneur en eau intracellulaire. La teneur en eau des *Rhizobium* à croissance lente serait en dessous d'un seuil critique où plus aucune amélioration ne pourrait être espérée.

Le rôle protecteur des argiles, constaté par de nombreux auteurs, trouverait là une explication valable. Notons, également, sur la figure 1 qu'aucune variation dans les isothermes d'adsorption ne peut être mise en évidence entre *R. trifolii* muqueux et non muqueux. Le rôle protecteur des exopolysaccharides serait donc d'une autre nature.

JANSEN VAN RENSBURG et STRIJDOM (54) argumentent en ce sens en précisant cependant l'importance du paramètre a_w . L'hypothèse de BUSHBY et MARSHALL (26) est plausible et implique qu'il serait défavorable à la survie des *Rhizobium* de les exposer à des a_w trop faibles pour autoriser un fonctionnement correct des enzymes vitales mais cependant pas assez faibles pour réduire ou inhiber totalement leur activité. Dans les expériences de BUSHBY et MARSHALL (25a), réalisées à une très faible a_w (proche de 0,05 voire 0), les *Rhizobium* à croissance rapide avec leur rétention en eau supérieure seraient exposés à une telle situation et survivent mal.

A l' a_w retenue par ces auteurs ($\text{Ca}(\text{No}_3)_2$ soit 0,31), les souches à croissance lente, moins capables de retenir l'eau, sont apparemment soumises à une telle situation. La plus grande quantité d'eau retenue par les *Rhizobium* à croissance rapide qui serait à leur désavantage à a_w faible ($<$ à 0,05) pourrait permettre le fonctionnement correct des enzymes vitales sous des conditions de déshydratation moins sévères (a_w de 0,31).

En résumé nous pouvons dire que :

- "*In vitro*" les germes à gram négatif dont *Rhizobium* sont plus sensibles aux variations hydriques que les bactéries à gram positif, car leur pression osmotique interne est plus faible : 4 à 8 atmosphères contre 20 à 30 atm. pour les secondes.
- "*In situ*", ces bactéries réduisent leur infériorité en produisant souvent des polysaccharides extracellulaires. Ces polymères, la formation de microcolonies, les cellules mortes et les feuillets d'argile doivent, en affectant la teneur intracellulaire en eau, créer un véritable environnement protecteur et permettent une réhydratation progressive.

B. - FACTEURS EXTERNES A LA BACTERIE POUVANT INTERVENIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION

1 - Les argiles

MARSHALL et ROBERTS (65), puis MARSHALL (64) soulignent que dans les régions agricoles de l'Ouest de l'Australie, *R. trifolii* et *R. meliloti* en dépit d'une excellente nodulation résultant de l'inoculation artificielle semblent incapables de survivre jusqu'à la saison suivante. Dans ces régions, un manque de pluviométrie est associé à des températures élevées (50°C voire même 70°C). Ces problèmes, très sévères dans les sols sabloneux gris et jaunes, ne se posent guère

dans les sols sabloneux rouges ou dans les sols de texture plus lourde. Dans tous ces types de sols, même en conditions extrêmes, aucun problème de nodulation ne se pose pour le lupin et le soja. L'analyse chimique de ces différents types de sol montre la présence de quantités appréciables d'Illite et d'Haematite dans les sols sabloneux rouges et les sols de texture plus lourde.

L'amendement des sols sabloneux gris et jaunes avec 5 % (poids/poids) de Montmorillonite, d'Illite ou d'Haematite protège *R. trifolii* des effets léthaux de températures élevées en sols desséchés.

Les résultats de DANSO et ALEXANDER (38) semblent confirmer ces hypothèses en montrant une meilleure survie de *Rhizobium* en terre grasse sabloneuse ou limoneuse déshydratée comparée à la survie obtenue en sols sabloneux déshydratés.

BUSHBY et MARSHALL (25a) précisent les doses optimales d'action des amendements en Montmorillonite (10 % poids/poids) et réaffirment que seuls les *Rhizobium* à croissance rapide sont protégés par l'argile. L'efficacité de l'amendement dépend de la forme physique (en poudre ou en solution aqueuse). L'amendement sous forme de poudre procure une bien meilleure protection des *Rhizobium* à croissance rapide.

2 - Conditions rencontrées dans le sol

a) Aridité du site d'origine des souches

OSA-AFIANA et ALEXANDER (75) isolent dix huit souches de *Rhizobium cowpea* de trois sites d'aridité croissante et concluent au manque de corrélation entre l'origine des souches isolées et la tolérance à la dessiccation expérimentale.

b) Déshydratations et réhydratations cycliques

Le sol constitue un habitat naturel qui peut être soumis à de fréquentes périodes de déshydratation suivies de périodes de réhydratation. Un certain nombre d'auteurs ont donc cherché à voir les effets de tels cycles de déshydratation-réhydratation, avec ou sans subcultures intermédiaires, sur la résistance de bactéries telluriques.

Un certain nombre d'auteurs (22, 25a, 31, 60, 76 et 87) rapportent que de tels cycles de déshydratation-réhydratation ne sélectionnent pas de bactéries plus résistantes à la dessiccation. Cependant OCHIN (74) sélectionne une souche de *Rhizobium meliloti* anhydro-résistante par lyophilisations successives.

SCHONBECK et BEWLEY (83b) montrent que des périodes quotidiennes d'assèchement et de réhydratation induisent "l'endurcissement" chez la mousse *Tortula ruralis*.

c) Rapidité de la déshydratation

La déshydratation d'un sol s'effectue généralement de manière lente ; cependant, sous certaines conditions cette déshydratation peut être beaucoup plus rapide, notamment en surface.

ANTHEUNISSE et ARKESTELJN-DIJKSMAN (5) montrent que la déshydratation rapide est beaucoup plus nocive pour les bactéries. De même SCHONBECK et BEWLEY (83a) démontrent que la déshydratation rapide de *Tortula ruralis* aboutit à des dégâts plus sévères.

Les résultats de BUSHBY et MARSHALL (25a) seraient imputables à une déshydratation trop rapide (54 et 76).

Du fait que la tolérance à la dessiccation n'est pas en relation avec l'aridité du site d'origine des souches et la difficulté de trouver des souches résistantes par mutations ou cycles de déshydratation-réhydratation, l'évolution vers la résistance à la dessiccation parmi les *Rhizobium* doit être extrêmement lente voire inexistante.

Cette remarque montre l'avantage potentiel d'utilisation de souches tolérantes à la dessiccation comme source d'inoculats. L'éventail de tolérance très large, observé parmi les différentes souches d'une même espèce, permet une telle sélection.

3 - Capacité à se développer à faible a_w et tolérance à la sécheresse

CHEN et ALEXANDER (31) constatent une corrélation étroite entre une pression osmotique interne élevée (ou la capacité à croître en milieu de faible a_w) et la tolérance à la dessiccation. Une légère augmentation de la tolérance à une déshydratation jusque 31 % H.R. est observée pour une souche de *Rhizobium* s.p. Il existe cependant des souches sensibles à la dessiccation qui montrent une croissance à de faibles a_w et inversement. Il semble donc que l'aptitude à se développer à faible a_w ne soit pas le seul facteur protégeant les cellules de la déshydratation. Cependant, l'importance de ce facteur est accréditée par l'observation que toutes les souches sensibles deviennent plus tolérantes quand les cellules sont cultivées dans des milieux d' a_w plus faibles.

Les changements quantitatifs et qualitatifs des solutés intracellulaires, concomitants à une baisse d' a_w des milieux de culture, sont abondamment décrits dans la littérature (cf. osmorégulation) et ont été récemment étendus au genre *Rhizobium*.

BUSHBY et MARSHALL (25a) ne semblent pas argumenter en ce sens. Cependant, les conditions expérimentales retenues par ces auteurs (notamment la reprise des cellules dans de l'eau distillée) ne sont guère identiques.

Il existe une relation entre humidité d'un sol et salinité. Réduire la teneur en eau d'un sol aboutit nécessairement à concentrer la teneur en sel dans la solution du sol et par voie de conséquence diminuer l' a_w .

De tels considérations pourraient expliquer l'échec des démonstrations d'une corrélation entre l'origine des souches (aridité du site) et la tolérance à la dessiccation pour peu que les tests ne tiennent pas compte de la teneur en sel.

4 - Autres agents protecteurs

SCOTT (84) étudie les "effets protecteurs" des sucres (saccharose, glucose et arabinose 1,1 M) sur la survie de *Salmonella newport* conservée à différentes a_w . Le saccharose présente un degré de protection nettement supérieur quelque soit l' a_w de conservation (inférieure à 0,43). En présence de sucres, les différences entre la conservation sous air et sous vide n'existent plus (nocivité de l'air à a_w nulle). L'addition de glucose ou d'arabinose serait nocive pour des conservations sous a_w 0,43 et 0,22.

VINCENT et coll. (97) entreprennent une étude détaillée de l'influence de différents sucres sur les taux de survie obtenus chez *R. trifolii* après une conservation sous une H.R. de 20 %. Parmi les différents sucres testés, le maltose présente un degré de protection nettement supérieur. Le saccharose et le glucose présenteraient un degré de protection intermédiaire, le lactose n'apportant que peu ou pas de protection. La gomme arabique présente également une protection non négligeable.

BUSHBY et MARSHALL (25a) démontrent qu'à un stade de déshydratation plus poussé (inférieur à une H.R. de 5 %), le glucose, le maltose, le saccharose et le Polyvinyl Pyrrolidone protègent aussi bien les *Rhizobium* à croissance rapide que ceux à croissance lente. Le Poly Ethylène Glycol (P.E.G.) de poids moléculaire 6 000 se comporte de manière identique à la Montmorillonite (protection des *Rhizobium* à croissance rapide uniquement). Enfin le glycérol et le P.E.G. de poids

moléculaire inférieur (400 et 1 500) présentent des effets défavorables sur les taux de survie.

OCHIN (74) démontre le rôle protecteur de la maltodextrine lors de la lyophilisation et l'atomisation de *R. meliloti*.

De nombreux auteurs utilisent couramment des mélanges protecteurs lors de leurs essais de conservation de bactéries en l'état déshydraté : dextran (6), saccharose et lait écrémé (42) ou Méthyl cellulose (91).

Cependant DYE (41) considère que la lyophilisation de *Rhizobium* peut s'effectuer sans agent protecteur (les cellules mortes agissant comme tel).

La nature exacte du mécanisme d'action de ces agents protecteurs reste mal connue et abondamment discutée.

C. - NATURE DES DEGRADATIONS CAUSEES PAR LA DESHYDRATATION

Les observations *in situ* en microscopie électronique de KILBERTUS et coll. (56) suggèrent deux types de dommages : sur les membranes et sur l'ADN.

1 - Déshydratation par lyophilisation

Avant d'aborder les dommages causés par la lyophilisation, il convient de signaler ceux qui surviennent lors de la congélation-décongélation.

a) Congélation-décongélation

La membrane cellulaire et la paroi seraient particulièrement sensibles aux effets de la congélation-décongélation (17 et 67).

Chez *Escherichia coli* un tel traitement introduit un certain nombre de cassures sur les brins de l'ADN voire une cassure totale de l'ADN. Des cryoprotecteurs tels le diméthyl sulfoxyde ou le glycérol diminuent la mortalité des bactéries et les dommages de leurs ADN (44). Les travaux de WILLIAMS et CALCOTT (105) renforcent l'idée que la cible principale des traitements de congélation-décongélation serait l'ADN.

Non seulement l'ADN serait endommagé, mais sous certaines conditions, le processus pourrait se révéler mutagène (28).

Cependant, ASHWOOD-SMITH et GRANT (10) affirment que la congélation-décongélation n'entraîne aucune mutation.

b) Lyophilisation

Ces mêmes auteurs démontrent que des dommages de l'ADN et des mutations surviennent lors de la lyophilisation. L'addition d'agents protecteurs et la présence d'oxygène n'affectent pas, de manière significative, le nombre de mutants induits (10).

ASHWOOD-SMITH (11) démontre que le stockage à 28°C des lyophilisats d'*E. coli* augmente le nombre de mutants induits. Une humidité résiduelle de 3 à 4 % entraînerait l'apparition d'un maximum de mutants. Ce même auteur (12) met en évidence l'induction du prophage lambda à partir d'une souche d'*E. coli* K₁₂ lysogène à lambda suite à une lyophilisation.

TANAKA et coll. (93) concluent que les mutations induites chez *E. coli* par lyophilisation le sont pendant la réhydratation quand l'ADN endommagé est réparé par le caractère "exr" de la cellule.

OCHIN (74) démontre que l'atomisation et la lyophilisation ne modifient pas l'infectivité et l'efficacité d'une souche de *Rhizobium* M9Sm₁Str (ni son acido-tolérance).

DYE (41) aboutit à des conclusions similaires tout en précisant cependant que les tests n'ont pas été effectués sur des colonies isolées.

2 - Déshydratation sous vide à partir d'une phase liquide (L. drying)

Un tel procédé de déshydratation induit des mutations chez *E. coli*. La présence du gène Rec A⁺ est nécessaire pour la fixation de la mutation. Les mutations sont observées essentiellement après trois semaines de conservation à des températures élevées de 37°C (14).

Dans les mêmes conditions, REID et coll. (80) soulignent une perte d'efficacité et d'infectivité chez *R. meliloti* et *japonicum* (conservation à des températures supérieures à 10°C après déshydratation sous vide).

3 - Déshydratations sous différentes H.R.

WEBB (99 et 102) étudie l'apparition de mutations chez *E. coli* en fonction de l'humidité relative. Il observe une induction importante de mutations à 40 % H.R. pour des cellules prélevées en phase stationnaire et à 55 % H.R. pour celles en phase exponentielle. L'induction moindre, observée à 30 % H.R., est interprétée comme le reflet de dommages plus sévères conduisant à la mort de la cellule plutôt qu'à des mutations. L'addition d'inositol avant l'atomisation diminue la mortalité et le taux de mutants induits.

WEBB et DUMASIA (100) mettent en évidence l'induction du prophage chez *E. coli* K₁₂ (λ^+) et M₃ (λ_{59}) à une H.R. de 55 %. Encore une fois l'inositol prévient l'induction.

Les mutants auxotrophiques obtenus sont plus sensibles à la dessiccation que les souches parentales ; le nombre de mutants observé dans la fraction survivante ne résulte donc pas d'une concentration (103).

HIEDA (50 et 51) démontre l'apparition de mutations chez *Saccharomyces cerevisiae* lorsque l'H.R. chute en dessous de 53 %, en présence d'oxygène.

ASADA et coll. (8 et 9) constatent pour des H.R. inférieures à 75 % une augmentation linéaire du nombre de cassures par brin d'ADN et du nombre de mutants induits pour arriver à un maximum à une H.R. de 0 %. Ces auteurs rejettent toute participation de l'oxygène, des chocs osmotiques lors de la réhydratation, des réactions aminocarbonyl, et des réactions de coupures enzymatiques dans ces phénomènes. Ils émettent l'hypothèse que mutations et dommages de l'ADN résultent du retrait de l'eau incongelable qui maintient la structure normale de l'ADN natif. L' a_w critique à laquelle la cellule ne possède plus d'eau congelable est de 0,75 pour tous les échantillons biologiques tels que *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*. Une déshydratation poussée au delà de 75 % H.R. entraînerait un changement réversible ou non de la conformation des macromolécules dont l'ADN. L'ADN est généralement attaché par endroit à la membrane cytoplasmique. Cet attachement pourrait être la cause d'un stress physique associé au changement de conformation de l'ADN.

ANDO et FUKADA (4) rapportent que la déshydratation sous vide de l'ADN *in vitro* entraîne une réduction de 10 à 20 % du poids moléculaire. Les expériences *in vivo* de ASADA et coll. (8) montrent une réduction de 60 %. L'hypothèse d'un stress physique du type : changement de conformation de l'ADN - attachement à la membrane cytoplasmique serait donc plausible.

En outre, la déshydratation réduit l'oxydation des acides aminés et augmente celle du glucose ainsi que la décarboxylation. Elle augmente la fuite des composés intracellulaires absorbant à 260 nm. L'addition d'inositol permet d'augmenter le taux de survie mais renforce les désordres métaboliques précédemment décrits. La synthèse de la β -galactosidase (enzyme adaptative) est fortement inhibée par la dessiccation ; l'addition d'inositol avant la déshydratation peut lever cette inhibition. Suite à ces observations, WEBB (98) suggère qu'un changement structurel dans les nucléoprotéines concernées dans la synthèse des protéines est responsable de la mort des cellules à la dessiccation (les dommages à la membrane seraient secondaires).

Cependant, HAMBLETON (47 et 48) démontre que des dommages aux parois bactériennes précèdent et contribuent très certainement à la mort des bactéries après dessiccation.

En ce qui concerne *Rhizobium*, BUSHBY et MARSHALL (25b) suggèrent qu'au cours de la dessiccation une altération de la perméabilité de la membrane cytoplasmique se produit, ce qui entraînerait la fuite de matériel intracellulaire. Chez les cellules survivantes, la couche de lipopolysaccharide reste à peu près intacte.

En tout état de cause, MACKEY et DERRICK (63) montre que, parmi les différents stress imposés à *Salmonella typhimurium*, la dessiccation se montre être le moins drastique. La phase de latence de la subculture après dessiccation reste relativement courte, même pour des taux de survie faible (ce qui implique des dommages de peu d'importance).

III. - INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

A. - EVOLUTION DES COURBES DE CROISSANCE EN FONCTION DE L'ACTIVITE DE L'EAU

La croissance et l'activité métabolique des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) dépendent essentiellement des possibilités d'échanges de la cellule avec son milieu extérieur et donc de l'eau disponible. On peut donc prévoir qu'une réduction de la disponibilité de l'eau entraînera une limitation de la croissance et un ralentissement de l'activité métabolique. Ces phénomènes sont représentés en figure 2, empruntée à RICHARD-MOLARD et coll. (81).

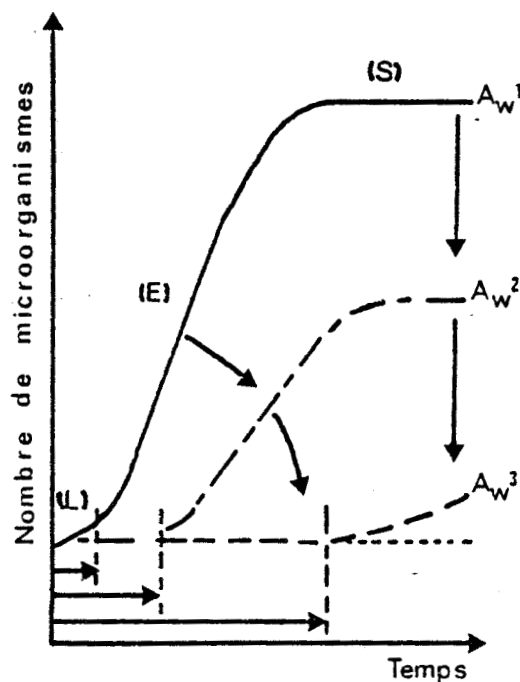


FIGURE 2 - COURBES DE CROISSANCE D'UN MICROORGANISME EN FONCTION DE L' a_w

A partir de la courbe de croissance d'une espèce, obtenue à une a_w optimale (a_{w1}), on observe pour des a_w réduites (a_{w2} et a_{w3}) une augmentation du temps de latence (L), une diminution de la vitesse de

croissance (E) et une diminution du nombre maximum de germes en phase stationnaire (S).

A la limite (a_w limite), il n'y a plus de croissance observable. Ceci correspond à un allongement indéfini de la phase de latence. Dans la plupart des cas, les germes bien qu'inhibés survivent parfaitement (81).

B. - ACTIVITE DE L'EAU LIMITE DE CROISSANCE DES MICROORGANISMES DES ALIMENTS

1 - Quelques exemples et leurs significations

L'importance de l' a_w dans la conservation et l'inocuité des aliments est à l'origine de nombreux travaux.

Une compilation de différentes publications, concernant l' a_w minimale de croissance de germes intervenant en microbiologie alimentaire, a été réalisée par LEISTNER et RODEL (58) (tab. 1). Un certain nombre de conclusions intéressantes ressortent de ces résultats.

Les bactéries se révèlent moins tolérantes aux a_w réduites que les levures, les germes gram négatif étant les plus exigeants en eau. Les levures sont elles-mêmes moins tolérantes que les moisissures.

Il est certes rassurant de noter qu'une a_w inférieure à 0,95 inhibe la multiplication de la majorité des bactéries gram négatif, des bactéries capables de former des endospores (*Bacillus*, *Clostridium*) et apparemment la germination de ces spores.

Parmi les principaux germes d'intoxication alimentaire, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropathogène et *Vibrio parahaemolyticus* seraient inhibés à des a_w inférieures à 0,95. *Staphylococcus aureus*

TABLEAU 1 - a_w MINIMALE DE CROISSANCE DES MICROORGANISMES
ASSOCIES AUX ALIMENTS D'APRES LEISTNER et
RÖDEL (58)

a_w	Bactéries	Levures	Moisissures
0.98	<i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i>	-	-
0.97	<i>Clostridium</i>	-	-
0.96	{ <i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	-	-
0.95	{ <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Citro-</i> <i>bacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>	-	-
0.94	{ <i>Lactobacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Vibrio</i>	-	-
0.93	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>	-	<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i>
0.92	-	{ <i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>	-
0.91	{ <i>Corynebacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	-	-
0.90	{ <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Hansenula</i> <i>Saccharomyces</i>	-
0.88	-	{ <i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Torulopsis</i>	<i>Cladosporium</i>
0.87	-	<i>Debaryomyces</i>	-
0.86	<i>Staphylococcus</i>	-	<i>Paecilomyces</i>
0.80	-	<i>Saccharomyces</i>	{ <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>
0.75	Bactéries halophiles	-	<i>Aspergillus</i>
0.70	-	-	<i>Eurotium</i>
0.62	-	<i>Saccharomyces</i>	<i>Eurotium</i>

montre une remarquable tolérance aux a_w réduites (0,91 à 0,86).

La croissance et la toxicogénèse chez *Clostridium botulinum* type C, E, A et B sont inhibées respectivement à a_w 0,98 ; 0,97 et 0,95. Pour *Staphylococcus aureus*, la toxicogénèse (enterotoxines A, B, C₁, C₂, D, E et F) serait inhibée à des a_w inférieures à 0,90. De même, la synthèse d'Aflatoxines (*Aspergillus flavus*) ne paraît guère possible en dessous de 0,83 - 0,86 a_w .

Des résultats similaires obtenus pour d'autres toxines bactériennes et mycotoxines confirment un écart parfois important entre l' a_w minimale de croissance du germe et l' a_w de toxicogénèse (58 et 81).

Ces résultats étant obtenus en conditions optimales, tous autres facteurs limitant écartés, il apparaît que les problèmes relatifs aux germes d'intoxications seraient résolus à des a_w de l'ordre de 0,95 - 0,90.

Il n'en va pas de même des germes d'altération des produits alimentaires. Levures et moisissures présentent, en effet, un spectre très large de croissance à des a_w très faibles.

Pour les produits alimentaires ce problème s'amplifie du fait des "flores complexes". Si on se contente de stabiliser le produit vis-à-vis des bactéries toxigènes, en se plaçant à une a_w de 0,85, les moisissures xérophiles peuvent se développer lentement et élever, de par leur métabolisme (libération d'eau), l' a_w du produit. La croissance d'espèces plus exigeantes en eau se produit alors. Par réaction en chaîne le développement de microorganismes pathogènes très exigeants en eau est alors possible (81).

Notons qu'un certain nombre de bactéries à gram positif qui sont impliquées dans des processus de fermentations souhaités (*Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Micrococcus*) tolèrent des a_w aussi faibles que 0,95 - 0,90. Un certain nombre de souches ont même été adaptées à des a_w encore

plus réduites. Des levures et moisissures du genre *Debaryomyces* et *Penicillium*, qui sont d'une grande importance dans la fermentation de charcuteries, se multiplient et sont métaboliquement actives à des a_w remarquablement basses (58).

2 - Interférence avec d'autres facteurs

La plupart des résultats consignés au tableau 1 ont été obtenus dans des conditions idéales de croissance. De toute évidence, les a_w limites citées doivent être inférieures pour peu qu'un autre facteur limitant intervienne (température, pH, potentiel red-ox).

Par exemple, selon LEISTNER et RODEL (58), l' a_w minimale de croissance pour *Staphylococcus aureus* est de 0,91 en anaérobiose mais de 0,86 en aérobiose. Le même type de considérations se retrouve pour les moisissures aérobies strictes.

La croissance de *Staphylococcus aureus* serait encore possible à a_w 0,85 à pH 5,5 mais ce seuil s'élève à a_w 0,90 si on abaisse le pH à 4,5 (81).

STRONG et coll. (90) décrivent des interactions très nettes entre le pH, la température et l' a_w minimale de croissance de *Clostridium perfringens*. BEUCHAT (16) décrit, pour *Vibrio parahaemolyticus*, un certain nombre de corrélations entre l' a_w , le soluté utilisé pour la réaliser et la température d'incubation.

Dans les milieux naturels tels que les sols, les recherches ont surtout porté sur les microorganismes adaptés aux conditions extrêmes : germes osmophiles et halophiles.

Les mécanismes d'action de l'influence de l' a_w sur la croissance et la survie de germes telluriques banals ont été moins étudiés.

C. - VALEURS SEUILS D' a_w POUR LA CROISSANCE DE *RHIZOBIUM*

En ce qui concerne les bactéries du genre *Rhizobium*, il y a peu de données relatives à l' a_w minimale de croissance. Les auteurs préférèrent, en effet, aborder le problème sous l'angle de la toxicité du chlorure de sodium.

1 - Quelques exemples

Les données, relevées dans la littérature, sont rassemblées dans le tableau 2.

Ces résultats ont été obtenus en milieu liquide, à température et pH optimaux des souches étudiées.

L' a_w limite la plus basse observée chez *Rhizobium* est de l'ordre de 0,98 (soit 3 % NaCl : une concentration en sel qui approche celle de l'eau de mer !).

Il semblerait y avoir une bonne corrélation entre l' a_w limite de croissance et le groupe d'inoculation.

D'une manière générale, les souches à croissance rapide, notamment *R. meliloti*, endurent les a_w les plus faibles. Les souches à croissance lente exigeraient des a_w nettement plus élevées.

Il existe, cependant, de nombreuses différences de tolérance au sein de souches d'un même groupe d'inoculation. Le record en la matière semble être celui d'une souche G₃ de *R. japonicum* ayant une a_w limite de 0,9844 (NaCl) et 0,93 (propanediol 1.2) (70). Ces résultats peuvent démontrer une tolérance intrinsèque à cette souche mais notons cependant qu'ils peuvent tenir en une sous-estimation de l' a_w du milieu de base trypticase (a_w 0,988) mesurée à l'hygromètre de LUFFT. En effet, très récemment, CHIRIFE et coll. (32) ont démontré que l' a_w d'une trentaine de milieux de culture liquides courants était de l'ordre de 0,9926 - 0,9992, à l'exception du milieu Urea Test Medium (0,9884).

TABLEAU 2 - a_w LIMITE DE CROISSANCE DE DIVERSES SOUCHES DE *RHIZOBIUM*, EN MILIEU LIQUIDE, SELON CERTAINS AUTEURS

Souches	Milieu de culture et soluté utilisé pour réduire l' a_w	a_w limite	Auteurs
<i>Rhizobium</i> sp. 1 souche	YEMB NaCl, KCl	0,990	(31)
2 souches	et Na ₂ SO ₄ en mélange	0,995	
<i>R. trifolii</i>	YEMB NaCl 0,7 %	≈ 0,9948 *	(77)
<i>R. phaseoli</i>	NaCl 3 %	≈ 0,9804	
<i>R. meliloti</i> (1 souche)	YEMB CaCl ₂ , 2H ₂ O NaCl	0,995 0,987	(89)
<i>R. leguminosarum</i> <i>R. japonicum</i> <i>R. meliloti</i> (<i>Agrobacterium</i>)	YEMB NaCl probablement	0,999 0,997-0,995 0,98 0,98	(25a)
<i>R. japonicum</i> (1 souche)	Trypticase (0,988) NaCl Propanediol 1.2 LiCl Saccharose Glycérol	0,9844 0,930 0,9875 0,9595 0,976	(70)
<i>R. japonicum</i>	YEMB NaCl 0,8 %	≈ 0,9942 *	(95)
<i>R. leguminosarum</i> (1 souche)	YEMB NaCl 0,58 %	≈ 0,9954 *	(85)
<i>R. meliloti</i> (1 souche)	M.M. NaCl 3 %	≈ 0,9804 *	(52)

YEMB : Yeast Extract Mannitol Broth

M.M. : Milieu Minimum

* : a_w non précisée par l'auteur et calculée par nos soins (a_w du milieu de base = 0,999) diminuée de la baisse d' a_w créée par le soluté d'après la table de LEISTNER et RÖDEL (58)



2 - Importance du soluté utilisé pour diminuer l' a_w du milieu de base

De nombreux auteurs pensent que la croissance à une a_w donnée n'est pas indépendante du soluté utilisé pour la réaliser, et classent ainsi les solutés par ordre de "toxicité" (16 et 90).

STEINBORN et ROUGHLEY (89) constatent qu'à a_w égales, le $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est plus inhibiteur que le NaCl sur *R. meliloti*.

UPCHURCH et ELKAN (96) remarquent la toxicité plus élevée du KCl comparée au NaCl sur *R. japonicum*.

MICHAUD-GOUBLET (70) démontre une toxicité croissante dans l'ordre : toxicité du LiCl >> NaCl > glycérol > saccharose > propane-1,2-diol sur *R. japonicum*.

Nous avons observé (66) pour deux souches de *R. meliloti* une toxicité croissante dans l'ordre : toxicité de l'acétate de sodium >> KCl \approx NaCl > LiCl > glycérol.

Nous voyons donc qu'il n'est pas possible d'établir une liste générale de toxicité des solutés utilisés pour réduire l' a_w . Cette toxicité varie non seulement suivant les espèces bactériennes mais également suivant les souches d'une même espèce. Il convient donc, lorsque l'on étudie l' a_w limite de croissance d'une espèce, de bien préciser les conditions expérimentales (solutés utilisés, température, pH, aération du milieu de culture, etc...).

3 - Adaptation à des milieux ayant des a_w de plus en plus faibles

CHEN et ALEXANDER (31) rapportent l'acclimatation à des a_w progressivement réduites pour *Flavobacterium*, une bactérie bâtonnet gram négatif non identifiée et *Rhizobium* s.p.

MENDEZ-CASTRO et ALEXANDER (69 rapportés par 70) signalent des adaptations remarquables (5,8 % NaCl) de *Rhizobium*. De tels phénomènes d'adaptation chez *Rhizobium* sont cependant contestés (25a et 70).

E. - EFFETS DU CHLORURE DE SODIUM SUR LA SYMBIOSE RHIZOBIUM- LEGUMINEUSE

Comme nous l'avons vu, les phénomènes d' a_w et de toxicité sont intimement liés. Il serait difficile d'évoquer les effets de l' a_w sans rappeler les effets du NaCl en raison de son importance dans bon nombre de régions.

De fait, de fortes teneurs en sel (notamment NaCl) peuvent limiter l'efficacité de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse à différents niveaux :

- en inhibant la croissance ou la vitalité de *Rhizobium* dans les inoculats et dans la rhizosphère ;
- en affectant le processus d'infection ;
- en inhibant les fonctions des nodules racinaires ;
- en réduisant la croissance, la photosynthèse et la fixation d'azote atmosphérique symbiotique des Légumineuses.

Un déclin trop rapide de *Rhizobium* dans les inoculats de Légumineuses semble être en relation avec l'accumulation de sel dans la tourbe utilisée comme support (88). Ces mêmes auteurs (89) démontrent une sensibilité plus importante de *R. trifolii* comparée à celle de *R. meliloti*. Dans différentes conditions (agar, milieu liquide, tourbe) la tolérance n'est pas la même, la tolérance de *Rhizobium* au NaCl dans la tourbe (ou dans le sol) ne peut donc être déterminée exactement par de simples expériences en milieu liquide.

BAGHDADLI (13) a remarquablement analysé l'influence du NaCl sur la symbiose. Pour plus de cent souches testées, il apparaît que les groupes *meliloti*, *Agrobacterium* et la moitié des souches du groupe

phaseoli présentent une bonne tolérance (3 % NaCl). Les groupes *trifolii*, *leguminosarum*, *japonicum* et "cowpea" montrent une tolérance médiane (1 %, 2 % maximum). Les *R. lupini* apparaissent les plus sensibles (0,5 %).

Cet auteur réalise également un certain nombre d'observations intéressantes sur la plantule et la nodulation : à partir de 0,5 % pour le Pois, la Luzerne et 0,75 % pour le Haricot, les paramètres de croissance sont fortement diminués (taille, longueur des racines, nombre de feuilles, surface foliaire et poids sec). Au delà de 0,5 % NaCl le développement des nodules est inhibée.

Après une étude bibliographique détaillée, l'auteur conclut que la sensibilité au NaCl de la symbiose est due à la sensibilité de la plante hôte mais n'exclut pas que dans certains cas la bactérie soit en partie responsable.

WINTER et LAUCHLI (106) situent la tolérance de *Trifolium alexandrinum* et *patense* à des concentrations identiques.

SANCHEZ-DIAZ et coll. (82) analysent l'effet de stress hydrique et salin sur trois Légumineuses : *Medicago sativa* présenterait une meilleure tolérance que *Trifolium repens* et *brachycalycinum*.

TU (95) étudie les interactions entre *R. japonicum* et les radicelles de Soja à des concentrations salines rhizosphériques comprises entre 0 % et 1,8 %. A la dose de 1 %, les radicelles manifestent peu d'enroulement et de déformation à l'inoculation. A 1,5 % ou plus, le chevelu racinaire est ratatiné. La croissance de *Rhizobium* diminue rapidement à partir de 0,8 %. La nodulation est complètement supprimée à des teneurs de 1,2 %. L'accroissement de la salinité provoque une baisse graduelle du poids frais et de la taille des plantules.

L'incapacité du Soja à noduler à des concentrations salines élevées serait due à une baisse de la colonisation bactérienne et au chevelu racinaire ratatiné. Dans ce cas précis, la plante serait donc légèrement plus tolérante que le microsymbionte.

SINGLETON et coll. (85) démontrent que la majorité des souches (croissances lente et rapide) peuvent croître en milieu liquide en présence de 0,58 % NaCl (conductivité électrique de 13,1 millisiemens par centimètre) alors qu'à de telles concentrations, on ne peut envisager une récolte rentable des Légumineuses d'intérêt agricole (tab. 3).

Récolte	Conductivité électrique (mScm ⁻¹) ¹
Orge	16
Trèfle (Birdsfoot)	10
Sesbania	9
Soja	9
Trèfle	4
Haricot (Kidneybean)	3
Pois	2

¹conductivité électrique associée à une baisse de 50 % de la récolte

TABLEAU 3 - TOLERANCE A LA SALINITE DE QUELQUES PLANTES AGRICOLES D'APRES BERNSTEIN (18) RAPPORTE PAR SINGLETON et coll. (85)

Ces auteurs soulignent que les souches à croissance rapide ne sont guère plus tolérantes que les souches à croissance lente, de même les souches isolées de sites à forte teneur en sel ne présentent pas de résistance supérieure aux souches de sols non affectés par la salinité. Notons cependant que la gamme de concentration en NaCl (jusque 0,58 %) n'était peut être pas assez étendue pour détecter de telles différences.

Ils ont également testé une série de traitements combinant les effets de stress salin et hydrique dans le sol sur la survie de *Rhizobium*. Les traitements s'étalent entre des conditions optimales pour la croissance des Légumineuses (conductivité électrique de $0,2 \text{ mScm}^{-1}$ et potentiel hydrique = $-0,1$ bars) et des conditions extrêmes qui sont inacceptables pour permettre une récolte rentable (conductivité électrique de 12 mScm^{-1} et potentiel hydrique = -15 bars). Aucune des souches testées ne perd rapidement sa viabilité même après traitement extrême (décroissance maximale de deux puissances de dix après quatre vingt cinq jours). Dans de telles conditions les souches à croissance rapide résistent beaucoup mieux et même se multiplient. Parmi les souches à croissance lente, la souche tolérante au NaCl présente une meilleure résistance aux traitements extrêmes.

Ces observations présentent un intérêt certain et sembleraient argumenter en faveur de l'hypothèse de CHEN et ALEXANDER (31).

VINCENT et coll. (97) avaient cependant montré une décroissance de quatre puissance de dix en quarante huit heures pour *R. trifolii* exposé à des conditions plus sévères (160 mM NaCl = C.E. de 16 mScm^{-1} et potentiel hydrique de -2216 bars soit 20 % H.R.) qui peuvent se rencontrer dans les inoculats.

Signalons encore que UPCHURCH et ELKAN (96) montrent une sensibilité au NaCl nettement plus élevée pour les mutants de *Rhizobium* incapables de synthétiser des polysaccharides extracellulaires.

Le partenaire de la symbiose le plus sensible au NaCl serait donc la plante. Cette constatation correspond bien au cycle de vie caractéristique des deux symbiontes. La Légumineuse hôte produit des graines et entre en dormance pendant la saison sèche alors que *Rhizobium*, pour survivre, doit être capable d'endurer des taux de salinité de plus en plus élevés au fur et à mesure que le sol se dessèche. Le spectre de tolérance très large observé aussi bien chez les souches de *Rhizobium* que parmi les variétés de Légumineuses permet d'envisager l'utilisation simultanée de *Rhizobium* et de Légumineuses tolérants à la sécheresse et au chlorure de sodium.

F. - MECANISMES DE TOLERANCE AUX FAIBLES a_w

1 - Résistance au choc osmotique

Comme le soulignent RICHARD-MOLARD et coll. (81) les différences de comportement des microorganismes aux faibles a_w tiennent certainement, pour une part, aux différences existant au niveau des parois cellulaires et plus précisément à la qualité de la liaison paroi cellulaire - membrane cytoplasmique. Cette liaison est relativement faible chez les bactéries gram négatif qui montrent les classiques images de plasmolyse lorsqu'elles se trouvent confrontées à un milieu hypertonique. De telles figures semblent plus rares chez les gram positifs.

Levures et moisissures se comportent comme les bactéries gram positif, ces différents groupes ayant en commun une paroi cellulaire formée d'un réseau de microfibrilles très résistantes composées de mucopeptides chez les bactéries gram positif, de glucanes et de chitine chez les levures et moisissures. De telles parois cellulaires permettent sans doute à la cellule de mieux supporter des chocs osmotiques (81).

Si un microorganisme peut tolérer un choc osmotique passager, la croissance dans un milieu de faible a_w requiert des modifications d'ordre physiologique permettant à la cellule d'adapter sa pression osmotique interne à la pression osmotique du milieu extérieur.

2 - Adaptation à la croissance à faible a_w

a) Quelques exemples d'adaptations

Divers organismes, phylogénétiquement très éloignés, lorsqu'ils sont confrontés à un stress en eau (grande concentration en NaCl ou concentration variant dans un large domaine, dessiccation ou gel) accumulent, en réponse directe au stress, des osmolytes intracel-

lulaires. Ces composés, osmotiquement actifs, permettent le bon fonctionnement enzymatique et sont dénommés solutés compatibles (23 et 107) (tab. 4).

YANCEY et coll. (107) passent en revue ces différents osmolytes et tirent un certain nombre de constatations intéressantes :

- les organismes soumis à de faibles a_w accumulent des métabolites riches en énergie plutôt que des ions inorganiques (comme Na^+ ou K^+) plus aisément disponibles dans le milieu ambiant ;

- les archéobactéries constituent la seule exception à cette règle et accumulent des quantités impressionnantes de K^+ ;

- parmi les composés riches en énergie accumulés, on distingue très nettement un petit nombre de familles chimiques (cf. tab. 4).

b) Les bactéries halophiles

Ainsi qu'il a été dit précédemment, les bactéries halophiles s'écartent de la stratégie généralement adoptée par divers organismes.

Les bactéries extrêmement halophiles, telles *Sarcina morrhuae* et *Halobacterium salinarium*, accumulent exclusivement de très fortes quantités d'ions potassium (23, 35 et 107).

Les bactéries modérément halophiles, telles *Micrococcus halodenitrificans* et *Vibrio costicolus*, accumulent des cations monovalents à une concentration pratiquement égale à celle du milieu extérieur ainsi que des acides aminés (35 et 55).

L'adaptation aux environnements hypersalés repose sur des changements biochimiques et la présence de structures adaptées (paroi, ribosome).

Organismes	Solutés compatibles	Auteurs
<u>- A - Alcools et polyols</u>		
<u>Cyanobactéries :</u>		
<i>Synechococcus</i> sp.	Glucosylglycérol	(107)
<i>Nostoc muscorum</i>	Saccharose	(20)
<u>Champignons :</u>		
<i>Saccharomyces rouxii</i>	Arabitol	(23)
<i>Asteromyces cruciatus</i>	Arabitol, glycérol et mannitol	(107)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glycerol	(62)
<u>Algues unicellulaires :</u>		
<i>Dunaliella</i> spp.	Glycérol	(24)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Saccharose	(107)
<i>Chlorella emersonii</i>	Saccharose et (Proline)	(45)
<u>Algues multicellulaires :</u>		
<i>Fucus</i> spp.	Mannitol	(107)
<u>Plantes vasculaires :</u>		
<i>Gossypium hirsutum</i>	Glucose, fructose et saccharose	(107)
<u>Insectes</u>		
<u>Crustacées</u>		
	Glycérol	(107)
<u>Vertébrés</u>		
<u>- B - Acides aminés et dérivés</u>		
<u>Eubactéries</u>		
	Ac. glutamique Ac. γ amino butirique Proline	(68)
<u>Cyanobactéries :</u>		
<i>Synechocystis</i>	Glycine bêtaïne	(71)
<u>Champignons :</u>		
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Proline	(62)
<u>Plantes vasculaires :</u>		
<i>Spartina alterniflora</i>	Proline et glycine bêtaïne	(29)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Proline	(107)
<i>Phaseolus aureus</i>	Proline, Asparagine (sucres)	(53)
<u>Invertébrés marins</u>	Acides aminés	(107)
<u>- C - Urée et méthylamines</u>		
<u>Poissons cartilagineux</u>		(107)
<u>- D - Ions inorganiques</u>		
<u>Archéobactéries :</u>		
<i>Halobacterium salinarium</i>	K ⁺	(35)
<i>Sarcina moruhuae</i>		



Le changement le plus spectaculaire réside probablement dans les protéines enzymatiques. La plupart des enzymes bactériennes sont inhibées par le KCl et le NaCl à des concentrations supérieures à 0,1 ou 0,2 M. La résistance des protéines des bactéries halophiles réside en un enrichissement en groupements acides (aspartyl, glutamyl). Ces substitutions impliquent que l'état natif fonctionnel de telles protéines ne peut se réaliser qu'à de fortes concentrations en K^+ . La plupart des enzymes des halobactéries requièrent des concentrations de 1 M, voire plus, pour atteindre l'optimum d'activité et de fait les bactéries halophiles sont strictement confinées à des environnements ayant une salinité ambiante très élevée (107).

Notons, cependant, que GALINSKI et TRUPER (43) signalent une bactérie extrêmement halophile (*Ectothiorhodospira halochloris*) qui accumule de la bêtaïne en condition de stress osmotique et dont les enzymes sont inhibés par de fortes concentrations en sel.

c) Les bactéries non halophiles

Elles présentent un large spectre de tolérance aux baisses d' a_w et donc au NaCl. Ces différences ne dépendent pas des résistances intrinsèques des enzymes cellulaires au sel ; la membrane serait en effet imperméable au sel et une différence de concentration est maintenue entre milieux intérieurs et extérieurs. En cas de faibles a_w , une telle situation aboutit à une déshydratation osmotique si aucune autre molécule (généralement des acides aminés), osmotiquement active, n'est accumulée dans la cellule (68).

Le pool, en acides aminés libres, a été déterminé par TEMPEST et coll. (94) et PULMAN et JOHNSON (78). Il serait cinq à vingt fois supérieur en concentration chez les bactéries gram positif. L'addition de chlorure de sodium conduit à une augmentation de la concentration en glutamate (notamment chez les bactéries gram négatif).

MEASURES (68) aboutit à une classification de la tolérance aux faibles a_w suivant le type d'acide aminé accumulé.

Les bactéries, relativement sensibles, accumulent de l'acide glutamique. De part sa nature (chargé négativement à pH neutre), cette accumulation requiert une accumulation concomitante d'un cation (généralement K^+) qui malheureusement est inhibiteur de l'activité enzymatique. L'efficacité d'un tel système reste donc réduite.

Les bactéries tolérantes, généralement à gram positif, accumulent l'acide γ aminobutyrique ou de la proline qui ne nécessite pas la présence d'un cation neutralisant (68). La proline semblerait stimuler la respiration de microorganismes cultivés à faibles a_w .

La tolérance de *Staphylococcus aureus* résulte d'une déshydratation osmotique puis d'une accumulation de proline exogène qui transporte de l'eau à l'intérieur de la cellule (57). D'autre part, ce microorganisme semblerait accumuler simultanément la glutamine par synthèse de "novo" et la proline par transport actif (3).

Cette classification simple présente cependant un certain nombre d'exceptions (2, 3, 37, 59).

ANAGNOSTOPOULOS et DHAVISES (2) ont montré qu'*E. coli* accumule du glucose suite à une baisse d' a_w .

CSONKA (37) isole chez *Salmonella typhimurium* une mutation, portant sur la surproduction de proline, qui augmente l'osmotolérance de ce microorganisme.

LE RUDULIER et coll. (59) démontrent que le choc osmotique imposé par 0,5 M NaCl cause une réduction de croissance et de l'activité fixatrice d'azote chez *Klebsiella pneumoniae*. L'addition de proline exogène lève ces inhibitions. Le gène mutant isolé chez *Salmonella* (37), porté par un plasmide (F'128 pro B⁺A⁺), a été transféré par conjugaison à *Klebsiella*. La proline intracellulaire, synthétisée alors à grand taux, présente des effets similaires à celle ajoutée dans le milieu.

Une telle voie de recherche pourrait avoir d'intéressants développements dans le cas de *Rhizobium*.

Les mécanismes d'adaptation de *Rhizobium* aux faibles a_w restent encore mal connus.

Cependant, MICHAUD-GOUBLET (70) ne détectent aucune accumulation d'ions ou d'acides aminés chez *Rhizobium japonicum* soumis à de faibles a_w .

Par contre HUA et coll. (52) rapportent une accumulation de glutamate (jusque 88 % du pool d'acides aminés) lorsque *Rhizobium* sp. WR 1001 est cultivé en présence de 500 mM NaCl.

De même, YELTON et coll. (108) montrent une accumulation de glutamate et de K^+ lorsque *Rhizobium japonicum* USDA 191 (à croissance rapide mais nodulant le soja) cultive à 400 mM NaCl.

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

Une bonne survie et une multiplication dans les inoculats et le sol conditionnent souvent la réussite de l'inoculation artificielle de *Rhizobium*. Sécheresse et salinité posent, à cet égard, un certain nombre de problèmes intimement liés.

L'importance de l' a_w dans les différents types de supports, nous a fait envisager l'étude des relations entre la survie de *Rhizobium meliloti* et le degré de déshydratation atteint. L'étude de paramètres tels que la présence de l'oxygène, la vitesse de déshydratation, l'âge physiologique des cellules et la présence de polysaccharides nous a permis d'apprécier l' a_w optimale de conservation.

Les processus de conservation doivent permettre le maintien intégral des caractères génétiques de la souche ; l'apparition de mutants dans nos conditions expérimentales a donc été recherchée.

D'autre part, la salinité et par voie de conséquence l' a_w influencent notablement la croissance de *Rhizobium*. Nous avons donc étudié, en toute première approche, l' a_w minimale et optimale de croissance de quelques souches de *Rhizobium* en milieux liquides. Enfin, l'influence d'éventuels osmorégulateurs sur la croissance et la tolérance à la conservation à a_w 0 a été envisagée.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. - LES SOUCHES BACTÉRIENNES ÉTUDIÉES

Nous avons étudié trois souches :

- la souche de *Rhizobium meliloti* M2011 provenant de l'Institut National de la Recherche Agronomique - 78000 Versailles, France ;
- la souche de *Rhizobium meliloti* M1.5 provenant de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux - 5800 Gembloux (FSAG), Belgique ;
- la souche de *Rhizobium japonicum* J5 provenant également de la FSAG - 5800 Gembloux, Belgique.

Les deux premières souches (M2011 et M1.5) ont été isolées de nodules de *Medicago sativa* et sont à croissance rapide. La dernière (J5) a été isolée de nodules de soja et est à croissance lente. Les souches M1.5 et J5 ont été essentiellement étudiées lors de l'influence de l' a_w sur la croissance de *Rhizobium*.

La conservation des souches est pratiquée soit à partir d'isollements sur boîte de Petri, soit sur gélose inclinée, coulée en tube fermé par un capuchon à vis, conservés tous deux à + 4°C.

Les souches sont également conservées à - 20°C en milieu R.C.L. mannitolé à 1 % et additionné de 20 % de glycérol.

II. - LES MILIEUX DE CULTURE

- Milieu *Rhizobium* Complet : R.C., DELATTRE (40). Sa composition est la suivante :

. K_2HPO_4	1	g
. $MgSO_4, 7H_2O$	0,2	g
. Extrait de levure (Difco)	1	g
. Eau distillée	q.s.p	1 litre

Le pH est ajusté à 25°C entre 7 et 7,5 et le milieu stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. La source de carbone (mannitol) est ajoutée à la concentration finale de 1 %.

Ce milieu liquide (R.C.L.) a été utilisé comme milieu de production de cellules de *Rhizobium*. Gélifié à 1,2 %, il nous a servi de milieu de dénombrement, d'isolement et de conservation (R.C.G.)

- Milieu Tryptone Yeast : T.Y. de composition suivante :

. Tryptone (Difco)	5	g
. Extrait de levure (Difco)	3	g
. $CaCl_2, 2H_2O$	0,88	g
. Eau distillée	q.s.p.	1 litre

Le $CaCl_2, 2H_2O$ est stérilisé séparément et ajouté stérilement au moment de l'emploi. Le milieu de base est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

- Milieu minimum R., DELATTRE (40). Sa composition est définie comme suit :

. K_2HPO_4	0,5	g
. NH_4NO_3	0,5	g
. $MgSO_4, 7H_2O$	0,2	g
. Eau distillée	q.s.p.	1 litre

Le pH est ajusté entre 7 et 7,5 et le milieu stérilisé à 120°C

pendant 20 minutes. Le mannitol est ajouté à concentration finale de 1 %. La biotine à 0,01 µg/ml et la thiamine à 0,5 µg/ml (concentrations finales) sont stérilisées par filtration (0,2 µm) et ajoutées stérilement au moment de l'emploi.

III. - LE TAMPON DE NON PROLIFÉRATION : T.N.P.

Il présente la composition suivante :

- . K_2HPO_4 1 g
- . $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g
- . Eau distilléeq.s.p. 1 litre

Le pH est ajusté entre 7 et 7,5 et le tampon est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

Ce tampon a été utilisé pour réaliser les dilutions décimales et nous a permis de laver et de remettre en suspension les cellules bactériennes.

IV. - LES PRÉCULTURES ET CULTURES

Les précultures ont été effectuées dans des tubes de verre (20 x 220 mm), contenant 5 ml de milieu R.C.L. et fermés d'une bourre de coton cardé. Chaque tube est inoculé par un clône provenant d'un isolement.

Lorsque les expériences nécessitent une masse bactérienne plus importante, 1 ml de cette préculture est ensemencé dans un flacon (de

300 ml) contenant 50 à 100 ml de milieu R.C.L. et fermé par une bourre de coton cardé entouré d'une gaze.

L'incubation de ces cultures est toujours réalisée à + 30°C sur table d'agitation rotative (MVS.3 Biolafitte) à 85 rotations par minute pour les flacons et sur table d'agitation horizontale (Biolafitte) à 50 saccades par minute pour les tubes.

Des isolements sont systématiquement effectués par épuisement d'une öse sur trois boîtes de Petri contenant 20 ml de R.C.G. Une observation microscopique est réalisée lorsque subsiste le moindre doute. Régulièrement les souches de *Rhizobium meliloti* sont testées pour leur infectivité sur la luzerne (*Medicago sativa*, variété "Magali") par des techniques déjà éprouvées au laboratoire.

V. - LES MÉTHODES D'ÉVALUATION DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE

A. - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

La croissance est contrôlée par mesure de l'absorbance à 600 nm, au spectrophotomètre ZEISS. Dans certains cas, nous avons suivi l'évolution du pH.

B. - METHODES MICROBIOLOGIQUES

Les dilutions décimales sont effectuées dans le T.N.P. en prenant bien garde d'agiter convenablement au Vortex. Pour chaque dilution, une partie aliquote de 1 ml est prélevée et déposée au fond d'une boîte de Petri. On coule alors 20 ml de milieu R.C.G. préalablement

fondu et gardé à 45°C. On homogénéise parfaitement. Deux ou trois boîtes sont ensemencées pour chaque dilution. La lecture s'effectue après quatre jours d'incubation à 30°C.

VI. - LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONSERVATION DE *RHIZOBIUM MELILOTI* À DIFFÉRENTES a_w

Il nous faut rappeler que l' a_w et l'Humidité Relative sont deux grandeurs proportionnelles et que dans une enceinte close à l'équilibre, il y a équivalence entre l'H.R. de l'air et l' a_w de l'échantillon placé dans cette enceinte (30).

Ex. : pour une H.R. de 43 %, à l'équilibre, nous aurons une a_w de 0,43 pour l'échantillon.

A. - SOLUTIONS ETALONS D' a_w

Elles sont utilisées pour régler l'H.R. de l'atmosphère dans une enceinte de volume restreint. Le conditionnement de l'atmosphère peut s'effectuer soit en statique à pression atmosphérique ou sous vide, soit en dynamique.

Deux types de solutions peuvent être utilisés :

- solutions saturées de sel ou de solutés de faible masse moléculaire ;
- solutions plus ou moins diluées de glycérol, d'acide sulfurique, de chlorure de lithium et de chlorure de sodium.

Lors de l'étude de la conservation de *Rhizobium meliloti* 2011 à différentes a_w , nous nous sommes servi des solutions saturées de sels pour imposer l' a_w de conservation.

B. - SOLUTIONS SATUREES DE SELS OU DE SOLUTES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE

Il convient d'utiliser des sels de grande pureté chimique et de l'eau distillée. Ces solutions saturées ont été obtenues par dissolution et saturation à chaud, après refroidissement un excès de cristaux est ajouté.

Ces solutions saturées sont d'un emploi aisé, cependant les gammes d'H.R. (donc d' a_w) obtenues sont discontinues et pour une même a_w des écarts importants peuvent être observés entre les différentes sources bibliographiques.

Les principales valeurs d' a_w correspondant aux solutions saturées sont résumées au tableau 5. Ce tableau résulte de différentes études bibliographiques effectuées par BIZOT et coll. cités par MULTON et coll. (72).

C. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL RETENU LORS DE CETTE ETUDE

Comme support de déshydratation et de conservation, nous avons utilisé des membranes de filtration Sartorius (type SM 11307 de diamètre 37 mm et de porosité 0,2 μm) dans la majorité des cas. Pour quelques expériences, des membranes Millipore (type HAWP de diamètre 47 mm et de porosité 0,45 μm), ont été utilisées également. Ce type de support est très souvent employé lors d'expériences de ce genre (9, 51 et 98).

TABLEAU 5 - ACTIVITE DE L'EAU DES SOLUTIONS SATUREES POUR
TROIS TEMPERATURES. COLLATIONNE D'APRES LES
DONNEES LES PLUS SURES DE LA LITTERATURE SELON
BIZOT et coll. CITES PAR MULTON et coll. (72)

	20°C	25°C	30°C
NaOH	0,0698	0,0595	0,0687
LiCl	0,114	0,1115 - 0,120	0,1116
KC ₂ H ₃ O ₂ (1,5 H ₂ O)	0,231	0,226	0,220
MgCl ₂	0,303	0,3273 - 0,332	0,3238
Na I	0,3918	0,3775	0,3625
CrO ₃	0,386	0,396	0,399
K ₂ CO ₃ ·2H ₂ O	0,440	0,438 - 0,4276	0,436
Mg (NO ₃) ₂	0,5447	0,5286	0,5133
Na ₂ Cr ₂ O ₇	0,548	0,535	0,520
NaBr	0,587	0,5770	0,563
CuCl ₂	0,684	0,686	0,685
K I	0,6986	0,6876	0,6785
SrCl ₂	0,7253	0,7083	0,6911
NaNO ₃	0,7513	0,7379	0,7275
NaCl	0,7542	0,7532	0,7521
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,803	0,7997	0,796
KBr	0,8177	0,8071	-
KCl	0,8513	0,8432	0,8353
Na ₂ SO ₄	0,869	0,8595	0,864
K ₂ CrO ₄	0,866	0,864	0,863
BaCl ₂	0,9069	0,9026	-
KNO ₃	0,932	0,920	0,907
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,922	0,927	0,911
K ₂ SO ₄	0,972	0,969	0,966
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,9793	0,9800	0,9706



Une culture bactérienne de densité optique (à 600 nm) 1,2 est centrifugée sur Sorval R.C. 2 à 6 500 tours/minute (soit 6876 g, le rotor étant un GSA) pendant 15 minutes. Après reprise dans le T.N.P., les cellules sont centrifugées à nouveau et reprises dans du T.N.P.. La concentration cellulaire initiale, toujours comprise entre 1 et 3.10^9 bactéries/ml, a été choisie de manière à éviter un nombre trop important de couches cellulaires sur la membrane de filtration. La formation de telles couches entraînerait une perte en eau ralentie (98).

La suspension bactérienne préparée de cette manière, est rapidement filtrée à raison de 1 ml par mise sous vide rapide de la fiole de filtration (en 5 s.).

L'ensemble filtre et bactéries est prélevé stérilement et déposé sur un disque de carton sec ("dry absorbent pads") afin d'enlever l'excès d'eau retenu à la face inférieure du filtre.

Cet ensemble est alors repris et disposé dans un tube de 16 mm de diamètre et 100 mm de hauteur.

Ce tube est placé stérilement dans une enceinte de 125 ml contenant 20 ml de solution sur-saturée (provoquant l'H.R. et donc l' a_w désirées).

Nous avons retenu les solutions saturées des sels suivants pour obtenir les a_w respectives :

Sels	$a_w = \text{H.R.}/100$
KCl	0,83
NaCl	0,75
NaNO ₂	0,66
K ₂ CO ₃	0,43
KC ₂ H ₃ O ₂	0,22

Le silica gel (Prolabo) de granulométrie 2 à 3,5 mm, permet d'obtenir une a_w de 0. En plusieurs occasions, des enceintes, contenant de l'eau distillée (a_w 1), ont été utilisées pour montrer l'absence de léthalité dans de telles conditions de conservation (66).

L'échantillon est déposé dans l'enceinte, à a_w désirée ; celle-ci est alors bouchée hermétiquement par un opercule en caoutchouc et une capsule évidée à vis.

L'enceinte est mise sous vide ou laissée à pression atmosphérique suivant l'expérience. Elle est entreposée à 30°C.

Après des durées de conservation déterminées, les échantillons sont réhydratés par 2 ml de T.N.P. Un aliquot de 0,5 ml est prélevé pour la numération. Sur la partie restante, nous effectuons systématiquement un isolement.

VII. - LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE *RHIZOBIUM* EN MILIEUX DE DIFFÉRENTES a_w

A. - PRINCIPE

Les microorganismes nécessitent la présence de substances nutritives (source de carbone, d'azote, éléments minéraux, facteurs de croissance, etc...) pour assurer leur croissance. Suivant la définition même de l' a_w , tous ces éléments contribuent à la diminution de l' a_w . L' a_w des milieux de culture pour microorganismes sera donc toujours inférieure à 1 (a_w de l'eau pure). Signalons que l' a_w de la majorité des milieux de culture utilisés en bactériologie courante se situe à 0,995 et que la stérilisation des milieux n'entraîne une diminution d' a_w que de 0,0001 à 0,0002 unité a_w (32). L' a_w des milieux utilisés lors de cette étude ne nous est pas connue avec précision ;

cependant, la composition du milieu R.C. mannitolé est voisine de celle du milieu Yeast Extract Mannitol d' a_w 0,9990 (25a). Cette valeur a été considérée comme valeur de base.

B. - REALISATION DE MILIEUX A DIFFERENTES a_w

Afin de réaliser une gamme de milieux à différentes a_w , nous nous sommes reporté à des tables citées dans la bibliographie : LEISTNER et RODEL (58) tableau 6, ROBINSON et STOKES cités par MICHAUD-GOUBLET (70) tableau 7. Ces tables nous donnent des valeurs de diminutions d' a_w réalisées par l'emploi de différents solutés.

Les valeurs de réductions d' a_w citées dans la littérature correspondent à des solutions aqueuses, pures de solutés. Les valeurs d' a_w citées seront donc valables, si nous admettons qu'il n'y a pas d'interférences entre les substances nutritives du milieu et le soluté ajouté pour en modifier l' a_w . Certains auteurs (33) estiment que de telles interactions ne peuvent modifier de manière sensible la baisse d' a_w produite.

Pour une même diminution d' a_w , nous avons utilisé trois et parfois quatre solutés différents afin de détecter une éventuelle toxicité de ces solutés (tab. 8). Lors de ces expériences, le flacon de culture est toujours hermétiquement fermé par un opercule en caoutchouc.

TABLEAU 6 - DIMINUTION D' a_w CAUSEE PAR DIFFERENTS SOLUTES, D'APRES
LEISTNER et RÖDEL (58)

Solutés	Baisses d' a_w provoquées par les solutés à (%)					
	0,1	0,3	1,0	2,0	3,0	5,0
Lithium chloride	0,0010	0,0030	0,0100	-	-	-
Sodium chloride	0,0006	0,0019	0,0062	0,0124	0,0186	-
Polyphosphate	0,0006	0,0018	0,0061	-	-	-
1,2-Propylène glycol	0,0005	0,0015	0,0100	-	-	-
Sodium citrate x 5,5 H ₂ O	0,0005	0,0014	0,0047	-	-	-
Ascorbic acid	0,0004	-	0,0041	-	-	-
Glucono-d-lactone	0,0004	0,0012	0,0040	-	-	-
Sodium acétate, cryst	0,0004	-	0,0037	-	-	-
Sodium hydrogentartrate	0,0003	-	0,0033	-	-	-
Glycérol	0,0003	0,0009	0,0030	0,0060	0,0090	0,0150
Potassium sorbate	0,0003	0,0008	0,0026	-	-	-
Glucose	0,0002	0,0006	0,0024	-	-	-
Lactose	0,0002	0,0006	0,0022	0,0044	0,0066	-
Sucrose	0,0002	0,0006	0,0019	-	-	-
Milk protein	0,0001	0,0004	0,0013	0,0026	0,0039	-
Fat	0,0001	0,0002	0,0006	0,0012	0,0019	0,0031



TABLEAU 7 - a_w DE DIVERSES SOLUTIONS AQUEUSES PURES DE
SOLUTES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS, D'APRES
ROBINSON et STOKES CITES PAR MICHAUD-GOUBLET (70)

m	NaCl	KCl	CaCl ₂
	a_w	a_w	a_w
0,1	0,9966	0,9966	0,9954
0,2	0,9933	0,9934	0,9907
0,3	0,9900	0,9902	0,9859
0,4	0,9868	0,9870	0,9808
0,5	0,9835	0,9839	0,9755
0,6	0,9802	0,9807	0,9699
0,7	0,9769	0,9776	0,9642
0,8	0,9735	0,9744	0,9581
0,9	0,9702	0,9713	0,9517
1,0	0,9668	0,9681	0,9450
1,2	0,9601	0,9619	0,9307
1,4	0,9532	0,9556	0,9152
1,6	0,9461	0,9492	0,8986
1,8	0,9389	0,9428	0,8808
2,0	0,9316	0,9364	0,8618
2,2	0,9242	0,9299	
2,4	0,9166	0,9234	
2,6	0,9089	0,9169	
2,8	0,9011	0,9103	
3,0	0,8932	0,9037	
3,2	0,8851	0,8971	
3,4	0,8769	0,8904	
3,6	0,8686	0,8837	
3,8	0,8600	0,8770	
4,0	0,8515	0,8702	
4,2	0,8428	0,8634	
4,4	0,8339	0,8566	
4,6	0,8250	0,8498	
4,8	0,8160	0,8429	
5,0	0,8068		
5,2	0,7976		
5,4	0,7883		
5,6	0,7788		
5,8	0,7693		
6,0	0,7598		



TABLEAU 8 - CONCENTRATIONS, EXPRIMEES EN %, DE DIFFERENTS
SOLUTES POUR OBTENIR DES BAISSSES D' a_w
CROISSANTES

Baisse d' a_w de	Solutés				
	LiCl	NaCl	KCl	Acétate de Na, 3H ₂ O	Glycérol
0,003	0,3	0,5			1
0,006	0,43				2
0,009	0,65				3
0,0124	0,89	2	2,55		
0,015	1,1				5
0,0186	1,34	3	3,82		
0,0248	1,78	4			
0,03	2,16	5	6,37	8,11	10
0,04	2,88			10,8	
0,05	3,6				
0,062		10			
0,1	7,19			27	



R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

I. - ÉTUDE DE QUELQUES PARAMÈTRES INTERVENANT DANS LA CONSERVATION DE *RHIZOBIUM MELILOTI* 2011 À DIFFÉRENTES a_w

A. - ETUDE DE LA PERTE EN EAU DES ÉCHANTILLONS DANS DES ENCEINTES A DIFFÉRENTES HUMIDITE RELATIVE

Les membranes de filtration (Sartorius type SM 11307, diamètre 37 mm et porosité 0,2 μm) sont utilisées comme support de filtration et de dessiccation. Après pesée (P_1), la membrane est montée sur l'appareil de filtration et un millilitre de suspension bactérienne, lavée de son milieu de culture, est filtré par mise sous vide rapide de l'appareil (cinq secondes). La membrane est ensuite déposée sur un disque de carton sec ("dry absorbent pads") pour enlever l'excès d'eau. Elle est à nouveau pesée très rapidement (P_2). La teneur initiale en eau de l'échantillon est estimée ($P_2 - P_1$). La membrane est alors placée dans un dessiccateur à H.R. constante. Une série d'échantillons est ainsi réalisée. A intervalles réguliers, un échantillon est pesé rapidement pour apprécier la perte en eau en fonction du temps.

Deux types d'expériences ont été réalisées :

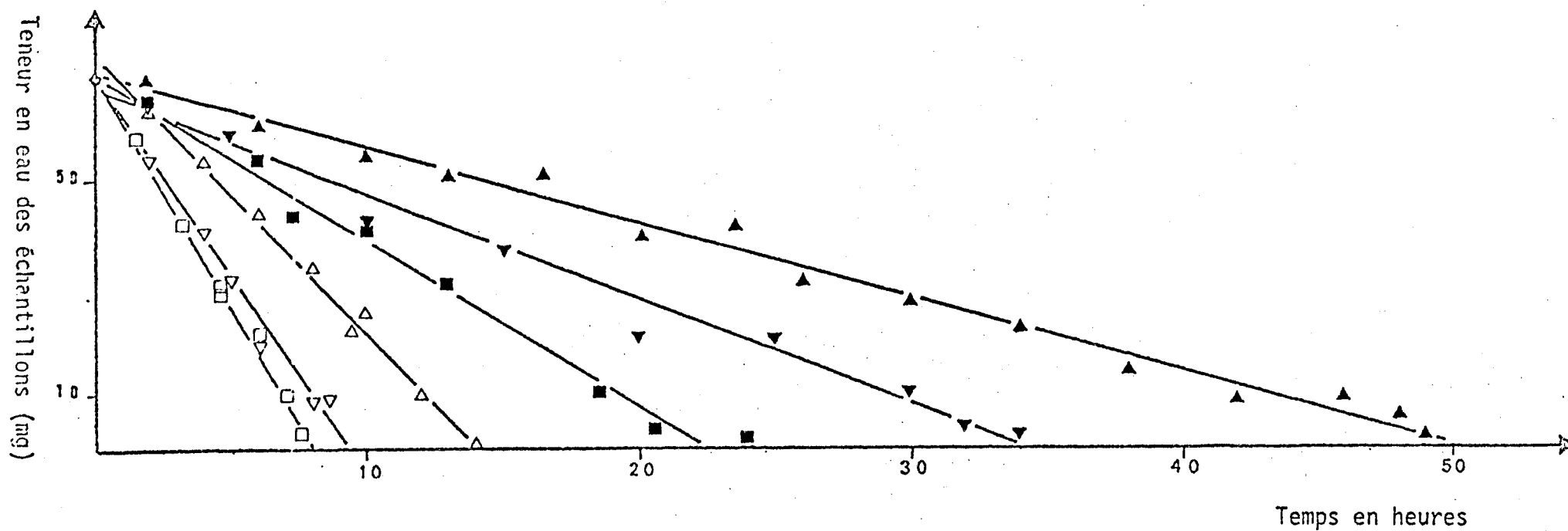
- perte en eau dans des enceintes à différentes H.R. sous pression atmosphérique,
- perte en eau dans les mêmes enceintes mises sous vide.

Dans de telles conditions de filtration, la teneur initiale en eau des échantillons est relativement homogène : 70 mg \pm 5 mg. Lors des travaux antérieurs (66), l'emploi de membrane Millipore (diamètre 47 mm et porosité de 0,45 μm) ne nous avait pas permis d'atteindre cette précision ; la teneur initiale en eau était de 130 mg \pm 30 mg.

L'étude des résultats représentés en fig. 3 et 4 nous permet d'affirmer que la perte en eau est linéaire.

La solution sur-saturée impose non seulement une H.R. caractéristique mais également une vitesse de transfert de l'eau.

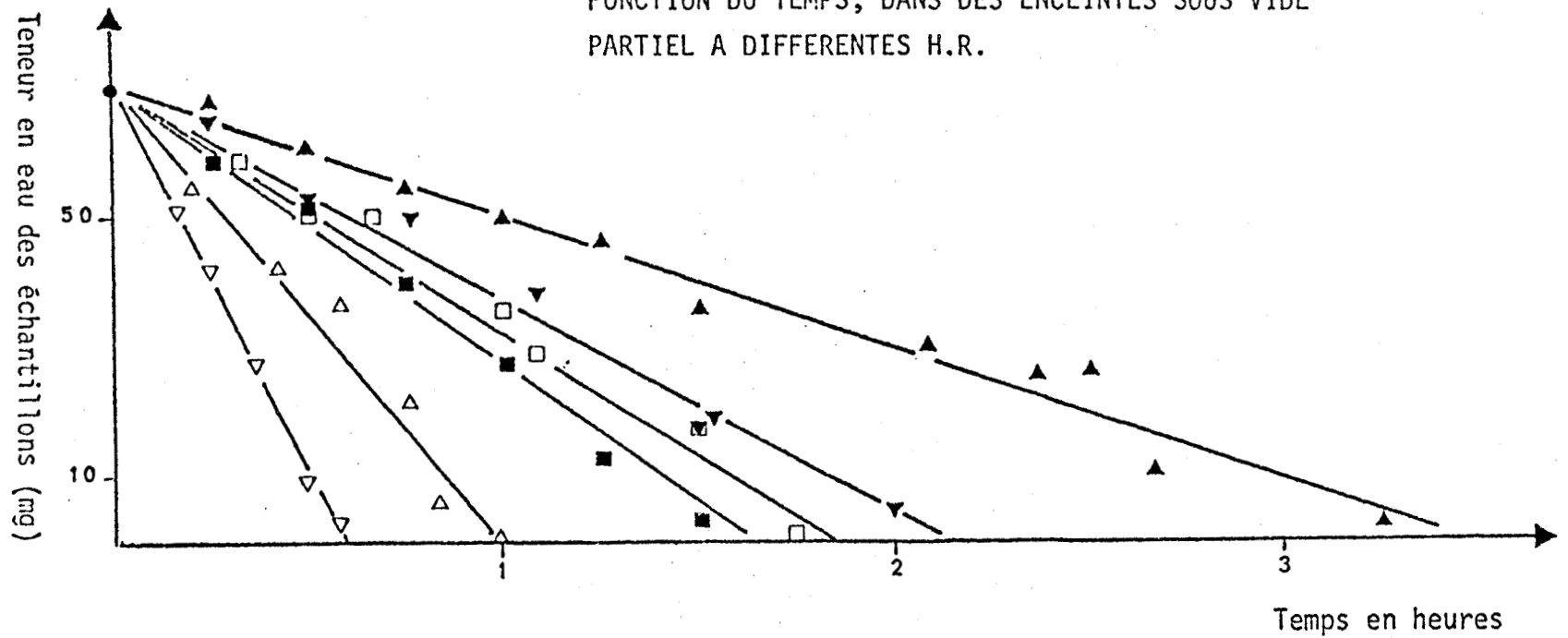
FIGURE 3 - EVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU DES ECHANTILLONS
EN FONCTION DU TEMPS, DANS DES ENCEINTES A
PRESSION ATMOSPHERIQUE ET A DIFFERENTES H.R.



- H.R. de 0 (□), 22 (▽),
43 (△), 66 (■), 75 (▼),
et 85 % (▲).



FIGURE 4 - EVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU DES ECHANTILLONS EN
 FONCTION DU TEMPS, DANS DES ENCEINTES SOUS VIDE
 PARTIEL A DIFFERENTES H.R.



- H.R. de 0 (□), 22 (▽),
 43 (△), 66 (■), 75 (▼),
 et 85 % (▲).



La mise sous vide partiel de l'enceinte de dessiccation accélère de manière notable les vitesses de perte en eau ; d'un facteur 15, quand on utilise les solutions sur-saturées et seulement d'un facteur 4,5 dans le cas d'utilisation du silica gel activé.

Les temps nécessaires à l'obtention des équilibres, sous vide et à pression atmosphérique, dans des enceintes à différentes H.R. et la perte en eau par heure calculée pour un échantillon ayant une teneur initiale en eau moyenne de 70 mg, sont résumés dans le tableau 9.

La linéarité de la perte en eau à partir d'échantillons soumis à une H.R. donnée a déjà été signalée par VINCENT et coll. (97). Ces auteurs situent l'obtention de l'équilibre en 6, 8 et 10 heures dans des enceintes sous pression atmosphérique à H.R. 0 %, 20 % et 60 % respectivement.

Il semble certain que le volume de la solution sur-saturée par rapport au volume total de l'enceinte, la quantité d'eau à retirer, la proximité de l'échantillon de la surface de la solution et enfin une opération sous vide partiel peuvent influencer notablement la durée de temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre.

Compte-tenu de la faible quantité de cellules par rapport au support et de la précision des pesées, il nous est très difficile de déterminer la teneur finale en eau des échantillons ainsi que l'évolution de la perte en eau en-dessous d'une teneur de 0,2 mg.

B. - INFLUENCE DE L'OXYGENE SUR LA CONSERVATION DE RHIZOBIUM MELILOTI 2011 A DIFFERENTES a_w

Afin d'apprécier l'influence de ce paramètre, nous avons étudié les combinaisons de traitements suivants :

TABLEAU 9 - TEMPS NECESSAIRE A L'OBTENTION DES EQUILIBRES ET PERTE EN EAU PAR HEURE, POUR DES ECHANTILLONS AYANT UNE TENEUR INITIALE EN EAU DE 70 mg, DANS DES ENCEINTES A DIFFERENTES H.R. A 30°C

Humidité relative de l'enceinte en %	Enceinte sous vide partiel		Enceinte à pression atmosphérique	
	Temps nécessaire aux équilibres en heures	Perte en eau (mg H ₂ O/h)	Temps nécessaire aux équilibres en heures	Perte en eau (mg H ₂ O/h)
0	1,83	38	8	8,75
22	0,58	120	9,22	7,5
43	1	70	14,22	5
66	1,65	42	22,67	3
75	2,13	33	36	2
85	3,45	20,5	50,08	1,5



- déshydratation et conservation à pression atmosphérique,
- déshydratation à pression atmosphérique et conservation sous vide,
- déshydratation et conservation sous vide,
- déshydratation sous vide et conservation en présence d'air.

Les échantillons sont déshydratés à la vitesse qui est imposée par la solution sur-saturée (ou le silica gel activé).

Ex. : Pour les échantillons conservés à une H.R. de 22 %, la déshydratation à pression atmosphérique s'effectuera en 9,22 heures et en 0,58 heure sous vide conformément aux temps déterminés précédemment.

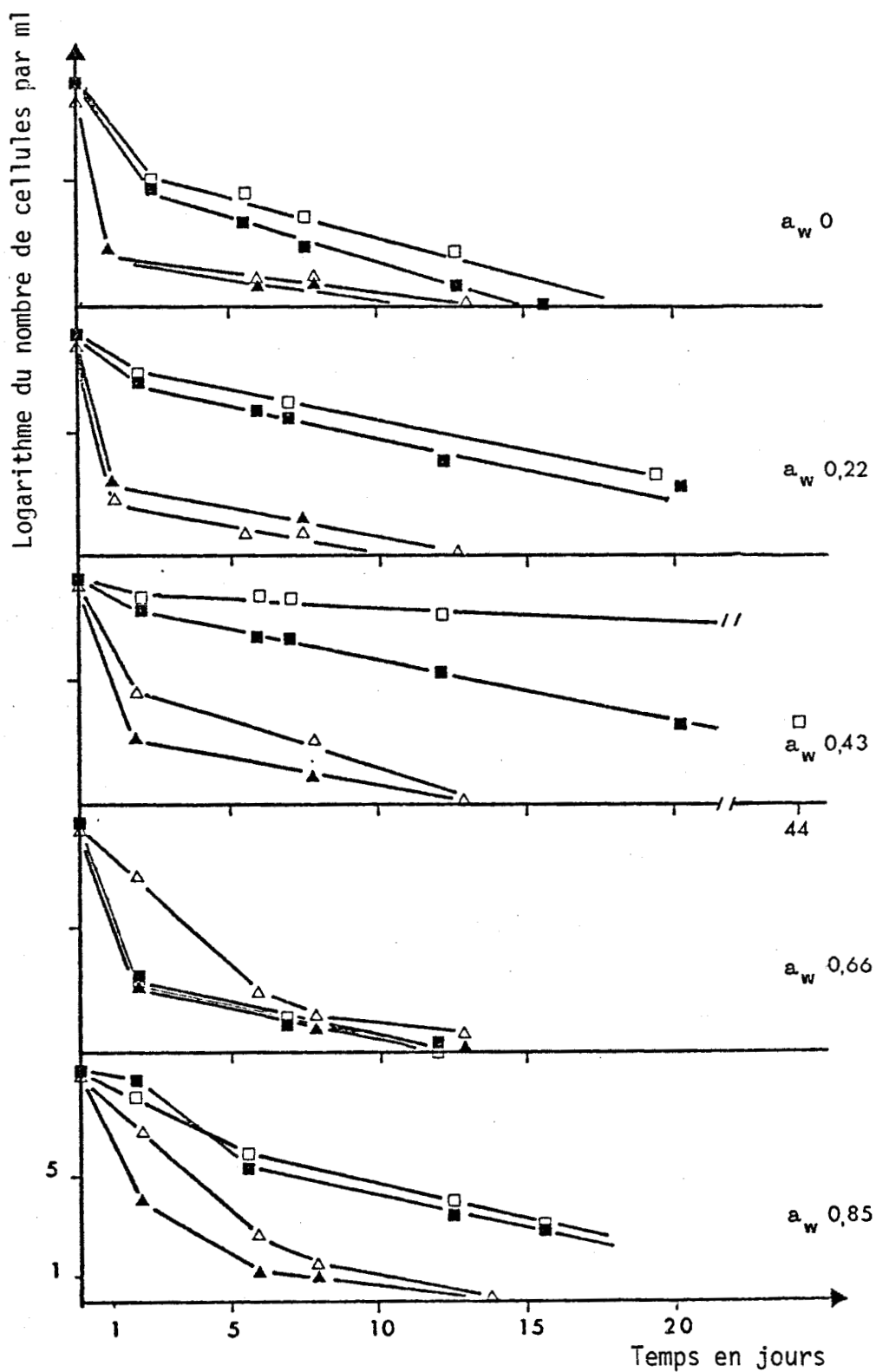
L'analyse des résultats obtenus (fig. 5) permet de préciser un certain nombre de points :

- Les taux de survie obtenus juste après déshydratation rapide sont légèrement inférieurs à ceux observés après déshydratation lente (notamment pour les dessiccations menées jusque des a_w de 0 ; 0,22 et 0,43). Les taux de survie relevés après conservation, quelle que soit l' a_w de conservation, sont nettement supérieurs lorsque la phase de déshydratation a été pratiquée de manière lente plutôt que de manière rapide. La seule exception se présente pour une conservation à a_w 0,66. Ces observations feront l'objet d'une étude particulière.

- Après déshydratation lente, l' a_w optimale de conservation en présence d'air serait de 0,43. Des déshydratations plus poussées (< à 0,43) ou moins complètes (> à 0,43) seraient nocives.

- Après déshydratation rapide, il semble très difficile de préciser une a_w optimale de conservation. En effet, si dans les premiers temps de conservation les meilleurs taux de survie sont observés pour des a_w élevées, dans tous les cas étudiés *Rhizobium* M2011 disparaît totalement après 5 à 10 jours de conservation. Nous retrouvons là un certain nombre de résultats acquis (66).

FIGURE 5 - INFLUENCE DE L'OXYGENE SUR LA CONSERVATION DE
RHIZOBIUM MELILOTI M2011 A DIFFERENTES a_w



- déshydratation lente et conservation sous vide
- déshydratation lente et conservation sous air
- △ déshydratation rapide et conservation sous vide
- ▲ déshydratation rapide et conservation sous air



- Dans la majorité des cas la présence d'air pendant la conservation est néfaste. Ce phénomène est surtout marqué pour les a_w de conservation 0,43 et 0,66 ainsi que pour une conservation à a_w 0,85 après déshydratation rapide.

L' a_w optimale de conservation en présence d'air déterminée à 0,43 lors de cette étude est voisine de celle trouvée par de nombreux auteurs : en présence d'air, les a_w de conservation 0 et 0,22 sont plus nocives que l' a_w 0,43 chez *Salmonella newport* (84), les a_w 0,75 et 0,58 seraient plus nocives que l' a_w 0,44 chez *Rhizobium meliloti* (42).

Lors de nos expériences, la mise sous vide des échantillons conservés à a_w 0 et 0,22 ne permet pas d'augmenter les taux de survie et ce quelle que soit la vitesse de déshydratation. Ces observations n'impliquent pas que *Rhizobium* est insensible à l'oxygène à des niveaux de déshydratation poussés. En effet, la sensibilité à l'oxygène des microorganismes déshydratés a été démontrée par de nombreux auteurs (60, 84 et 101).

Le niveau de déshydratation où les effets de l'oxygène sont les plus marqués fait aussi l'objet de nombreuses controverses. Les effets léthaux de l'oxygène apparaissent à des a_w inférieures à 0,22 chez *Salmonella newport* (84), inférieures à 0,4 chez *E. coli* (101) et inférieures à 0,5 chez *Serratia marcescens* (101).

En ce qui concerne *Rhizobium* (M2011), nos résultats montrent qu'un début de sensibilité à l'oxygène apparaît à une a_w de 0,43 voire 0,66. En effet, à ces niveaux de déshydratation, nous constatons une amélioration très nette dans les taux de survie consécutive à une mise sous vide (malgré la présence de traces d'oxygène).

Il semblerait que les différences de sensibilité à l'oxygène en l'état déshydraté, suivant les espèces bactériennes, soient en relation avec leurs capacités à retenir l'eau à une a_w donnée ou à la position de ces molécules d'eau dans leurs structures macromoléculaires (101).

Nos résultats montrent qu'il est impossible de soustraire les échantillons bactériens déshydratés à l'action de traces d'oxygène (pendant les phases de conservation et de réhydratation) sans alourdir considérablement nos conditions expérimentales.

Les expériences ultérieures ont donc été menées en présence d'oxygène et il convient de garder à l'esprit que la léthalité observée après conservation à a_w 0 ; 0,22 et 0,43 pourrait être notablement diminuée en l'absence de toute trace d'oxygène.

C. - INFLUENCE DE LA VITESSE DE DESHYDRATATION SUR LA SURVIE DE *RHIZOBIUM* CONSERVE A DIFFERENTES a_w

1 - Etude de la léthalité, observée en conservation, en fonction de la vitesse de déshydratation

La sensibilité à l'oxygène des cellules, plus ou moins déshydratées, de *Rhizobium meliloti* n'empêche pas qu'une déshydratation lente et une conservation effectuées toutes deux à pression atmosphérique se révèlent moins nocives qu'une déshydratation rapide sous vide suivie d'une conservation sous vide. La vitesse de déshydratation semble donc être un paramètre déterminant. Afin de déterminer la vitesse optimale de dessiccation et d'apprécier si l' a_w optimale de conservation n'est pas fonction de la vitesse de dessiccation, nous avons étudié six vitesses de déshydratation. Dans tous les cas l'étape de conservation à différentes a_w s'effectue sous air à pression atmosphérique.

Nous avons constaté antérieurement que la solution sur-saturée de sel impose une vitesse de déshydratation : nous avons mis à profit cette propriété pour obtenir des vitesses de déshydratation différentes.

Trois vitesses, considérées comme rapides (perte en eau supérieure à 20 mg/h), sont réalisées par mise sous vide partiel du dessiccateur pendant la phase de déshydratation.

La première vitesse est caractéristique de l'enceinte où la conservation va s'effectuer (ex. : si l'on conserve l'échantillon à a_w 0, celui-ci sera déshydraté sous vide partiel à une vitesse de 38,2 mg/h ; à l'équilibre l'enceinte est remise sous air).

Les deux autres vitesses sont imposées respectivement par une enceinte mise sous vide où règne une H.R. de 75 % (perte en eau de 32,8 mg/h) et une enceinte à H.R. de 43 % (perte en eau de 70 mg/h). Lorsque l'équilibre est atteint dans ces enceintes les échantillons sont transférés rapidement dans l'enceinte de conservation qui est alors laissée sous air.

Les trois vitesses considérées comme lentes (perte en eau inférieure à 8,75 mg/h) sont obtenues de manière identique mais les enceintes sont laissées à pression atmosphérique pendant la déshydratation et la conservation.

Les vitesses imposées par une enceinte à H.R. de 75 % mise sous vide ou non ont été retenues pour deux raisons :

- à cette H.R., les cellules ne possèderaient plus d'eau congelable (8 , 51 et 102) ;
- les cellules possèdent encore des teneurs en eau supérieures à celles soumises à a_w 0 ; 0,22 ; 0,43 et 0,66. La déshydratation aux vitesses imposées par cette H.R. peut donc être poussée à son maximum, pour les échantillons qui seront répartis en conservation à des H.R. inférieures, sans risque de dépassement. Un tel problème se pose dans le cas d'une conservation à H.R. de 85 % ; dans ce cas la déshydratation dans l'enceinte à H.R. de 75 % est arrêtée, juste avant l'équilibre, à une teneur résiduelle en eau estimée à 2 mg.

Les mêmes remarques s'appliquent aux choix des vitesses imposées par une enceinte à H.R. de 43 %. Dans ce cas, nous étudions l'influence de la vitesse de déshydratation jusqu'à un stade de déshydratation plus poussé. Pour les conservations à H.R. de 66 % et 85 %, la phase de déshydratation à H.R. de 43 % est arrêtée à une teneur

résiduelle de 2 mg. Pour une conservation sous air, à a_w 0,43, nous avons également testé une vitesse de déshydratation imposée par une enceinte à H.R. de 0 % laissée à pression atmosphérique (perte en eau de 8,75 mg/h), avec les précautions précédemment citées.

Nous avons émis les hypothèses de travail suivantes :

- deux échantillons (l'un déshydraté sous vide partiel, l'autre à pression atmosphérique) présentent à l'équilibre, dans une enceinte donnée, des teneurs en eau résiduelles identiques ;
- lorsque cette teneur est atteinte (à deux vitesses différentes) les échantillons placés dans les enceintes de conservation doivent perdre les dernières quantités d'eau à un rythme identique dans les deux cas.

Si le retrait des dernières couches de molécules d'eau est le facteur déterminant, il semble logique d'admettre que quelle que soit la vitesse de la première phase nous devrions obtenir des résultats similaires.

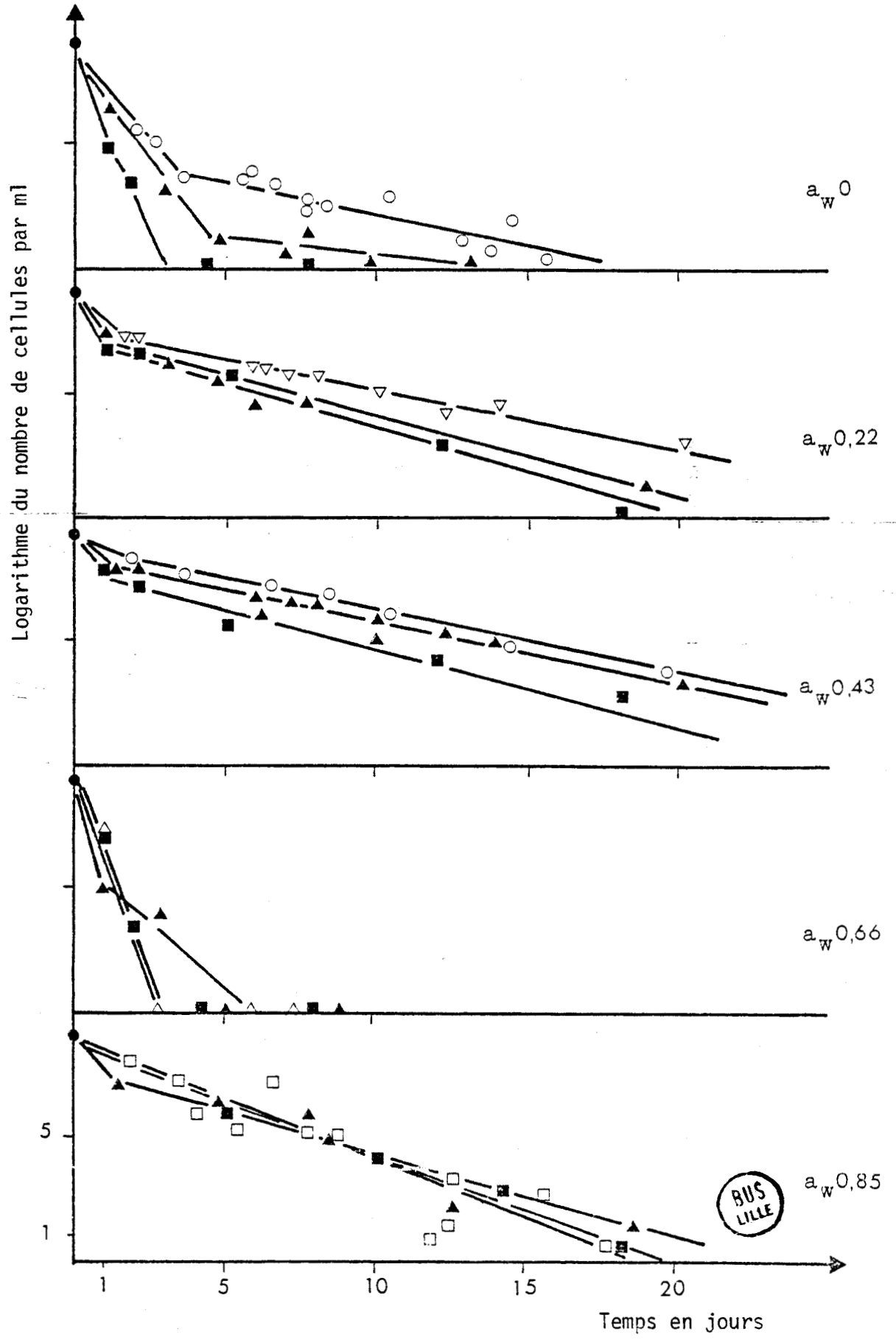
Les résultats obtenus (fig. 6 et 7) ne semblent pas argumenter en ce sens.

En effet, si nous comparons les taux de survie obtenus pour chaque a_w de conservation dans les situations suivantes :

- d'une part : déshydratations lente et rapide (2 mg/h et 32,8 mg/h) imposées jusqu'à une teneur en eau résiduelle caractéristique de l' a_w 0,75 puis déshydratation à vitesse identique jusqu'à la teneur en eau caractéristique de l' a_w de conservation ;
- d'autre part : déshydratations lente et rapide (4,9 mg/h et 70 mg/h) ;

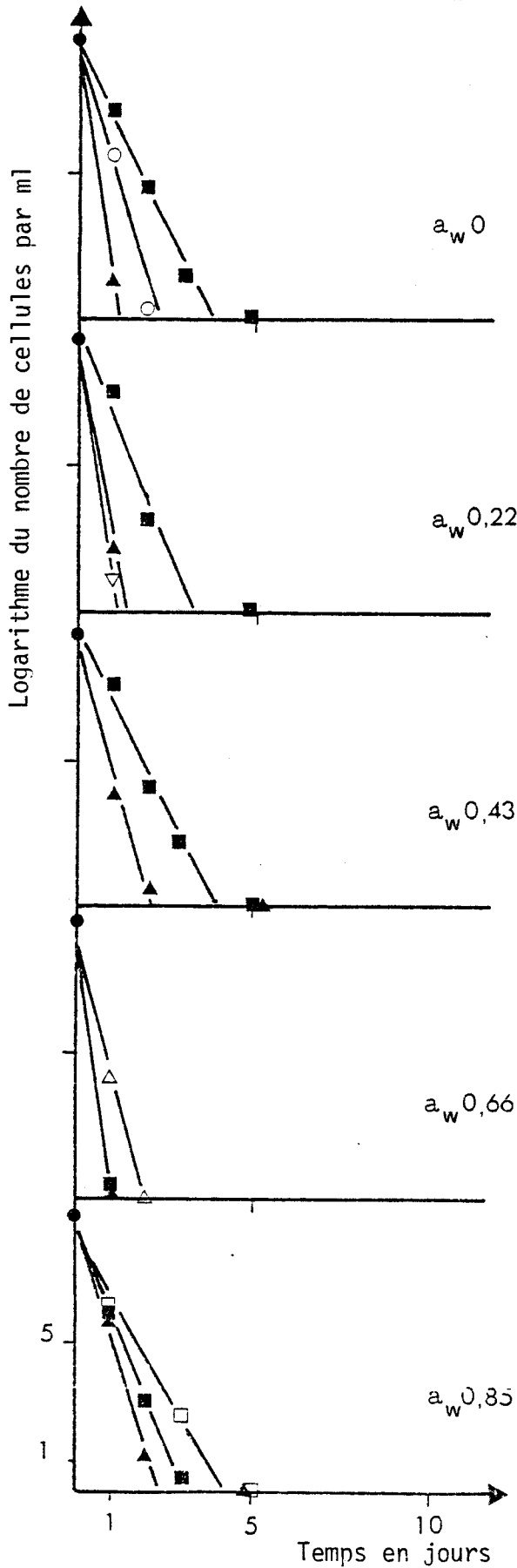
nous constatons que les déshydratations rapides sont toujours beaucoup plus nocives sauf dans le cas d'une conservation à a_w 0 après des vi-

FIGURE 6 - EFFETS DE DESHYDRATATIONS LENTES SUR LA SURVIE DE
 RHIZOBIUM MELILOTI M2011 LORS DE CONSERVATIONS
 SOUS AIR A DIFFERENTES a_w



Les pertes en eau, exprimées en mg/h., sont de 8,75 (○),
 7,60 (▽), 4,90 (▲), 3,10 (△), 2,00 (■) et 1,40 (□).

FIGURE 7 - EFFETS DE DESHYDRATATIONS RAPIDES SUR LA SURVIE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w



Les pertes en eau, exprimées en mg/h., sont de 120 (∇), 70 (\blacktriangle), 42,40 (\triangle), 38,20 (\circ), 32,80 (\blacksquare) et 20,40 (\square).



tesses de déshydratation imposées par une enceinte à H.R. de 75 %. Compte-tenu des teneurs résiduelles en eau atteintes dans de telles conditions, il semblerait que la majorité des dommages soit réalisée lors de la perte rapide de l'eau libre ou très faiblement liée. Il n'est cependant pas exclu qu'une accélération ou un ralentissement dans le retrait de l'eau liée puisse influencer notablement sur les taux de survie observés en conservation.

Pour les déshydratations rapides, à chaque diminution de la vitesse de déshydratation correspond une augmentation des taux de survie observés après conservation. Cependant, la conservation de *Rhizobium meliloti* 2011 après déshydratation rapide, quelle que soit l' a_w de conservation, est très mauvaise. On constate une disparition totale de la viabilité après 4 à 5 j. (fig. 7).

La conservation après déshydratation lente nous donne de bien meilleurs taux de survie. Cependant, une diminution de ces vitesses ne permet pas d'obtenir d'amélioration ; ce phénomène est d'autant plus net que l' a_w de conservation est faible (fig. 6). Les réponses observées présentent un aspect biphasique très marqué tendant à disparaître au fur et à mesure que l' a_w de conservation s'élève.

Quelle que soit la vitesse de déshydratation, la conservation sous air à une a_w 0,66 reste très nocive pour la survie de *Rhizobium*.

De manière générale, des dommages sévères sont observés après des déshydratations rapides chez des Angiospermes (49) et des Bryophytes (83a)

De même, chez un certain nombre d'espèces bactériennes, une dessiccation rapide, jusqu'à une a_w de 0,31, provoque des taux de survie en conservation nettement inférieurs à ceux observés dans les mêmes conditions de conservation mais après déshydratation lente (5).

Nos résultats semblent conformes à ceux de ces travaux et permettent d'étendre ces notions à *Rhizobium* M2011 quel que soit le niveau de déshydratation atteint (de 0,85 à 0). La nocivité des déshydratations rapides résulterait du retrait rapide de l'eau libre.

Quelle que soit la vitesse de déshydratation l' a_w optimale de conservation sous air serait de 0,43.

L'aspect biphasique des réponses observées après déshydratation lente suivie de conservations à des a_w 0,43 ; 0,22 et 0 pourrait être interprété par la formation d'une couche de cellules mortes créant un environnement protecteur ou ralentissant le retrait de l'eau (41, 98). Ce mécanisme serait totalement inefficace dans les conditions de déshydratations rapides et drastiques et inopérant dans le cadre des conservations à a_w 0,66 et 0,85. Cet aspect biphasique pourrait également s'interpréter par un retrait très lent de l'eau liée dans les conditions de déshydratations lentes. Le véritable temps d'équilibre serait alors augmenté de 4 jours pour l' a_w 0 et d'un jour pour les a_w 0,22 et 0,43, la première phase correspondant à la mortalité de *Rhizobium* au cours de la dessiccation. Ce genre bactérien serait alors particulièrement sensible à la dessiccation. Nous ne pouvons éliminer à priori cette possibilité ; cependant, un certain nombre d'auteurs, travaillant dans des conditions similaires, ne signalent pas de phénomène analogue (5, 51, 54, 97 et 98).

2 - Détermination de l'étape de perte en eau où apparaissent les dommages subis après déshydratation rapide

a) Estimation des taux de survie, observés en conservation, après déshydratation rapide, réhydratation et déshydratation lente

Pour chaque a_w de conservation, nous avons réalisé trois types d'expériences :

- une déshydratation rapide est menée sous vide partiel jusqu'à son terme et la conservation s'effectue sous air (courbe témoin) ;
- le même type de déshydratation est réalisé mais, cette fois, l'échantillon est réhydraté (jusque 70 mg H₂O) puis déshydraté à nouveau de manière lente. La conservation s'effectue sous air ;
- une déshydratation lente sous air et conservation sous air nous servent de courbe-témoin complémentaire.

Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans la figure 8. Ils montrent que les dommages subis lors d'une déshydratation rapide sont réversibles après simple réhydratation, mais pas d'une façon totale.

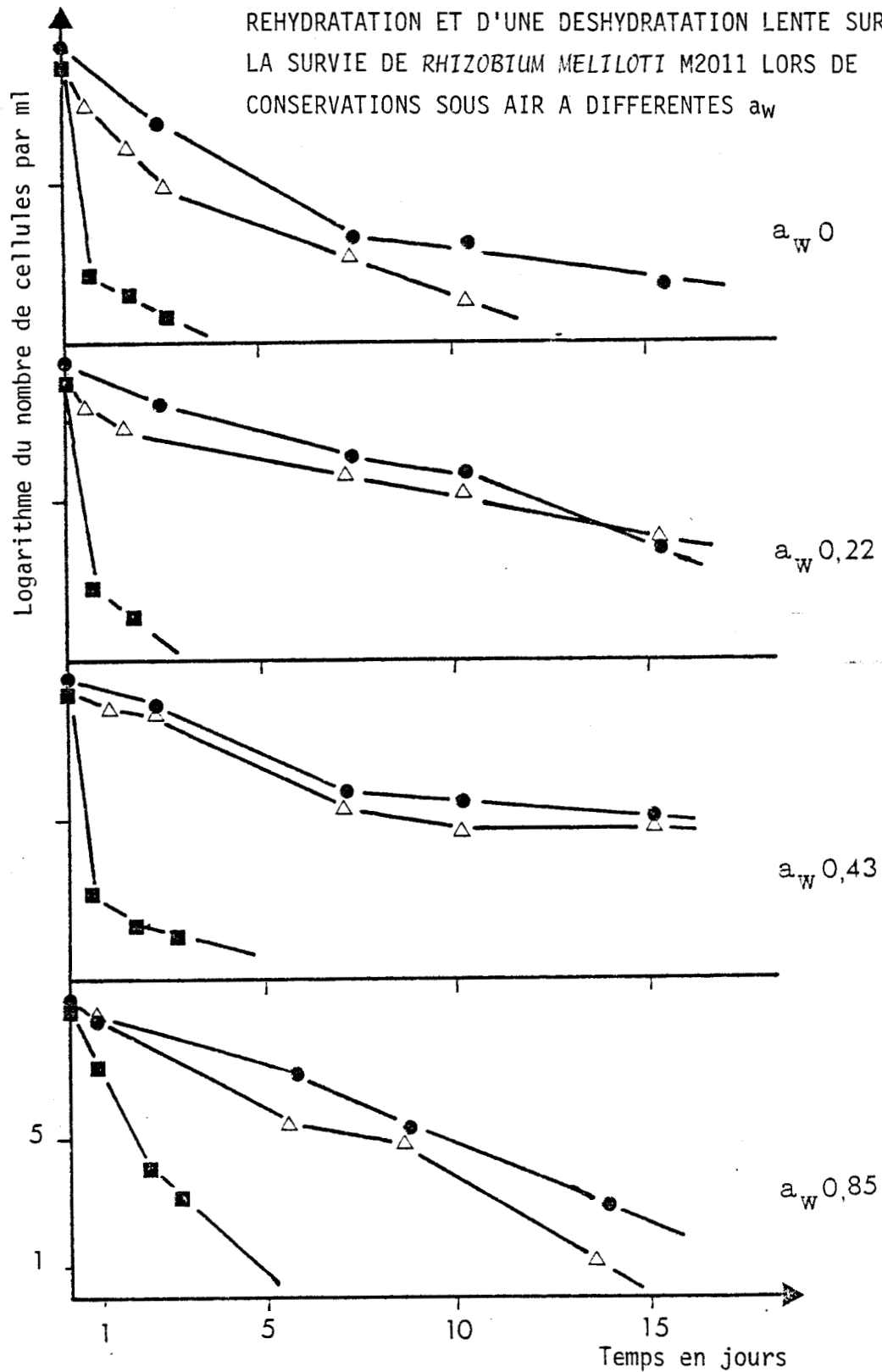
De tels résultats ont déjà été démontrés pour d'autres espèces bactériennes (5).

b) Estimation des taux de survie, observés en conservation, après déshydratation rapide jusqu'à une teneur en eau de 5 mg et déshydratation lente, jusqu'à la teneur caractéristique de l' a_w

Trois types d'essais ont également été réalisés lors de ces expériences :

- une déshydratation rapide est conduite sous vide jusqu'à une teneur en eau de l'ordre de 5 mg, l'enceinte est alors remise sous air et les derniers 5 mg sont alors éliminés à la vitesse caractéristique des déshydratations lentes ;
- le même type de déshydratation rapide et incomplète (jusque 5 mg H₂O) suivie d'une réhydratation (70 mg H₂O) puis d'une déshydratation lente est également réalisé ;
- une déshydratation lente nous sert d'essai témoin.

FIGURE 8 - EFFETS D'UNE DESHYDRATATION RAPIDE SUIVIE D'UNE REHYDRATATION ET D'UNE DESHYDRATATION LENTE SUR LA SURVIE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w



- déshydratation lente et conservation sous air
- △ déshydratation rapide, réhydratation et déshydratation lente puis conservation sous air
- déshydratation rapide et conservation sous air



Les taux de survie sont appréciés après conservation sous air.

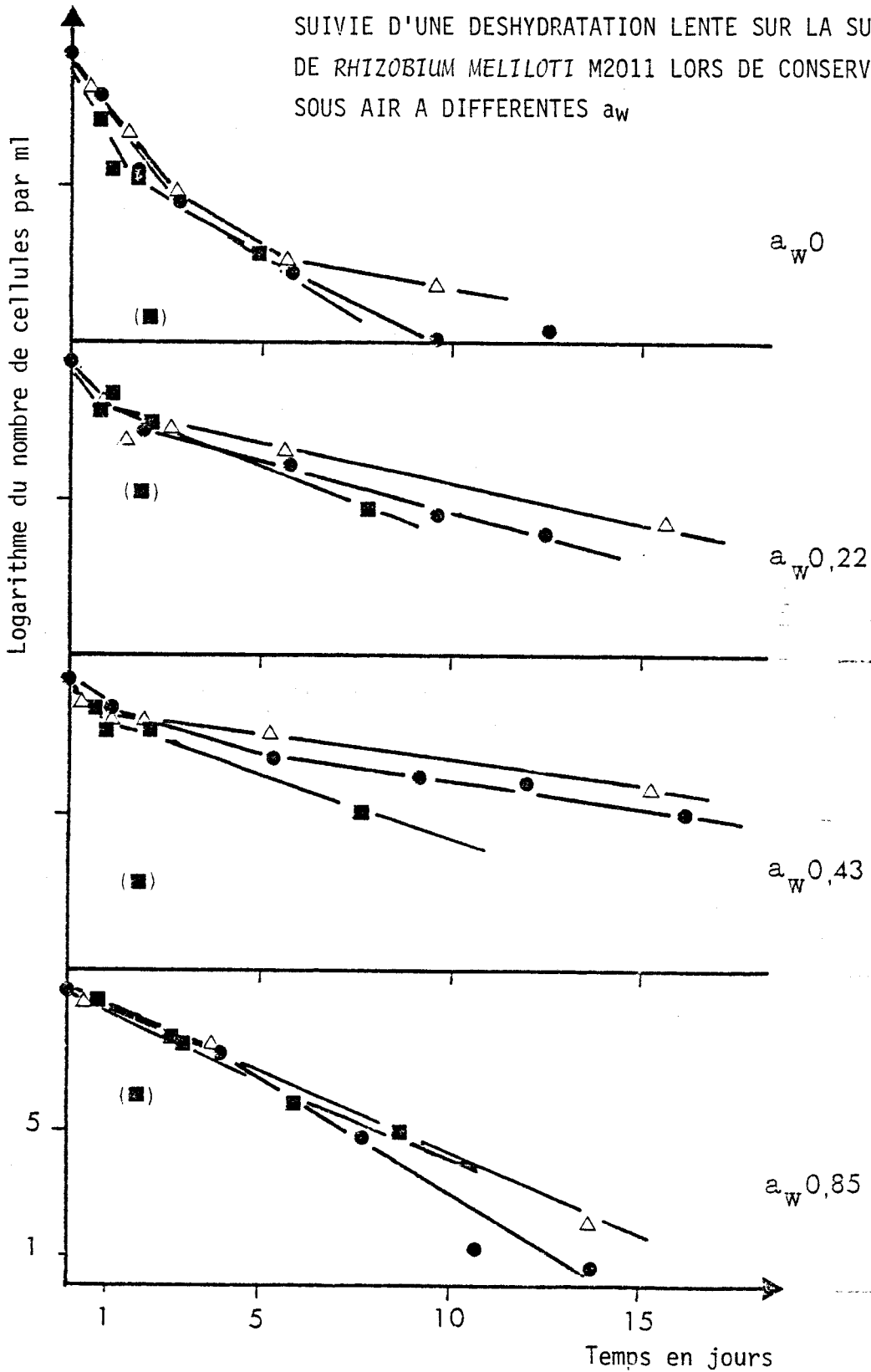
Au cours de la phase de conservation les cellules, déshydratées rapidement jusqu'à une teneur de 5 mg H₂O puis lentement jusqu'à leur teneur d'équilibre, montrent des taux de survie pratiquement identiques à ceux observés en conservation pour les cellules déshydratées lentement (fig. 9). Cependant, pour un certain nombre d'échantillons, cette constatation ne se vérifie pas. Il est probable que ces points (indiqués entre parenthèses) correspondent à des échantillons déshydratés rapidement jusqu'à une teneur nettement inférieure à 5 mg H₂O proche de la teneur en eau à l'équilibre.

Les échantillons déshydratés rapidement jusque 5 mg H₂O, réhydratés puis soumis à une déshydratation lente, sembleraient montrer de meilleurs taux de survie en conservation que les cellules déshydratées lentement. Le nombre trop restreint d'échantillons ne nous permet pas de tirer des conclusions certaines.

ANTHEUNISSE et coll. (5) démontrent que lorsqu'une déshydratation rapide est menée jusqu'à une teneur de 8 mg H₂O (pour 10⁸ cellules d'*E. coli*), le fait de poursuivre la déshydratation (jusqu'à 0,6 mg) de manière lente ne permet plus d'obtenir des taux de survie acceptables. Ces auteurs interprètent la nocivité des déshydratations rapides par un changement brutal de la capsule en-dessous des teneurs en eau de 8 mg H₂O pour 10⁸ cellules. Lors des déshydratations lentes, la capsule serait moins endommagée ce qui permettrait aux cellules de conserver leur teneur en eau intracellulaire plus longtemps. La capsule endommagée serait réparée par une simple réhydratation.

Nos résultats peuvent s'expliquer de la même manière. Les dommages causés à la gangue polysaccharidique ou pseudo-capsule de *Rhizobium*, par une déshydratation rapide, seraient acquis entre la teneur en eau de 5 mg et celle correspondant à l'*a_w* 0,85. Ces dommages seraient également réversibles par simple réhydratation, sans subculture dans un milieu riche. Ces observations pourraient expliquer l'aspect biphasique

FIGURE 9 - EFFETS D'UNE DESHYDRATATION RAPIDE INCOMPLETE SUIVIE D'UNE DESHYDRATATION LENTE SUR LA SURVIE DE RHIZOBIUM MELILOTI M2011 LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w



- déshydratation lente et conservation sous air
- △ déshydratation rapide incomplète (teneur résiduelle en eau \approx 5 mg) suivie d'une déshydratation lente et conservation sous air
- déshydratation rapide et conservation sous air



observé suite à une déshydratation lente, les cellules retenant plus longtemps leur eau intracellulaire.

Un certain nombre d'expériences complémentaires nous permettrait de mieux préciser ces résultats :

- influence de la concentration cellulaire initiale ;
- accélération très nette de la vitesse de déshydratation dans les dernières phases (teneurs inférieures à 10 mg H₂O) de la déshydratation lente ;
- appréciation de la sensibilité au lysozyme après déshydratation lente ou rapide suivant la méthode décrite par HAMBLETON (47) ;
- étude en microscopie électronique.

D. - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES SUR LA TOLERANCE A LA CONSERVATION A DIFFERENTES a_w

Les cellules, prélevées à différents stades de la croissance, sont centrifugées et lavées deux fois. La concentration cellulaire est standardisée à $2 \cdot 10^9$ cellules/ml.

Deux séries d'expériences ont été réalisées pour étudier l'influence de ce paramètre :

- une série avec un support de déshydratation constitué de membranes Millipore (47 mm de diamètre et 0,45 μ m de porosité) et conservation sous vide ;
- une série avec des membranes Sartorius et conservation sous air.

Les résultats portés en figures 10 et 11 montrent quelques variations dans les taux de survie suivant le support de déshydratation utilisé.

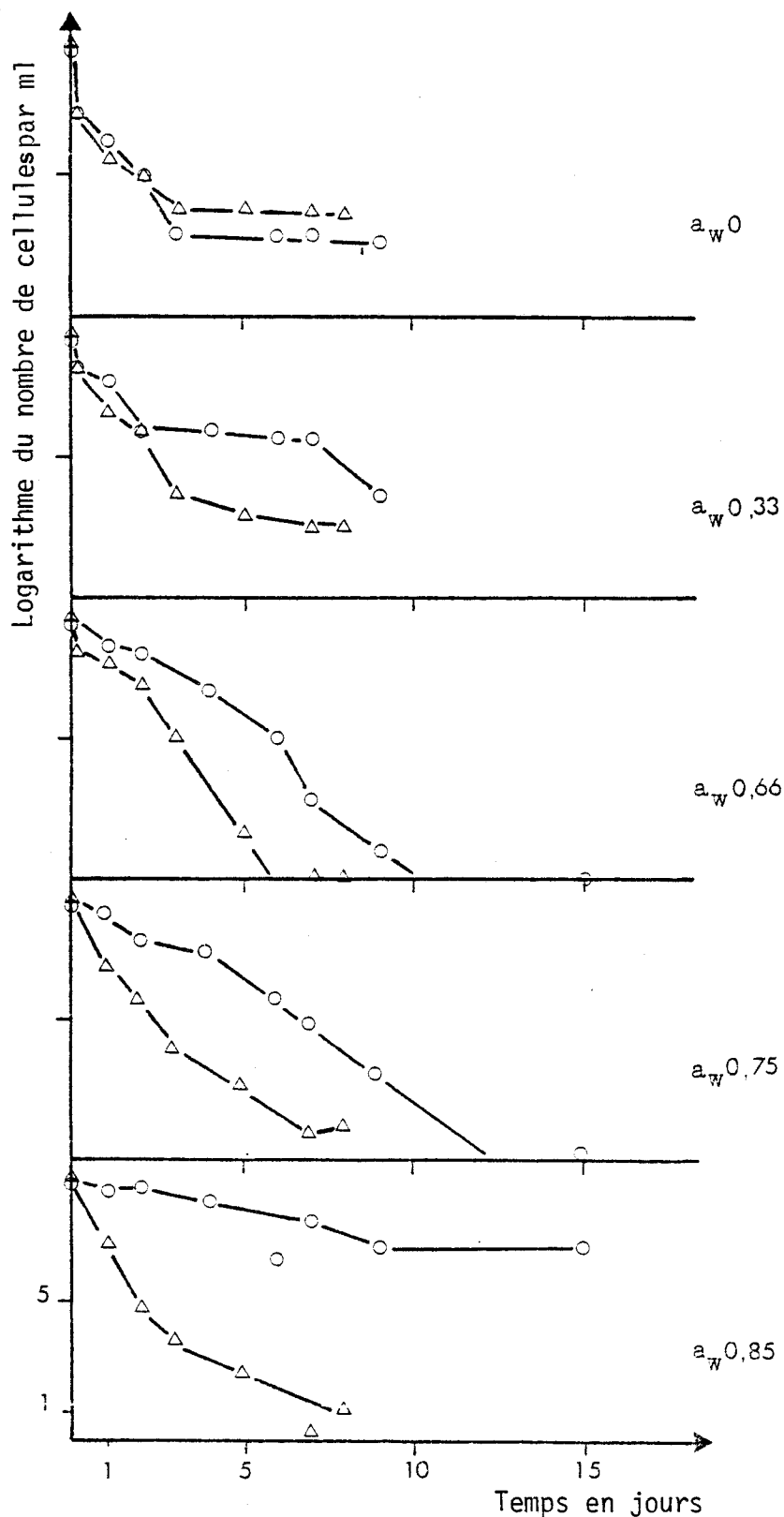
Cependant, les cellules prélevées en phase stationnaire de culture (48 h) tolèrent beaucoup mieux les conservations en l'état déshydraté.

Les cellules prélevées en début, milieu et fin de phase exponentielle (12 à 24 h de culture) présentent une tolérance homogène, mais moindre que les cellules prélevées en phase stationnaire, à des conservations sous a_w inférieures à 0,66. Les cellules prélevées en début et milieu de phase exponentielle seraient particulièrement sensibles à des conservations sous des a_w supérieures à 0,66.

Il nous est difficile d'affirmer que la tolérance des cellules prélevées en fin de phase stationnaire est due à la taille ou à la composition de leur pseudo-capsule. Cependant, l'observation de cette tolérance est en accord avec un bon nombre de travaux publiés (1, 5, 6, 31, 38, 76 et 79).

Dans nos conditions expérimentales (culture en milieu R.C. mannitolé), les cellules prélevées en phase stationnaire ont synthétisé des quantités importantes de polysaccharides extracellulaires. Soumises à la dessiccation et à la conservation à différents degrés de déshydratation, en l'absence du polymère qu'elles ont synthétisé, elles se révèlent plus tolérantes que les cellules jeunes n'ayant pas ou peu synthétisé de polysaccharide. Nos travaux ne permettent pas de vérifier l'hypothèse de OSA-AFIANA et ALEXANDER (75) qui démontrent que les polysaccharides extracellulaires de *Rhizobium* sont synthétisés aux dépens de réserves intracellulaires qui font défaut pendant le stress de déshydratation.

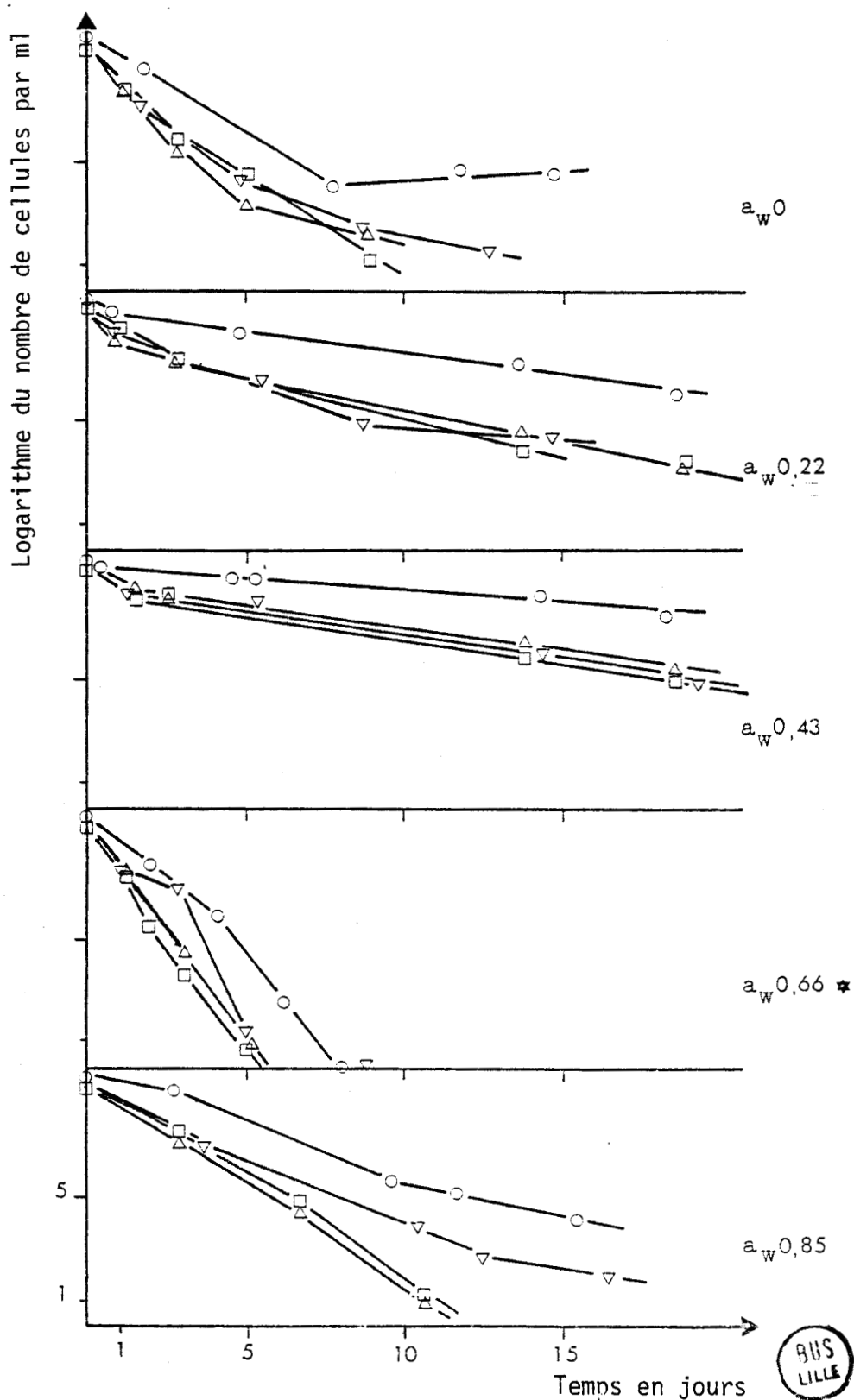
FIGURE 10 - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DE *RHIZOBIUM MELILOTTI* M2011 SUR LA SURVIE LORS DE CONSERVATIONS SOUS VIDE A DIFFERENTES a_w



- △ cellules prélevées en milieu de phase exponentielle (D.O. : 0,6)
- cellules prélevées en phase stationnaire (D.O. : 2,8)

Les membranes Millipore sont utilisées comme support de déshydratation et de conservation.

FIGURE 11 - INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M2011 SUR LA SURVIE LORS DE CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w 78



□ cellules prélevées en début de phase exponentielle (D.O. : 0,35)

△ cellules prélevées en milieu de phase exponentielle (D.O. : 0,78)

▽ cellules prélevées en fin de phase exponentielle (D.O. : 1,30)

○ cellules prélevées en phase stationnaire (D.O. : 3,10)

* La déshydratation et la conservation à a_w 0,66 s'effectuent sous vide

Les très mauvais taux de survie observés lors de la conservation, à des a_w supérieures à 0,66, des cellules prélevées en début et milieu de phase exponentielle pourraient s'expliquer par la richesse du contenu enzymatique de ces cellules. Un certain nombre d'auteurs (26, 54 et 98) constatent qu'une exposition des cellules bactériennes à des a_w faibles (inférieures à 0,3) ne permet pas un bon fonctionnement enzymatique mais ne provoque pas non plus une réduction totale de leurs activités ; il en résulterait un "mauvais fonctionnement enzymatique". Les cellules jeunes pourraient être apparemment confrontées à une telle situation aux a_w supérieures à 0,66.

E. - INFLUENCE DE LA PRESENCE DE POLYSACCHARIDES SUR LA SURVIE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* CONSERVE A DIFFERENTES a_w

Ces expériences ont été réalisées en même temps que les expériences de la figure 11, avec des cultures de D.O. 1,3 et 3,1.

Les courbes témoins de la figure 11 sont reportées afin de permettre la comparaison. Rappelons qu'elles correspondent à des cellules débarrassées de toutes traces de milieu de culture et de la majorité des exopolysaccharides par centrifugations et lavages successifs.

Les mêmes cultures ont été filtrées directement sans lavage (avec leurs quantités respectives de polysaccharides) sur une membrane Sartorius de porosité 0,2 μ m. Cette porosité de filtre retient les bactéries avec leurs pseudo-capsules et leurs exopolysaccharides (comm. pers. de M. COURTOIS).

Les résultats reportés sur la figure 12 permettent de préciser un certain nombre de points :

- Les polysaccharides, produits par une culture de D.O. 1,3, protègent très nettement les cellules conservées à des a_w de 0 et 0,43, sont pratiquement sans effet sur la conservation à a_w 0,66 et se révèlent nocifs pour la conservation à a_w 0,85.

- Les polysaccharides, produits par une culture de D.O. 3,1, protègent les cellules conservées à a_w 0 et se révèlent nocifs pour toutes les autres a_w de conservations essayées.

En l'absence de dosages des polysaccharides formés et d'études des isothermes de désorption en présence et absence du polysaccharide, nous en sommes réduit à émettre un certain nombre d'hypothèses.

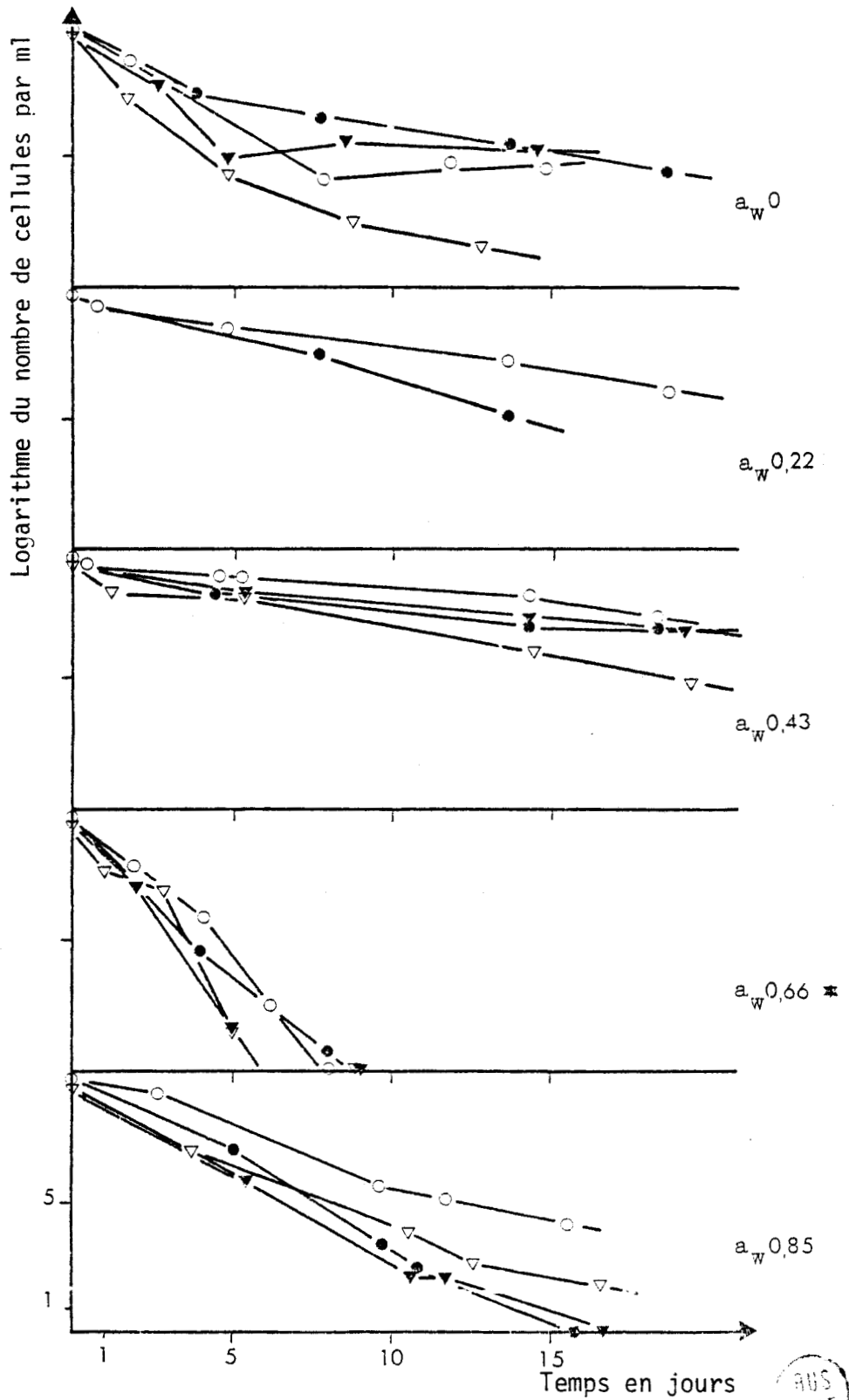
- Les polysaccharides protègeraient les cellules à l'état déshydraté (0 ; 0,22 et 0,43) de l'action de l'oxygène. Outre que cette hypothèse n'ait jamais été relevée dans la bibliographie, elle cadre mal avec l'observation d'une baisse très forte de la tolérance à des conservations à a_w 0,22 et 0,43 en présence de quantités importantes de polysaccharides (D.O. 3,1).

- CADMUS et coll. (27) démontrent que la composition chimique des exopolysaccharides de *R. meliloti* change en fonction de l'âge de la culture en milieu synthétique. Ce changement se produit-il en milieu R.C. mannitolé ? et peut-il avoir une quelconque influence sur le degré de protection ?

- Le polysaccharide, composé hygroscopique, permettrait une réhydratation ménagée (56 et 104). Cette hypothèse pourrait expliquer les résultats obtenus pour une conservation à a_w 0.

- Le polysaccharide plus avide d'eau que la bactérie déshydraterait un peu plus cette dernière. Un mécanisme similaire a été décrit par BUSHBY et MARSHALL (26) en ce qui concerne l'argile. Dans les

FIGURE 12 - INFLUENCE DE LA PRESENCE D'EXOPOLYSACCHARIDES SUR LA SURVIE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M2011 APRES CONSERVATIONS SOUS AIR A DIFFERENTES a_w



- ▽ cellules sans exopolysaccharide (D.O. : 1,3)
- ▼ cellules avec exopolysaccharides (D.O. : 1,3)
- cellules sans exopolysaccharide (D.O. : 3,1)
- cellules avec exopolysaccharides (D.O. : 3,1)

* La déshydratation et la conservation à a_w 0,66 s'effectuent sous vide



travaux de ces auteurs, les polysaccharides n'auraient pas un tel rôle (cf. p. 13), cependant il n'est pas précisé si les isothermes d'adsorption sont obtenus avec ou sans polysaccharide. Ces constatations impliquent que dans nos travaux, le silica gel activé ne détermine pas une a_w de 0. Une telle hypothèse n'est pas à écarter d'emblée : en effet, SCHONBECK et BEWLEY (83a) remarquent que le silica gel laisse une H.R. de 1 %, soit une a_w de 0,01. Signalons cependant que HIEDA (51) utilise couramment le silica gel pour ses expériences à H.R. de 0 %. En présence de polysaccharide, il y aurait donc un "décalage" dans les valeurs d' a_w de conservation citées, et ce décalage peut très bien être supérieur à 0,01 unité d' a_w .

En tout état de cause, une étude des isothermes de désorption dans de telles conditions, une expérience portant sur les taux de survie à des a_w intermédiaires à celles précédemment citées et une appréciation de l'influence des conditions de réhydratation pourraient permettre de mieux cerner le problème.

F. - MUTATIONS OBSERVEES, APRES DESHYDRATATION ET CONSERVATION A L'ETAT DESHYDRATE, CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*

De nombreux auteurs (9 , 51, 99 et 102) affirment que tous les processus faisant intervenir une dessiccation partielle ou totale provoquent l'apparition de mutants au sein de la population bactérienne.

La souche de *Rhizobium meliloti* 2011, sensible à la streptomycine et portant un prophage (15), a été retenue pour détecter d'éventuelles mutations ; celles-ci ont été étudiées par :

- une augmentation de la fréquence de mutants résistants à 400 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine ;
- induction du prophage mise en évidence par la lyse de la souche indicatrice L5.30.

Quelques essais ont également été effectués sur la souche de *Rhizobium meliloti* M5N1m3 (triple auxotrophe : Arginine⁻, Tryptophane⁻ et Isoleucine - Valine⁻). D'éventuelles mutations sont alors détectées par augmentation des fréquences de réversion de ces caractères.

Des membranes Millipore nous ont servi de support de dessiccation et de conservation. Les déshydratations et les conservations sont effectuées sous vide partiel.

1 - Influence de l'âge physiologique sur l'apparition de mutants M2011, résistants à la streptomycine, juste après déshydratation

Deux cultures, l'une en début de phase exponentielle, l'autre en fin de phase exponentielle sont soumises à différents niveaux de déshydratation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 10.

Il semblerait que les cellules prélevées en début de phase exponentielle seraient plus sensibles (mortalité et fréquences de mutations relativement élevées).

Les augmentations des fréquences de mutations, bien que très faibles, apparaissent dans une zone d' a_w comprise entre 0,33 et 0,66. La mortalité y est relativement élevée sans l'être trop.

2 - Influence d'une conservation, à 30°C sous différentes a_w , sur l'apparition de mutants M2011 streptomycine résistants

Une culture de densité optique 0,7 a été soumise à des conservations sous a_w de 1 ; 0,66 ; 0,33 et 0.

TABLEAU 10 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET FREQUENCE DE MUTANTS Str^R
CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI* 2011, A DEUX AGES PHYSIOLOGIQUES,
SOU MIS A DIFFERENTS NIVEAUX DE DESHYDRATATION

a _w	D.O. culture : 1,8		D.O. culture : 0,3	
	Nombre de bactéries après déshydratation	Fréquence de mutants 2011 Str ^R	Nombre de bactéries après déshydratation	Fréquence de mutants 2011 Str ^R
0	1,79.10 ⁹	3,80.10 ⁻⁸	1,88.10 ⁹	6,75.10 ⁻⁸
0,11	2,10.10 ⁷	3,00.10 ⁻⁸	5,64.10 ⁶	5,10.10 ⁻⁸
0,22	1,91.10 ⁹	4,60.10 ⁻⁸	4,64.10 ⁶	4,26.10 ⁻⁸
0,33	1,85.10 ⁹	3,18.10 ⁻⁸	1,58.10 ⁹	1,25.10 ⁻⁷
0,43	2,08.10 ⁹	3,41.10 ⁻⁸	1,82.10 ⁸	1,50.10 ⁻⁷
0,57	2,19.10 ⁹	5,07.10 ⁻⁸	6,34.10 ⁸	1,04.10 ⁻⁷
0,66	1,54.10 ⁹	3,05.10 ⁻⁸	6,16.10 ⁸	1,58.10 ⁻⁷
0,75	1,79.10 ⁹	2,34.10 ⁻⁸	2,38.10 ⁹	7,37.10 ⁻⁸
0,85	2,35.10 ⁹	3,23.10 ⁻⁸	2,30.10 ⁹	1,33.10 ⁻⁸
0,95	2,30.10 ⁹	3,90.10 ⁻⁸	2,14.10 ⁹	9,56.10 ⁻⁸

Au temps t₀ le nombre de bactéries et la fréquence de mutants spontanés sont de 5,78.10⁹ b./ml et 3,76.10⁻⁸ pour la culture de D.O. : 1,8 et 2,38.10⁹ b./ml et 5,68.10⁻⁸ pour la D.O. : 0,3.



En cette occasion, nous avons essayé de mettre en évidence l'induction du prophage de la souche M2011, test qui aurait pu mettre en évidence des dégradations de l'ADN bactérien.

Les résultats sont portés dans le tableau 11.

TABLEAU 11 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET FREQUENCE DE MUTANTS Str^R INDIQUEE ENTRE PARENTHESE, CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI* 2011 APRES DES TEMPS DE CONSERVATION SOUS DIFFERENTES a_w

Temps de conservation (en heures)	a_w de conservation			
	1	0,66	0,33	0
0	-	$2,53 \cdot 10^9$ ($1,42 \cdot 10^{-7}$)	$2,20 \cdot 10^9$ ($1,59 \cdot 10^{-7}$)	$1,60 \cdot 10^9$ ($1,36 \cdot 10^{-7}$)
5	$1,98 \cdot 10^9$ ($1,31 \cdot 10^{-7}$)	$9,90 \cdot 10^8$ ($1,51 \cdot 10^{-7}$)	$5,30 \cdot 10^8$ ($1,97 \cdot 10^{-7}$)	$1,44 \cdot 10^8$ ($1,35 \cdot 10^{-7}$)
24	$1,65 \cdot 10^9$ ($1,42 \cdot 10^{-7}$)	$1,67 \cdot 10^7$ ($1,40 \cdot 10^{-7}$)	$4,40 \cdot 10^7$ ($1,94 \cdot 10^{-7}$)	$2,06 \cdot 10^7$ ($3,42 \cdot 10^{-7}$)

Au temps t_0 le nombre de bactéries était de $2,65 \cdot 10^9$ b./ml et la fréquence de mutants spontanés Str^R de $9,95 \cdot 10^{-8}$.

Dans les limites de temps étudiés, il ne semble pas y avoir une augmentation significative des fréquences de mutations pour des durées croissantes de conservation.

Ces fréquences restent toujours faibles et à la limite peu significatives en regard du témoin a_w 1.

L'induction du prophage s'est révélée négative.

Notons cependant que des essais, réalisés au sein de notre laboratoire par NIEL (73), sur l'augmentation des fréquences de mutation

Str^R par action de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (N.T.G.) se sont également relevés peu encourageants.

Nous nous sommes donc intéressé à l'augmentation des taux de réversions de caractères auxotrophiques.

3 - Influence d'une conservation à 30°C sous différentes a_w sur l'apparition de révertants chez la souche M5N1m3

Une culture de D.O. : 0,7 a été soumise à des conservations sous des a_w de 1 ; 0,66 et 0. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 12.

Les taux de réversion les plus élevés sont obtenus juste après la déshydratation. Dans la majorité des cas, une augmentation de la durée de conservation ne semble pas amplifier ces taux.

4 - Conclusion

Il nous est difficile, au vue de ces résultats, d'affirmer que dans nos conditions expérimentales la dessiccation et la conservation en l'état déshydraté puissent se révéler mutagènes. Il semblerait cependant que juste après la dessiccation une légère augmentation des fréquences de mutation se produise pour des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance.

Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en tenant compte de l'influence des différents paramètres étudiés précédemment.

TABLEAU 12 - NOMBRE DE BACTERIES SURVIVANTES ET TAUX DE REVERSIONS POUR LES CARACTERES ARGININE, TRYPTOPHANE ET ISOLEUCINE-VALINE, CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI M5N1m3 APRES DES TEMPS DE CONSERVATION SOUS DIFFERENTES a_w

a_w	Durée de conservation en heures	Nombre de bactéries/ml après traitement	Taux de reversion après subculture
Conservation à a_w 1	4	$1,33 \cdot 10^9$	A < $4,09 \cdot 10^{-10}$ T $4,09 \cdot 10^{-10}$ I < $4,09 \cdot 10^{-10}$
	24	$1,18 \cdot 10^9$	A < $5,78 \cdot 10^{-10}$ T $5,20 \cdot 10^{-9}$ I < $5,78 \cdot 10^{-10}$
	48	$8,95 \cdot 10^8$	A $1,70 \cdot 10^{-9}$ T < $4,25 \cdot 10^{-10}$ I < $4,25 \cdot 10^{-10}$
	72	$9,90 \cdot 10^8$	A < $5,68 \cdot 10^{-10}$ T < $5,68 \cdot 10^{-10}$ I < $5,68 \cdot 10^{-10}$
Conservation à a_w 0,66	0	$3,60 \cdot 10^8$	A $6,70 \cdot 10^{-8}$ T < $4,70 \cdot 10^{-10}$ I $1,30 \cdot 10^{-7}$
	24	$1,15 \cdot 10^6$	A < $4,69 \cdot 10^{-10}$ T < $4,69 \cdot 10^{-10}$ I < $4,69 \cdot 10^{-10}$
	48	$2,90 \cdot 10^2$	A $4,95 \cdot 10^{-10}$ T < $4,95 \cdot 10^{-10}$ I $1,48 \cdot 10^{-9}$
	72	80	A < $4,75 \cdot 10^{-10}$ T < $4,75 \cdot 10^{-10}$ I $4,75 \cdot 10^{-10}$
Conservation à a_w 0	0	$4,60 \cdot 10^7$	A $5,10 \cdot 10^{-10}$ T $2,29 \cdot 10^{-8}$ I $1,07 \cdot 10^{-8}$
	24	$1,18 \cdot 10^6$	A < $3,84 \cdot 10^{-10}$ T < $3,84 \cdot 10^{-10}$ I < $3,84 \cdot 10^{-10}$
	48	$6 \cdot 10^4$	A $1,71 \cdot 10^{-10}$ T < $5,70 \cdot 10^{-10}$ I < $5,70 \cdot 10^{-10}$
	72	$5,80 \cdot 10^4$	A < $5,18 \cdot 10^{-10}$ T < $5,18 \cdot 10^{-10}$ I $1,55 \cdot 10^{-9}$

Au temps t_0 le nombre de bactéries était de $1,8 \cdot 10^9$ b./ml et les taux de reversions des caractères A : $1,88 \cdot 10^{-10}$; T : $5,52 \cdot 10^{-10}$ et I : $< 1,88 \cdot 10^{-10}$.



G. - CONCLUSION

Nous avons étudié l'influence de quelques paramètres sur la survie de *Rhizobium meliloti* 2011, conservé à différents niveaux de déshydratation, exprimés en terme d' a_w .

Rhizobium meliloti 2011 serait sensible aux effets de l'oxygène dès le niveau de déshydratation correspondant à l' a_w 0,43 (voire 0,66). Cette limite correspond relativement bien aux niveaux de déshydratation où s'exerce l'action létale de l'oxygène, cités par différents auteurs (84 et 101).

La survie des cellules en conservation, quel que soit le niveau de déshydratation atteint, dépend avant tout de la vitesse de dessiccation. Les déshydratations rapides se révèlent à cet égard particulièrement nocives. Les dommages causés par une déshydratation rapide sont partiellement réversibles et sont engendrés entre une teneur de 5 mg d'eau et la teneur en eau correspondant à une a_w de l'ordre de 0,85. La cible principale de ces dommages pourrait être la gangue polysaccharidique de *Rhizobium*. Lors d'une déshydratation lente, la structure de cette pseudo-capsule serait mieux préservée et la cellule serait capable de mieux retenir son eau intracellulaire. Cette hypothèse pourrait éventuellement expliquer l'aspect biphasique des réponses obtenues lors de la conservation. Nous ne pouvons pas non plus écarter la possibilité de formation d'une couche de cellules mortes protectrices. Ces différentes hypothèses ont été largement développées pour d'autres microorganismes (5, 41 et 98).

Dans les conditions de déshydratation lente et de conservation en présence d'air, l' a_w optimale de conservation serait de 0,43. Cette a_w correspond tout à fait à l' a_w déterminée par d'autres auteurs pour *Salmonella newport* (84) et *Rhizobium meliloti* (42). Cependant, la sensibilité à l'oxygène de *Rhizobium meliloti* dès l' a_w 0,43 laisse entrevoir la possibilité de conserver très correctement ces cellules à des a_w nettement inférieures en l'absence de toute trace d'oxygène.

Il est généralement admis par de nombreux auteurs (1, 5 , 6 , 31, 38, 76 et 79) que des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance supportent beaucoup mieux les stress de déshydratation et de conservation à l'état déshydraté. Nos résultats semblent confirmer cette tolérance des cellules prélevées en phase stationnaire pour tous les niveaux de déshydratation. Des cellules prélevées en début, milieu et fin de phase exponentielle présentent une tolérance moindre. Par contre, les cellules jeunes seraient particulièrement sensibles à des niveaux de déshydratation de 0,66 et 0,85.

L'action protectrice des exopolysaccharides de *Rhizobium* M2011 semblerait s'effectuer davantage sur des cellules préservées à a_w 0. Pour les autres niveaux de déshydratation l'action dépendrait de la quantité. Ces polysaccharides auraient des effets défavorables lors de conservations à a_w égales ou supérieures à 0,66.

Lors de nos essais, la déshydratation ne s'est guère révélée particulièrement mutagène.

Nos résultats semblent démontrer, qu'en l'absence d'agents protecteurs et de protection contre l'oxygène, *Rhizobium* se révèle un genre bactérien particulièrement sensible à la déshydratation. Un certain nombre d'auteurs, travaillant sur *Rhizobium*, aboutissent à des conclusions similaires (25a et 97). Il serait, de ce point de vue, très intéressant d'étudier les effets de la déshydratation à des niveaux d' a_w voisins de 0,95 - 0,98.

II. - INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM

A. - ACTION DE L' a_w SUR LA CROISSANCE DE QUELQUES SOUCHES DE RHIZOBIUM

La majorité des milieux de culture usuels présentent une a_w de l'ordre de 0,995 (32). L' a_w des milieux employés lors de cette étude (R.C. et T.Y.) peut être estimée à 0,9990. En effet, le milieu Y.E.M. (Yeast Extract Mannitol) possède une a_w de 0,9990 (25a) et ce milieu est chimiquement très proche du milieu R.C. mannitolé.

Une gamme de milieux à différentes a_w (0,9990 à 0,9690) a été réalisée par addition de soluté à concentration donnée (58 et 70).

Pour une même a_w trois ou quatre solutés distincts ont été utilisés afin de faire la part entre l'effet de l' a_w et la toxicité éventuelle du soluté retenu pour la réaliser.

En cours de croissance aucune précaution n'est prise en vue de maintenir l' a_w et le pH constant.

1 - a_w minimale et optimale de croissance de *Rhizobium meliloti* M2011

a) a_w minimale de croissance

Cinq types de solutés (glycérol, LiCl, NaCl, KCl et acétate de sodium) ont été retenus pour réaliser une gamme de milieux R.C. à différentes a_w .

Les résultats représentés en figure 13 montrent que :

- pour toutes baisses d' a_w du milieu de culture, quel que soit le soluté utilisé pour les réaliser, correspondent des augmentations de durée de phase de latence, de temps de génération et des baisses de rendement. La croissance observée à une a_w donnée n'est pas indépendante du soluté employé. Ainsi, l'acétate de sodium s'est révélé toxique dès la concentration de 1 % (baisse d' a_w de 0,0037). Le NaCl et le KCl permettent d'observer des croissances identiques pour une a_w donnée, croissances qui sont cependant très inférieures à celles enregistrées lorsque le LiCl, et surtout le glycérol, sont retenus pour réduire l' a_w . L'évolution du pH est similaire dans tous les milieux ;
- l' a_w minimale de croissance serait de l'ordre de 0,9804 (réalisée par le NaCl) et légèrement inférieure à 0,9690 (provoquée par addition de LiCl).

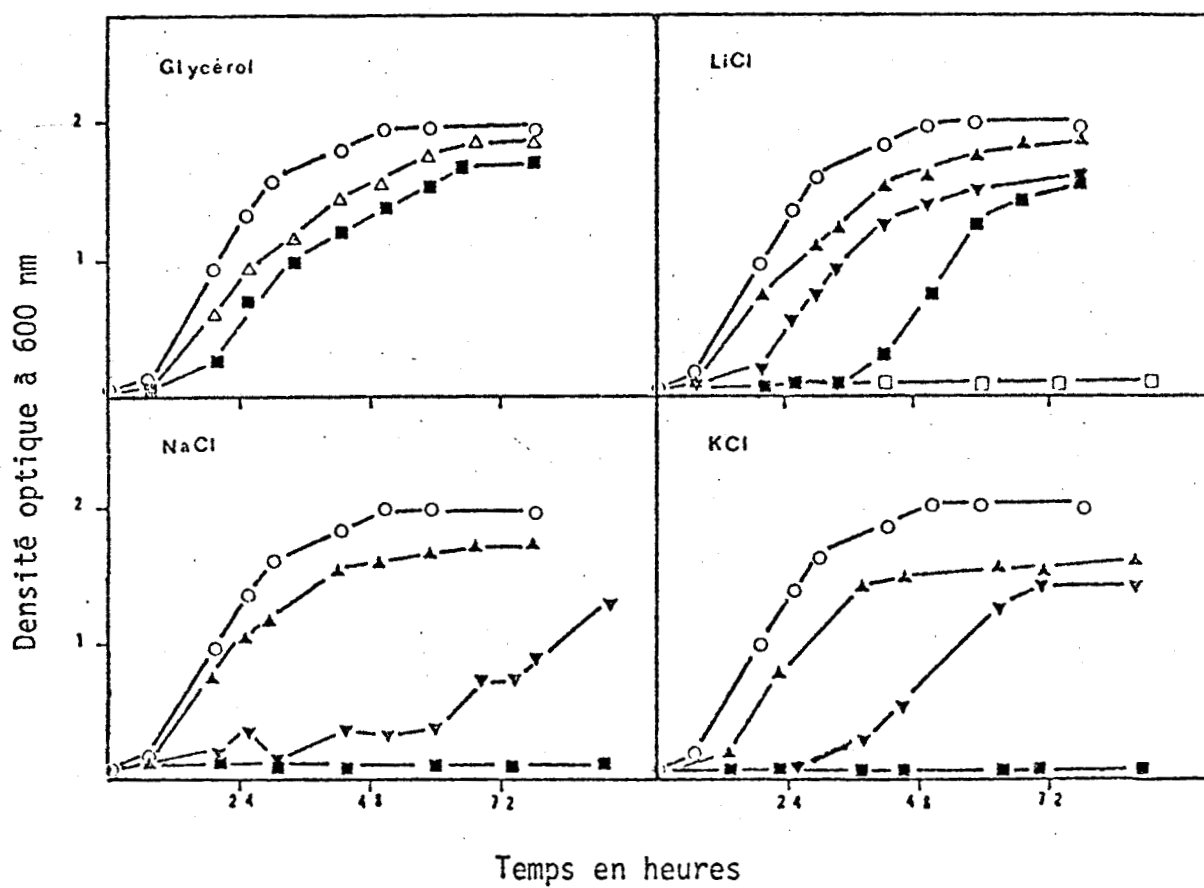
Ces résultats obtenus par appréciation de la D.O. à 600 nm sont confirmés en numération figure 14.

b) a_w optimale de croissance

Un certain nombre d'auteurs (32, 34) soulignent que les bactéries non halophiles présentent une a_w optimale de croissance située entre 0,98 et 0,995, a_w qui n'est pas forcément celle du milieu de culture utilisé.

Nous avons observé un certain nombre de fois qu'une légère diminution de l' a_w du milieu pouvait se traduire par une densité optique légèrement supérieure à celle du témoin. Nous avons entrepris, en collaboration avec Mlle GOSSE (stagiaire I.U.T.), une étude sur les rendements et les temps de génération obtenus après de légères réductions d' a_w réalisées par trois solutés différents en milieu R.C. et T.Y. (tab. 13).

FIGURE 13 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOTI M2011

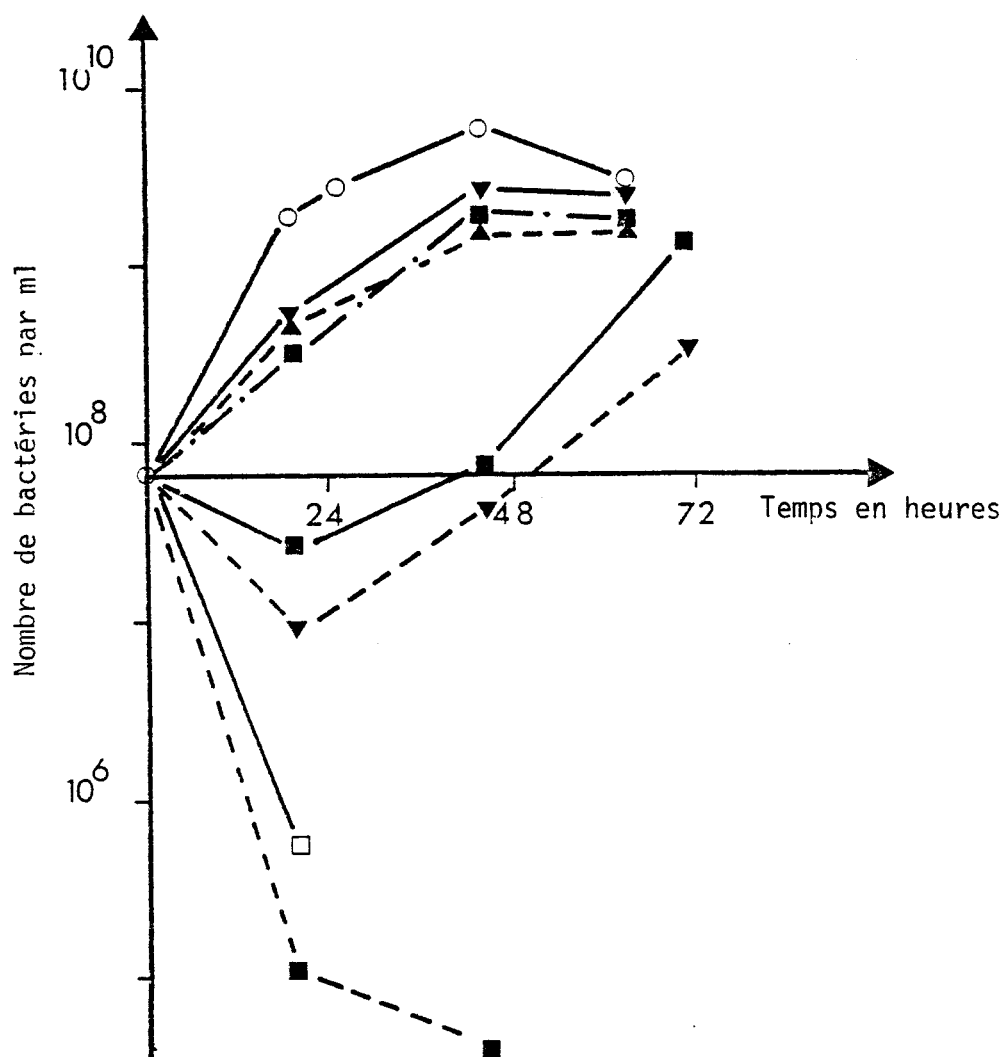


- a_w 0,9990
- ▲ a_w 0,9866
- △ a_w 0,9840
- ▼ a_w 0,9804
- a_w 0,9690
- a_w 0,9490



La croissance est appréciée par lecture de la D.O. à 600 nm.

FIGURE 14 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOTI M2011



- — ○ a_w 0,9990
 ▼ — ▼ a_w 0,9804 } contrôlées par le LiCl
 ■ — ■ a_w 0,9690 }
 □ — □ a_w 0,9490 }
 ▲ - - - ▲ a_w 0,9866 } contrôlées par le NaCl
 ▼ - - - ▼ a_w 0,9804 }
 ■ - - - ■ a_w 0,9690 }
 ■ - . - ■ a_w 0,9690 contrôlée par le glycérol



La croissance est appréciée par numérations.

TABLEAU 13 - CULTURES DE *R. MELILOTI* SOUCHE M2011, EN MILIEUX DE DIFFERENTES a_w PROVOQUEES PAR TROIS SOLUTES, APRES 45 HEURES D'INCUBATION A 30°C

a_w	Milieux de culture			
	R.C.		T.Y.	
	N	T	N	T
0,9990 (témoin)	2,90	2,50	2,50	2,46
Glycérol				
0,9930	n.d.	n.d.	1,80	2,55
0,9900	2,30	2,57	1,45	2,56
0,9840	n.d.	n.d.	1,15	2,58
LiCl				
0,9930	1,35	2,60	1,35	2,54
0,9900	1,80	2,61	1,15	2,58
0,9866	1,50	3,24	1,25	2,64
NaCl				
0,9966	n.d.	n.d.	1,80	2,42
0,9960	2,30	2,48	1,65	2,46
0,9940	n.d.	n.d.	1,40	2,44
0,9928	1,50	2,50	1,25	2,41
0,9866	0,80	4,70	1,15	2,50

(N : nombre de bactéries $\times 10^9/\text{ml}$; T : temps de génération en heures et n.d. : non déterminé).



De légères réductions d' a_w , quels que soient les solutés et les milieux employés, ne permettraient pas d'obtenir chez *Rhizobium meliloti* M2011 des temps de génération plus courts ni des rendements supérieurs.

Notons, cependant, qu'en milieu T.Y. à a_w 0,9866 (provoquée par NaCl ou LiCl), les temps de génération sont notablement plus courts qu'en milieu R.C. dans les mêmes conditions. Ce phénomène se retrouve d'ailleurs pour des a_w encore légèrement inférieures.

2 - a_w minimale de croissance de *Rhizobium meliloti* M.1.5

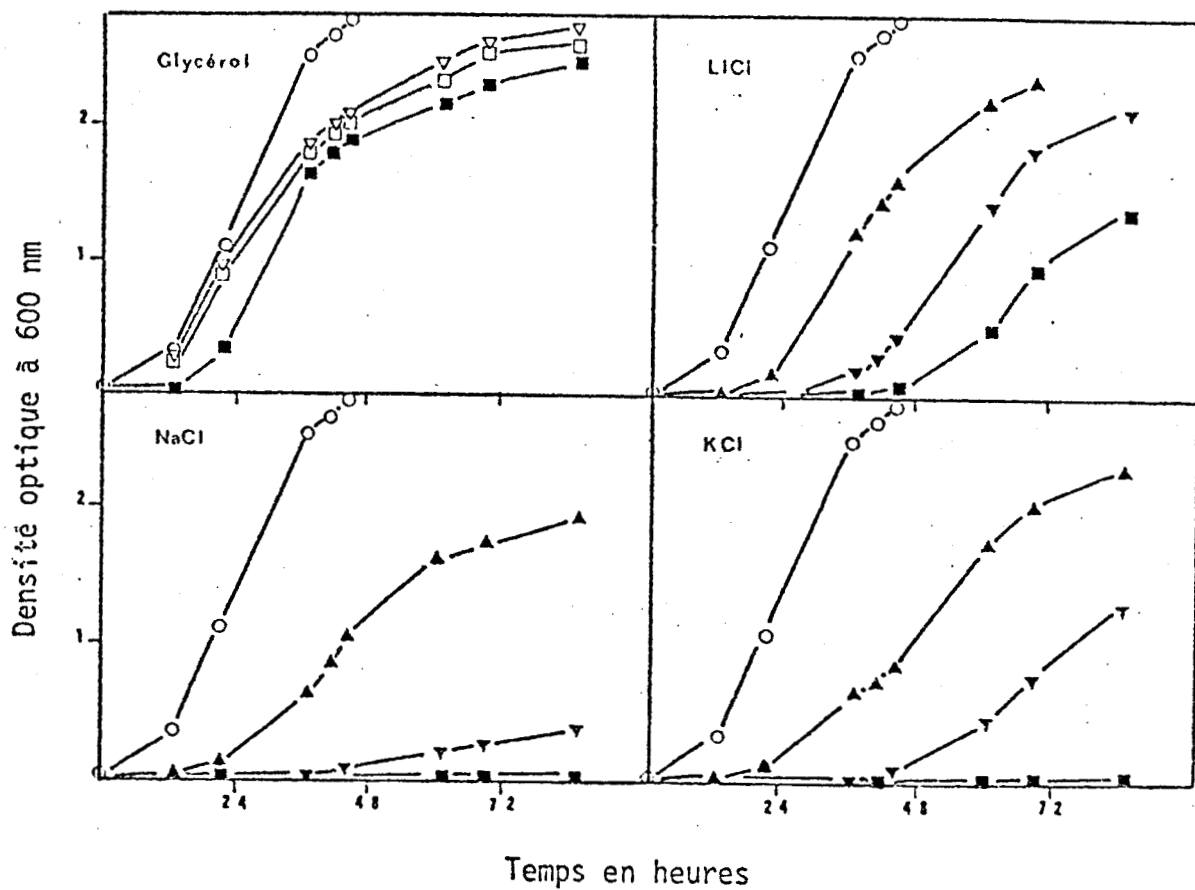
Comme pour les essais précédents, nous avons utilisé cinq types de solutés différents pour réaliser les gammes d' a_w en milieu R.C.

Les résultats qui sont rapportés sur la figure 15 présentent des profils de courbes tout à fait similaires à ceux observés pour la souche M2011. Cependant, les phénomènes semblent nettement plus accentués pour la souche M.1.5. Les a_w minimales de croissance resteraient identiques à celles de la souche M2011. Les phases de latence sont notablement plus longues sauf lorsque l' a_w du milieu est obtenue par addition de glycérol.

Comme pour la souche M2011, l'acétate de sodium ne permet aucune croissance dès la concentration de 1 %.

Les résultats rassemblés dans la figure 16 montrent une diminution du nombre de cellules vivantes inoculées dans pratiquement tous les milieux d' a_w plus faible que le témoin ; suite à cette diminution, une croissance est observable. Ces constatations expliqueraient l'allongement des phases de latence.

FIGURE 15 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOTI M. 1.5

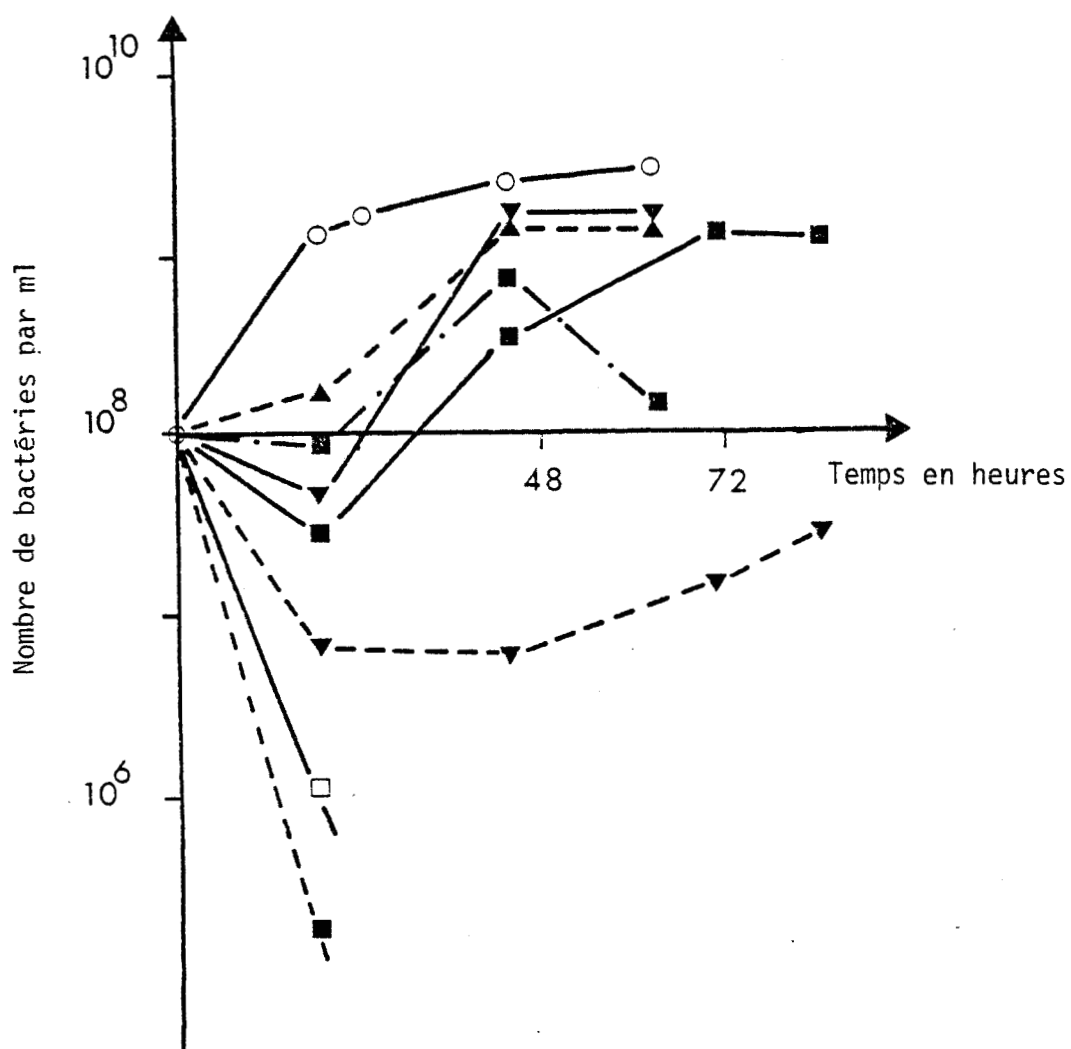


- a_w 0,9990
- ▽ a_w 0,9930
- a_w 0,9900
- ▲ a_w 0,9866
- ▼ a_w 0,9804
- a_w 0,9690



La croissance est appréciée par lecture de la D.O. à 600 nm.

FIGURE 16 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DIFFERENTS SOLUTES) DU MILIEU R.C. SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOTI M 1.5



- | | | |
|---------|--------------|---------------------------|
| ○—○ | a_w 0,9990 | |
| ▼—▼ | a_w 0,9804 | } contrôlée par le LiCl |
| ■—■ | a_w 0,9690 | |
| □—□ | a_w 0,9490 | |
| ▲- -▲ | a_w 0,9866 | } contrôlée par le NaCl |
| ▼- -▼ | a_w 0,9804 | |
| ■- -■ | a_w 0,9690 | |
| ■- · -■ | a_w 0,9690 | contrôlée par le glycérol |

La croissance est appréciée par numérations.



Il semble donc que la souche M 1.5 est légèrement plus sensible aux baisses d' a_w que la souche M2011.

3 - a_w minimale de croissance de *Rhizobium japonicum* J5

Ces essais¹ ont été réalisés en milieu T.Y.. Le glycérol, le NaCl et le LiCl ont été retenus pour obtenir des milieux à différentes a_w .

En milieu T.Y. (fig. 17), nous observons une croissance jusqu'à une a_w de 0,9840 provoquée par l'addition de glycérol et une très légère croissance à a_w 0,9960 contrôlée par addition de NaCl. Aucune croissance n'est détectable lorsque l' a_w du milieu est obtenue par addition de LiCl. *Rhizobium japonicum* J5 serait donc très sensible à la présence de solutés de type électrolyte.

B. - EFFETS DE LA PROLINE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE SUR LA CROISSANCE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M2011 EN MILIEUX R. D' a_w DIFFERENTES

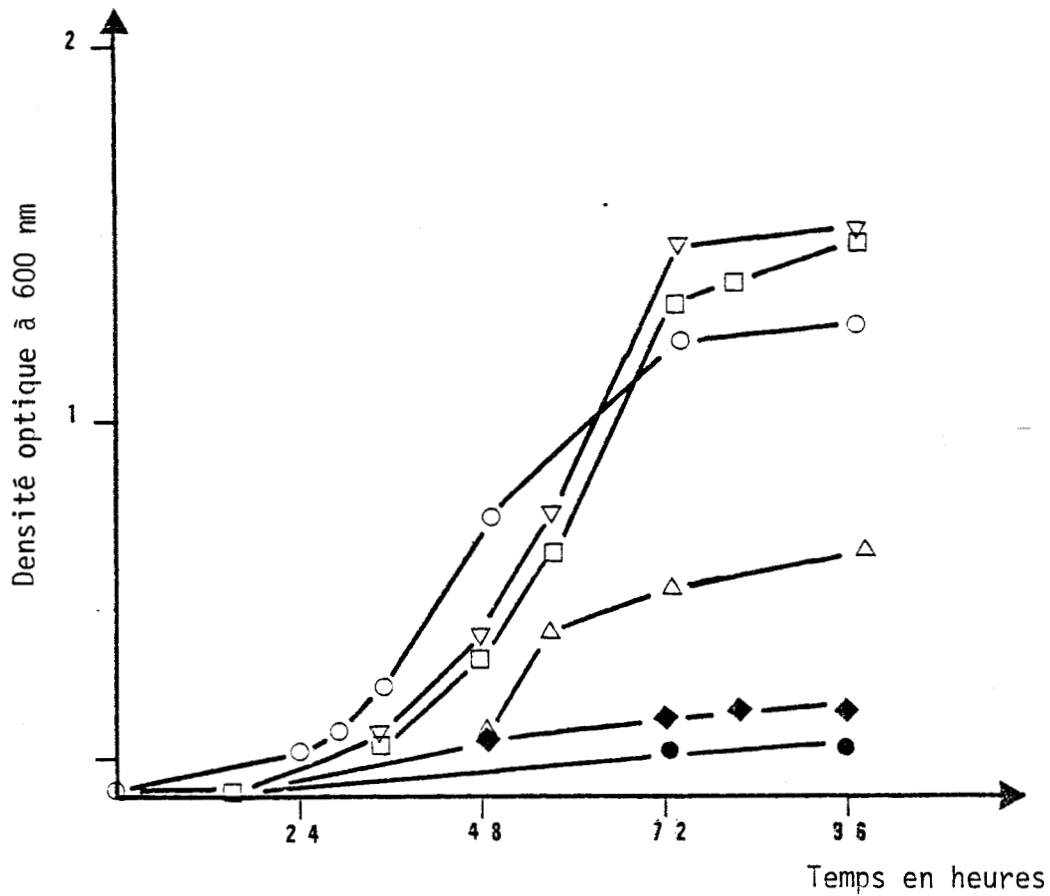
La majorité des bactéries gram négatif, confrontées à des milieux de faibles a_w , concentrent dans leurs cytoplasmes de l'acide glutamique et un ion d'accompagnement (K^+). Dans des conditions similaires, la plupart des bactéries gram positif accumulent de la proline (68).

Ces phénomènes ont été récemment étudiés chez le genre *Rhizobium* (52, 108).

Or, l'addition de proline permet la culture de *Klebsiella pneumoniae* en milieux de faibles a_w (59).

¹ réalisés en collaboration avec Mlle GOSSE (stagiaire I.U.T.).

FIGURE 17 - INFLUENCE DE L' a_w (CONTROLEE PAR DEUX SOLUTES)
DU MILIEU T.Y. SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM
JAPONICUM J5



- a_w 0,9990
 - ◆ a_w 0,9966
 - a_w 0,9960
 - ▽ a_w 0,9930
 - a_w 0,9900
 - △ a_w 0,9840
- } contrôlée par le NaCl
 } contrôlée par le glycérol

La croissance est appréciée par lecture de la D.O. à 600 nm.

Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse sur la souche M2011 cultivée en milieu minimum RHB₁ additionné de mannitol et ayant des a_w de 0,999 ; 0,9866 et 0,9804 (réalisées par addition de NaCl).

La proline ou l'acide glutamique ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 1 mM.

Les résultats sont portés sur la figure 18.

L'addition de proline au milieu témoin RHB₁ contenant du mannitol n'affecte pas la croissance de la souche. Par contre, l'addition d'acide glutamique semblerait diminuer le rendement atteint en phase stationnaire.

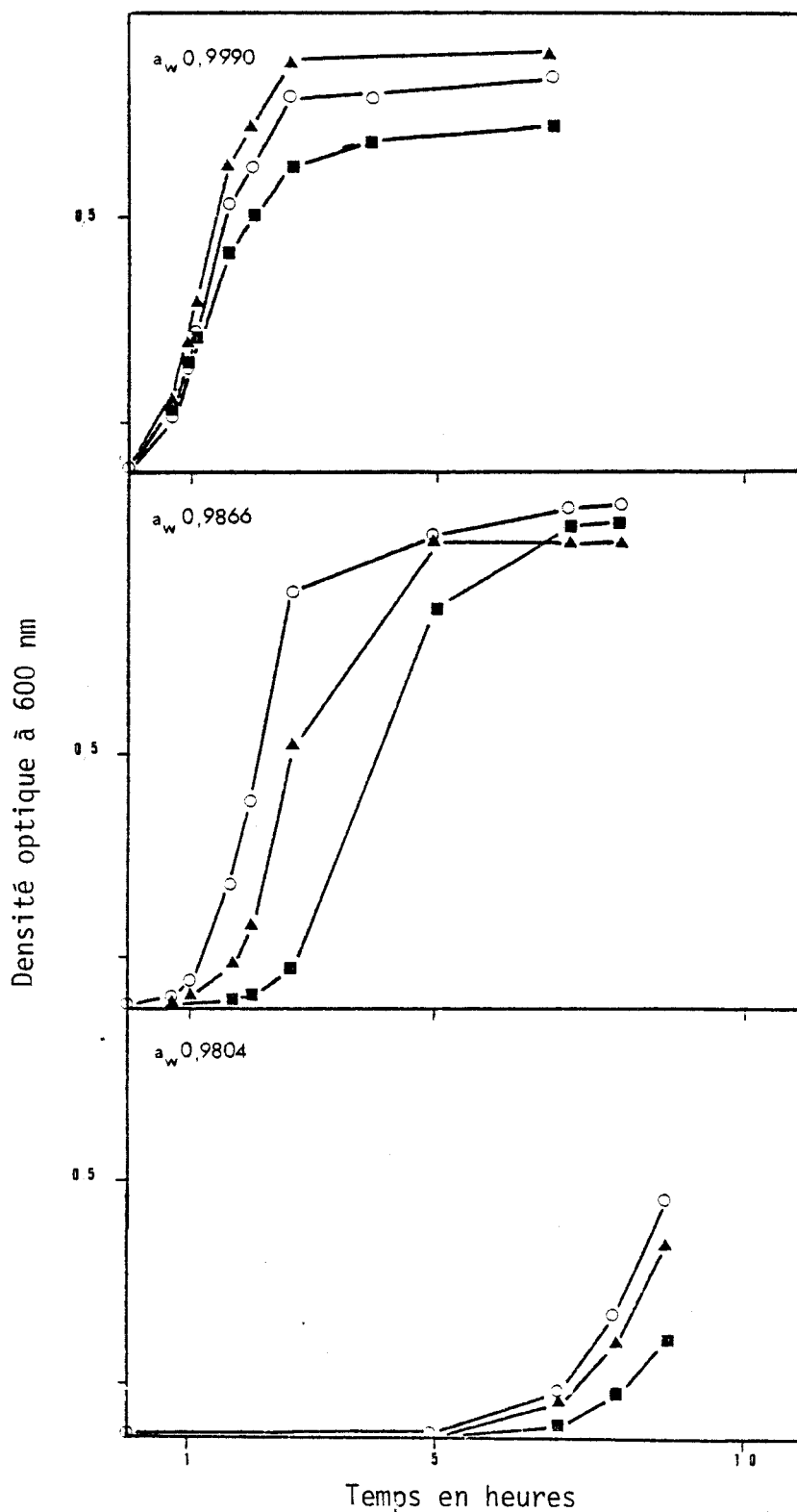
On constate que lorsque l' a_w du milieu est plus faible, l'addition de proline et notamment d'acide glutamique a un effet défavorable.

La réalisation de cultures à différentes concentrations en acides aminés (proline ou acide glutamique) permettrait de savoir si leur nocivité, qui apparaît quand l' a_w du milieu est réduite, résulte d'une accumulation intracellulaire néfaste à de telles concentrations (1 mM).

C. - INFLUENCE DE L' a_w DU MILIEU DE CULTURE SUR LA SURVIE DE RHIZOBIUM CONSERVE A L'ETAT DESHYDRATE

Ces essais ont été réalisés en vue d'apprécier s'il existe une relation entre l'aptitude à se développer en milieu de faibles a_w et la tolérance à la dessiccation comme l'affirment certains auteurs (31).

FIGURE 18 - EFFETS DE L'ADDITION DE PROLINE OU D'ACIDE GLUTAMIQUE (1 mM) SUR LA CROISSANCE DE *RHIZOBIUM MELILOTTI* M2011 EN MILIEUX RHB₁ DE DIFFERENTES a_w



La croissance est appréciée par lecture de la D.O. à 600 nm.

Les cellules sont cultivées en milieu R.C. de différentes a_w (réalisées par trois solutés différents). Elles sont ensuite prélevées, centrifugées et lavées puis soumises au protocole expérimental d'étude de la conservation. La conservation s'est effectuée sur filtre Millipore à a_w 0 pendant 72 h.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 14.

Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu de plus faible a_w que le témoin, elles présentent des taux de survie sensiblement plus élevés. Seule la souche M 1.5 présente des taux de survie inférieurs au témoin quand elle est cultivée dans des milieux de plus faibles a_w provoqués par l'addition de NaCl.

Il serait très intéressant de poursuivre ces expériences en standardisant les concentrations cellulaires initiales et en élargissant la gamme d' a_w de conservation.

D. - CONCLUSION

A toute baisse d' a_w des milieux de culture de *Rhizobium* correspond un allongement des durées de phases de latence, une augmentation du temps de génération et une diminution des rendements obtenus en phase stationnaire.

Cependant, l'influence du soluté utilisé pour ajuster l' a_w du milieu est déterminante. Non seulement les solutés diminuent l' a_w mais ils présentent également une toxicité qui leur est propre.

TABLEAU 14 - INFLUENCE DE L'APTITUDE A SE DEVELOPPER EN MILIEUX DE FAIBLES a_w SUR LES TAUX DE SURVIE OBTENUES POUR LES SOUCHES M.1.5 ET M2011 APRES 72 HEURES DE CONSERVATION A a_w 0.

Numération avant et après conservation	a_w des milieux de culture	R.C.	R.C. + LiCl		R.C. + NaCl		R.C. + Glycérol
		0,9990	0,9804	0,9690	0,9866	0,9804	0,9690
M 1.5.	No	$3,10 \cdot 10^9$	$1,55 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$	$1,30 \cdot 10^9$	$1,25 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^8$
	N	$2,46 \cdot 10^6$	$7,60 \cdot 10^6$	$3,10 \cdot 10^6$	$1,24 \cdot 10^5$	$2,04 \cdot 10^4$	$1,75 \cdot 10^5$
	N/No	$7,90 \cdot 10^{-4}$	$4,90 \cdot 10^{-3}$	$2,58 \cdot 10^{-3}$	$9,53 \cdot 10^{-5}$	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$
M2011	No	$3,00 \cdot 10^9$	$2,20 \cdot 10^9$	$1,80 \cdot 10^9$	$1,50 \cdot 10^9$	$9,50 \cdot 10^8$	$1,58 \cdot 10^9$
	N	$1,26 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^6$	$3,30 \cdot 10^6$	$3,20 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^6$	$6,40 \cdot 10^7$
	N/No	$4,20 \cdot 10^{-4}$	$8,63 \cdot 10^{-4}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$	$2,13 \cdot 10^{-3}$	$2,31 \cdot 10^{-3}$	$4,05 \cdot 10^{-2}$

No : nombre de bactéries avant dessiccation

N : nombre de bactéries après 72 h de conservation à a_w 0



- Pour deux souches de *Rhizobium meliloti* (M2011 et M 1.5), le glycérol et le LiCl se montrent les moins toxiques ; le NaCl et le KCl présentent une toxicité identique et intermédiaire. L'acétate de sodium est particulièrement toxique. Ces deux souches, pourtant du même groupe d'inoculation, possèdent des tolérances différentes aux baisses d' a_w .

- La souche de *Rhizobium japonicum* testée montre une légère tolérance aux baisses d' a_w réalisées par le glycérol mais possède une grande sensibilité aux baisses d' a_w provoquées par le NaCl et surtout par le LiCl. De telles constatations ont déjà été effectuées par MICHAUD-GOUBLET (70).

- Il ne semble donc pas possible d'établir une liste unique de toxicité des solutés utilisés pour réduire l' a_w applicable à l'ensemble du genre *Rhizobium*.

- L'existence d'une perméabilité passive du glycérol chez *Rhizobium* (25a, 70), ainsi que son aptitude à être métabolisé (7, 74), nous conduisent à le classer parmi les moins inhibiteurs mais également parmi les moins propices à l'étude de l'influence de l' a_w chez le genre *Rhizobium*. Une mesure de l'activité de l'eau ou un dosage du glycérol (109), après croissance, permettrait de mieux appréhender ces phénomènes.

- Dans nos conditions expérimentales, l' a_w minimale de croissance est de l'ordre de 0,9804 (réalisée avec du NaCl) et légèrement inférieure à 0,9690 (contrôlée avec du LiCl) pour *Rhizobium meliloti*. *Rhizobium japonicum* présente une tolérance très inférieure de l'ordre de 0,9966 (réalisée par du NaCl).

- Les courbes obtenues, lors de cette étude de l'influence de l' a_w sur la croissance de *Rhizobium*, correspondent tout à fait à celles réalisées par différents auteurs sur d'autres bactéries (16, 70, 90). La limite de tolérance au NaCl, déterminée pour deux souches de *R. meliloti* et une de *R. japonicum* lors de cette étude, correspond aussi à un certain nombre de travaux (13).

- L' a_w optimale de croissance de *Rhizobium meliloti* 2011 serait de l'ordre de 0,999 (a_w du milieu R.C.) ; une légère diminution d' a_w ne conduisant pas à une meilleure croissance.

L'addition de proline ou d'acide glutamique (à concentration finale de 1 mM) ne permet pas d'obtenir une meilleure croissance de *Rhizobium meliloti* 2011 en milieu RHB₁ mannitolé de faibles a_w . L'addition de ces acides aminés à des concentrations plus faibles serait à envisager afin de déterminer leurs rôles éventuels dans les mécanismes d'osmorégulation.

Il apparaît que l'aptitude à se développer en milieu de faible a_w détermine une tolérance légèrement plus élevée à la dessiccation comme il a déjà été démontré pour d'autres bactéries (31). L'étude de l'influence de ce paramètre sur la tolérance de *Rhizobium* à différents niveaux de déshydratation serait intéressante à envisager.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

L'utilisation d'enceintes à différentes H.R. nous a permis d'étudier la tolérance de *Rhizobium meliloti* M2011 lors de la conservation à différents degrés de déshydratation.

Les enceintes contenant des solutions saturées caractéristiques permettent d'obtenir des H.R. données constantes mais imposent également des vitesses de déshydratation caractéristiques différentes suivant l'enceinte considérée. Pour une même enceinte, la vitesse de déshydratation sera différente si celle-ci est mise sous-vide partiel ou laissée à pression atmosphérique. Ces constatations nous ont conduit à étudier les influences de l'oxygène et des vitesses de déshydratation sur les taux de survie observés en conservations.

Les effets léthaux de l'oxygène apparaissent dès l' a_w 0,43 voire 0,66. Il semble envisageable de conserver *Rhizobium meliloti* M2011 à des a_w remarquablement basses en l'absence de toute trace d'oxygène.

Les déshydratations rapides (perte en eau $>$ à 20,4 mg/h) se révèlent particulièrement nocives et ne permettent pas d'obtenir des taux de survie acceptables en conservation contrairement aux déshydratations lentes (perte en eau $<$ à 8,75 mg/h).

Les dommages subis lors des déshydratations rapides, observés en conservation, sont engendrés entre une teneur de 5 mg et la teneur en eau caractéristique de l' a_w 0,85.

Un changement brutal de la structure d'un polymère très hydraté (probablement la pseudo-capsule) serait une étape déterminante, entraînant la léthalité observée en conservation.

Après déshydratations lentes, nous observons en conservation (à a_w 0 ; 0,22 et 0,43) des réponses biphasiques. Ces réponses pourraient s'interpréter par la formation d'une couche de cellules mortes ou par un retrait très lent de l'eau liée.

Une étude de l'influence de l'âge physiologique sur la tolérance à la conservation à l'état déshydraté a été entreprise. Les cellules, prélevées en phase stationnaire, tolèrent beaucoup mieux la conservation sous toutes les a_w que les cellules prélevées

en début, milieu et fin de phase exponentielle ; celles-ci présentent une tolérance identique à toutes les a_w de conservation. Cependant, les cellules prélevées en début et milieu de phase exponentielle semblent sensibles à une conservation à des a_w supérieures à 0,66.

Le rôle protecteur éventuel des exopolysaccharides a été envisagé ; ils sont capables de protéger essentiellement les cellules conservées à a_w 0 et leur présence est défavorable lors d'une conservation à a_w 0,85. Pour les autres a_w de conservation étudiées, le rôle protecteur semble variable suivant la quantité (rétention d'eau) ou la qualité de l'exopolysaccharide.

Quels que soient les paramètres envisagés lors de cette étude, l' a_w optimale de conservation en présence d'air est de 0,43. Une conservation sous a_w 0,66 reste inconcevable quelles que soient les conditions. Il est probable que cette a_w se situe à un point de rencontre de différents mécanismes de destruction.

Dans nos conditions expérimentales, la dessiccation et la conservation à l'état déshydraté ne se sont pas révélées particulièrement mutagènes.

En l'absence d'agents protecteurs, de protection contre les effets de l'oxygène et pour des concentrations cellulaires initiales relativement faibles ($\approx 10^9$ b./ml), *Rhizobium meliloti* M2011 semble être particulièrement sensible à la déshydratation.

Cependant un certain nombre d'expériences sont à envisager pour mieux définir les résultats précédemment décrits. L'influence de paramètres tels que la concentration cellulaire initiale, les conditions de réhydratation et les agents protecteurs spécifiques reste à déterminer. Une étude de l'intégrité du corps bactérien en microscopie électronique ou par appréciation de la sensibilité au lysozyme des cellules déshydratées serait intéressante à mener.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de l' a_w sur la croissance de souches de *Rhizobium*.

Le genre *Rhizobium*, comme la majorité des bactéries à gram négatif, présente une a_w minimale de croissance très élevée.

La croissance en milieux de faibles a_w n'est pas indépendante du soluté utilisé pour réaliser la baisse d' a_w . Ainsi par ordre décroissant de toxicité nous observons : toxicité de l'acétate de sodium >> NaCl \approx KCl > LiCl > glycérol pour *Rhizobium meliloti* et toxicité du LiCl >> NaCl >> glycérol pour *Rhizobium japonicum*.

Compte tenu de ces observations, l' a_w minimale de croissance peut être évaluée à 0,9804 (avec le NaCl) et 0,969 (avec le LiCl) pour *Rhizobium meliloti* et à 0,9966 (avec le NaCl) pour *Rhizobium japonicum*.

Rhizobium meliloti M2011 ne semble pas montrer d' a_w optimale de croissance autre que celle du milieu de base R.C. ou T.Y..

L'addition de proline ou d'acide glutamique n'améliore pas les croissances à faibles a_w . Cependant, il semble que l'aptitude à se développer en milieu de faibles a_w permet une amélioration des taux de survie en conservation à a_w 0.

Une étude nettement plus détaillée reste à entreprendre sur les mécanismes d'osmorégulation chez *Rhizobium*. Une telle voie de recherche semblerait intéressante à mener.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AMARGER N., M. JACQUEMETTON et G. BLOND, 1972. - Influence de l'âge de la culture sur la survie de *Rhizobium meliloti* à la lyophilisation et à la conservation après lyophilisation. *Archiv. für Mikrobiol.*, 81, 361-366.
- 2 - ANAGNOSTOPOULOS G.D. and G. DHAVISES, 1982. - Chemostat adaptation of *Escherichia coli* B/r/1 to low water activity. *J. Appl. Bact.*, 53, 173-177.
- 3 - ANDERSON C.B. and L.D. WITTER, 1982. - Glutamine and Proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1501-1503.
- 4 - ANDO Y. and E. FUKADA, 1974. - Effects of drying on Deoxyribonucleic Acids. *J. Radiat. Res.*, 15, 212-218.
- 5 - ANTHEUNISSE J. and L. ARKESTEIJN-DIJKSMAN, 1979. - Rate of drying and the survival of microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45, 177-184.
- 6 - ANTHEUNISSE J., J.W. DE BRUIN-TOL and M.E. VAN DER POL-VAN SOEST, 1981. - Survival of microorganisms after drying and storage. *Antonie van Leeuwenhoek*, 47, 539-545.
- 7 - ARIAS A. and G. MARTINEZ-DRETS, 1976. - Glycerol metabolism in *Rhizobium*. *Can. J. Microbiol.*, 22, 150-153.
- 8 - ASADA S., M. TAKANO and I. SHIBASAKI, 1979. - Deoxyribonucleic acid strand breaks during drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 266-273.
- 9 - ASADA S., M. TAKANO and I. SHIBASAKI, 1980. - Mutation induced by drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 274-281.

- 10 - ASHWOOD-SMITH M.J. and E. GRANT, 1976. - Mutation induction in bacteria by freeze-drying.
Cryobiology, 13, 206-213.
- 11 - ASHWOOD-SMITH M.J., 1978. - Factors associated with mutation induction in bacteria produced by freeze-drying.
Cryobiology, 15, 692.
- 12 - ASHWOOD-SMITH M.J., 1980. - Induction of λ bacteriophage in lysogenic bacteria by freeze-drying.
Cryobiology, 17, 181-183.
- 13 - BAGHDADLI J., 1981. - *Rhizobium* - Légumineuse : aspects physiologiques de l'adaptation en milieu salé.
D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 14 - BANNO I., T. SAKANE and T. IJIMA, 1978. - Mutational problem in preservation of bacteria (*Escherichia coli*) by L-drying.
Cryobiology, 15, 692-693.
- 15 - BEN BRAHIM M.T., 1980. - Contribution à l'étude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*.
Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 16 - BEUCHAT L.R., 1974. - Combined effects of water activity, solute and temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*.
Appl. Microbiol., 27, 1075-1080.
- 17 - BEUCHAT L.R., 1978. - Injury and repair of gram-negative bacteria with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane.
Advanc. Appl. Microbiol., 23, 219-248.
- 18 - BERNSTEIN L., 1964. - Salt tolerance of plants.
U.S. Dept. Agric. Inf. Bull., 283.
- 19 - BIZOT H. et J.L. MULTON, 1978. - Méthode de référence pour la mesure de l'activité de l'eau dans les produits alimentaires.
Ann. Technol. Agric., 27, 441-454.

- 20 - BLUMWALD E. and E. TEL-OR, 1982. - Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*.
Arch. Microbiol., 132, 168-172.
- 21 - BORDELEAU L.M., R.A. LACHANCE et H. ANTOUN, 1977. - Effet des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes successives de la luzerne sur la fixation symbiotique de l'azote.
Can. J. Plant Sci., 57, 433-439.
- 22 - BOYLEN C.W., 1973. - Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation.
J. Bact., 113, 33-37.
- 23 - BROWN A.D., 1976. - Microbial water stress.
Bacteriol. Rev., 40, 803-846.
- 24 - BROWN A.D., R. LILLEY and T. MARENGO, 1982. - Osmoregulation in *Dunaliella*. Intracellular distribution of enzymes of glycerol metabolism.
Z. Naturforsch., 37c, 1115-1123.
- 25a - BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL, 1977. - Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation.
Soil Biol. Biochem., 9, 143-147.
- 25b - BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL, 1977 - Desiccation induced damage to the cell envelope of root nodule bacteria.
Soil Biol. Biochem., 9, 147-152.
- 26 - BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL, 1977 - Water status of *Rhizobia* in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite.
J. Gen. Microbiol., 99, 19-27.
- 27 - CADMUS M.C., K.A. BURTON and M.E. SLODKI, 1982. - Growth-related substituent changes in exopolysaccharides of fast growing *Rhizobia*.
Appl. Environ. Microbiol., 44, 242-245.

- 28 - CALCOTT P.H. and A.M. GARGETT, 1981. - Mutagenicity of freezing and thawing to *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Letters, 10, 151-155.
- 29 - CAVALIERI A.J. and H.C.A. HUANG, 1981. - Accumulation of proline and glycinebetaine in *Spartina alterniflora* Loisel in response to NaCl and nitrogen in the Marsh.
Oecologia, 49, 224-228.
- 30 - CHEFTEL J.C. et H. CHEFTEL, 1978. - L'eau. Dans : *Introduction à la Biochimie et à la technologie des aliments*, 1, 3-15.
Technique et documentation. Entreprise moderne d'édition.
- 31 - CHEN M. and M. ALEXANDER, 1973. - Survival of soil bacteria during prolonged desiccation.
Soil Biol. Biochem., 5, 213-221.
- 32 - CHIRIFE J., G. FAVETTO and O.C. SCORZA, 1982. - The water activity of common liquid bacteriological media.
J. Appl. Bact., 53, 219-222.
- 33 - CHIRIFE J., S.M. ALZAMORA and C. FERRO-FONTAN, 1983. - Microbial growth at reduced water activities : studies of a_w prediction in solutions of compatible solute.
J. Appl. Bact., 54, 339-343.
- 34 - CHRISTIAN J.H.B. and J.A. WALTHO, 1962. - The water relations of *staphylococci* and *micrococci*.
J. Appl. Bact., 25, 369-377.
- 35 - CHRISTIAN J.H.B. and J.A. WALTHO, 1962. - Solute concentration within cells of halophilic and non-halophilic bacteria.
Biochim. Biophys. Acta, 65, 506-508.
- 36 - CHRISTIAN J.H.B. and J.A. WALTHO, 1964. - The composition of *Staphylococcus aureus* in relation to the water activity of the growth medium.
J. gen. Microbiol., 35, 205-213.

- 37 - CSONKA L.N., 1981. - Proline over production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Gen. Genet., 182, 82-86.
- 38 - DANSO S.K.A. and M. ALEXANDER, 1974. - Survival of two strains of *Rhizobium* in soil.
Soil. Sci. Soc. Proc., 38, 86-89.
- 39 - DAVIDSON F. and H.W. REUSZER, 1978. - Persistence of *Rhizobium japonicum* on the soybean seed coat under controlled temperature and humidity.
Appl. Environ. Microbiol., 35, 94-96.
- 40 - DELATTRE J.M., 1971. - Introduction à une étude génétique du genre *Rhizobium*.
Thèse de Docteur-Ingénieur, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 41 - DYE M., 1982. - A note on some factors affecting the survival of *Rhizobium* cultures during freeze drying and subsequent storage.
J. Appl. Bact., 52, 461-464.
- 42 - FRASER M.E., 1975. - A method of culturing *Rhizobium meliloti* on porous granules to form a pre-inoculant for Lucerne seed.
J. Appl. Bact., 39, 345-351.
- 43 - GALINSKI E.A. and H.G. TRÜPER, 1982. - Betaïne, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*.
FEMS Microbiol. Letters, 13, 357-360.
- 44 - GRECZ N., T.L. HAMMER, C.J. ROBNETT and M.D. LONG, 1980. - Freeze - thaw injury : evidence for double strand breaks.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 93, 1110-1113.
- 45 - GREENWAY H. and T.L. SETTER, 1979. - Accumulation of proline and sucrose during the first hours after transfer of *Chlorella emersonii* to high NaCl.
Aust. J. Plant Physiol., 6, 69-79.

- 46 - HALE C.N., 1967. - Some factors affecting the survival of *Rhizobium trifolii* on white clover.
Proceeding N.Z. Grassland Association, 182-186.
- 47 - HAMBLETON P., 1970. - The sensitivity of gram-negative bacteria, recovered from aerosols, to lysozyme and other hydrolytic enzymes.
J. Gen. Microbiol., 61, 197-204.
- 48 - HAMBLETON P., 1971. - Repair of wall damage in *Escherichia coli* recovered from an aerosol.
J. Gen. Microbiol., 69, 81-88.
- 49 - HETHERINGTON S.E., R.M. SMILLIE and N.D. HALLAM, 1982. - In vivo changes in chloroplast thylakoid membrane activity during viable and non-viable dehydration of a drought -tolerant plant, *Borhya nitida*.
Aust. J. Plant Physiol., 9, 611-621.
- 50 - HIEDA K., 1978. - Induction of genetic change by drying in Yeast. Effects of Relative Humidity and oxygen.
Cryobiology, 15, 693.
- 51 - HIEDA K., 1981. - Induction of genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* by partial drying in air of constant Relative Humidity and by U.V.
Mutat. Res., 84, 17-27.
- 52 - HUA S.S.T., V.Y. TSAI, G.M. LICHENS and A.T. NOMA, 1982. - Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR 1001 in response to sodium chloride salinity.
Appl. Environ. Microbiol., 44, 135-140.
- 53 - IMAMUL HUQ S.M. and F. LARHER, 1983. - Osmoregulation in higher plants : effect of NaCl salinity on non-nodulated *Phaseolus aureus* L. II - Changes in organic solutes.
New Phytol., 93, 209-216.

- 54 - JANSEN VAN RENSBURG H. and B.W. STIJDOM, 1980. - Survival of fast and slow-growing *Rhizobium* spp. under conditions of relatively mild desiccation.
Soil Biol. Biochem., 12, 353-356.
- 55 - KAMEKURA M. and H. ONISHI, 1982. - Cell-associated cations of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* grown in media of high concentration of LiCl, NaCl, KCl, RbCl or CsCl.
Can. J. Microbiol., 28, 155-161.
- 56 - KILBERTUS G., J. PROTH et B. VERVIER, 1979. - Effets de la desiccation sur les bactéries gram-négatives d'un sol.
Soil Biol. Biochem., 11, 109-114.
- 57 - KOUJIMA I., H. HAYASHI, K. TOMOCHIKA, A. OKABE and Y. KANEMASA, 1978. - Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration.
Appl. Environ. Microbiol., 35, 467-470.
- 58 - LEISTNER L. and W. RODEL, . - Inhibition of microorganism in food by water activity. In : "Inhibition and inactivation of vegetatives microbes".
Skinner, Hugo Eds., 219-237.
- 59 - LE RUDULIER D., S. SHENG YANG and L.N. CSONKA, 1982. - Nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* during osmotic stress. Effect of exogenous proline or a proline over producing plasmid.
Biochim. Biophys. Acta, 719, 273-283.
- 60 - LION M.B. and E.D. BERGMANN, 1961. - The effect of oxygen on freeze dried *Escherichia coli*.
J. Gen. Microbiol., 24, 191-200.
- 61 - LONCIN M., 1976. - Activité de l'eau. Dans : "Génie Industriel Alimentaire - Aspects fondamentaux".
Ed. Masson, 150-152.

- 62 - LUARD E.J., 1982. - Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential.
J. Gen. Microbiol., 128, 2563-2574.
- 63 - MACKEY B.M. and C.M. DERRICK, 1982. - The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*.
J. Appl. Bact., 53, 243-251.
- 64 - MARSHALL K.C., 1964. - Survival of root-nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures.
Aust. J. Agric. Res., 15, 273-281.
- 65 - MARSHALL K.C. and F.J. ROBERTS, 1963. - Influence of fine particle materials on survival of *Rhizobium trifolii* in sandy soil.
Nature, 198, 410-411.
- 66 - MARY P., 1981. - Influence de l'activité de l'eau sur *Rhizobium meliloti*.
D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 67 - MAZUR P., 1970. - Cryobiology : the freezing of biological systems.
Science, 168, 939-949.
- 68 - MEASURES J.C., 1975. - Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria.
Nature, 257, 398-400.
- 69 - MENDEZ-CASTRO F.A. and M. ALEXANDER, 1976. - Acclimation of *Rhizobium* to salts, increasing temperature and acidity.
Rev. lat.-amer. Microbiol., 18, 155-158.
- 70 - MICHAUD-GOUBLET R. , 1979. - Contribution à l'étude de l'influence de l'activité de l'eau sur la croissance de deux bactéries du sol : *Arthrobacter* sp. et *Rhizobium japonicum*.
Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lyon.

- 71 - MOHAMMAD F.A.A., R.H. REED and W.D.P. STEWART, 1983. - The halophilic cyanobacterium *Synechocystis* DUN52 and its osmotic responses.
FEMS Microbiol. Letters, 16, 287-290.
- 72 - MULTON J.L., H. BIZOT et G. MARTIN, . - Dans : "Techniques d'analyse et de contrôle dans les Industries Agro-Alimentaire. Tome IV, 1 : Eau (dosage, sorption et a_w).
- 73 - NIEL C., 1975. - Etude de la mutagenèse chez *Rhizobium meliloti*.
D.E.A. de Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 74 - OCHIN D., 1980. - La production en masse et la préparation de cellules déshydratées de *Rhizobium*.
Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 75 - OSA-AFIANA L.O. and M. ALEXANDER, 1982. - Differences among cow-pea *Rhizobia* in tolerance to high temperature and desiccation in soil.
Appl. Environ. Microbiol., 43, 435-439.
- 76 - PENA-CABRIALES J.J. and M. ALEXANDER, 1979. - Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying.
Soil Sci. Soc. Am. J., 43, 962-966.
- 77 - PILLAI R.N. and A. SEN, 1973. - Salt tolerance of *Rhizobium* from *Dolichos lablab*.
Zbl. Bakt. Abt. II, 128, 538-542.
- 78 - PULMAN D. and B. JOHNSON, 1978. - Amino acid pools in members of the genus *Erwinia* grown in continuous culture.
J. Gen. Microbiol., 108, 349-353.
- 79 - RECORD B.R., R. TAYLOR and D.S. MILLER, 1962. - The survival of *Escherichia coli* on drying and rehydration.
J. Gen. Microbiol., 28, 585-598.

- 80 - REID J.J., E.B. FRED and I.L. BALDWIN, . - The effects of storage on Rhizobia.
Soc. Am. Bact., A12.
- 81 - RICHARD-MOLARD D., H. BIZOT et J.L. MULTON, 1982. - Activité de l'eau, facteur essentiel de l'évolution microbiologique des aliments.
Sci. Aliments, n° hors série II, 2, 3-17.
- 82 - SANCHEZ-DIAZ M., P. APARICIO-TEJO, C. GONZALEZ-MURUA and J.I. PENA, 1982. - The effect of NaCl salinity and water stress with polyethylene glycol on nitrogen fixation stomatal response and transpiration of *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *Trifolium brachycalycinum* (subclover).
Physiol. Plant, 54, 361-366.
- 83a- SCHONBECK M.W. and J.D. BEWLEY, 1981. - Responses of the moss *Tortula ruralis* to desiccation treatments : effects of minimum water content and rates of dehydration and rehydration.
Can. J. Bot., 59, 2698-2706.
- 83b- SCHONBECK M.W. and J.D. BEWLEY, 1981 - Responses of the moss *Tortula ruralis* to desiccation treatments : variations in desiccation tolerance.
Can. J. Bot., 59, 2707-2712.
- 84 - SCOTT W.J., 1958. - The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage.
J. Gen. Microbiol., 19, 624-633.
- 85 - SINGLETON P.W., S.A. EL SWAIFY and B.B. BOHLOOL, 1982. - Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival.
Appl. Environ. Microbiol., 44, 884-890.
- 86 - SOULIDES D.A. and F.E. ALISON, 1961. - Effect of drying and freezing soils on carbondioxyde production, available mineral nutrients, aggregation and bacterial population.
Soil Sci., 91, 291-298.

- 87 - STEEL K.J. and H.E. ROSS, 1963. - Survival of freeze dried bacterial cultures.
J. Appl. Bact., 26, 370-375.
- 88 - STEINBORN J. and R.J. ROUGHLEY, 1974. - Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants.
J. Appl. Bact., 37, 93.
- 89 - STEINBORN J. and R.J. ROUGHLEY, 1975. - Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium* ssp. in broth and peat culture.
J. Appl. Bact., 39, 133-138.
- 90 - STRONG D.H., E.F. FOSTER and C.L. DUNCAN, 1970. - Influence of water activity on the growth of *Clostridium perfringens*.
Appl. Microbiol., 19, 980-987.
- 91 - SUSLOW T.V. and M.N. SCHROTH, 1981. - Bacterial culture preservation in frozen and dry-film Methylcellulose.
Appl. Environ. Microbiol., 42, 872-877.
- 92 - SUTHERLAND I.W., 1972. - *Advance in Microbiol. Physiology*, 8, 143-213.
- 93 - TANAKA Y., M. YOH, Y. TAKEDA and T. MIWATANI, 1979. - Induction of mutation in *Escherichia coli* by freeze drying.
Appl. Environ. Microbiol., 37, 369-372.
- 94 - TEMPEST D.W. and J.L. MEER, 1970. - Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools.
J. Gen. Microbiol., 64, 171-185.
- 95 - TU J.C., 1981. - Effect of salinity on *Rhizobium* -root- hair interaction, nodulation and growth of Soybean.
Can. J. Plant Sci., 61, 231-239.
- 96 - UPCHURCH R.G. and G.H. ELKAN, 1977. - Comparison of colony morphology, salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*.
Can. J. Microbiol., 23, 1118-1122.

- 97 - VINCENT J.M., J.A. THOMPSON and K. O. DONOVAN, 1962. - Death of root-nodule bacteria on drying.
Aust. J. Agric. Res., 13, 258-270.
- 98 - WEBB S.J., 1961. - Factors affecting the viability of air-borne bacteria : the effect of desiccation on some metabolic systems of *Escherichia coli*.
Can. J. Microbiol., 7, 621-632.
- 99 - WEBB S.J., 1964. - Bound water, metabolites and genetic continuity.
Nature, 203, 374-377.
- 100 - WEBB S.J. and M.D. DUMASIA, 1967. - The induction of lambda prophages by controlled desiccation.
Can. J. Microbiol., 13, 33-43.
- 101 - WEBB S.J., 1967. - The influence of oxygen and inositol on the survival of semi-dried microorganisms.
Can. J. Microbiol., 13, 733-742.
- 102 - WEBB S.J., 1967. - Mutation of bacterial cells by controlled desiccation.
Nature, 213, 1137-1139.
- 103 - WEBB S.J. and J.L. WALKER, 1968. - The effect of mutation and nucleic acid base analogues on the sensitivity of *E. coli* to partial dehydration.
Can. J. Microbiol., 14, 557-563.
- 104 - WILKINSON J.F., 1958. - The extracellular polysaccharides of bacteria.
Bact. Rev., 22, 46-73.
- 105 - WILLIAMS D.L. and P.H. CALCOTT, 1982. - Role of DNA repair genes and an R plasmid in conferring cryoresistance on *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Gen. Microbiol., 128, 215-218.

- 106 - WINTER E. and A. LÄUCHLI, 1982. - Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. I - Comparison of the salt response of *T. alexandrinum* and *T. pratense*.
Aust. J. Plant Physiol., 9, 221-226.
- 107 - YANCEY P.H., M.E. CLARK, S.C. HAND, R.D. BOWLUS and G.N. SOMERO, 1982. - Living with water stress : Evolution of osmolyte systems.
Science, 217, 1214-1222.
- 108 - YELTON M.M., S.S. YANG, S.A. EDIE and S.T. LIM, 1983. - Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*.
J. Gen. Microbiol., 129, 1537-1547.
- 109 - YONG F.M., K.H. LEE and H.A. WONG, 1982. - Modification to Lambert and Neish's method of glycerol determination.
J. Biochem. Biophys. Meth., 6, 115-118.
- 110 - ZIKMANIS P.B., L.P. AUZINA, S.I. AUZANE and M.J. BEKER, 1982. - Relationship between the fatty acid composition of lipids and the viability of dried yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 100-103.

