

ORDRE : 417

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE-FLANDRES ARTOIS

50376
1987
339

50376
1987
339

THESE

pour l'obtention du grade de DOCTEUR INGENIEUR

Mention : Biologie et Physiologie végétales
Option Microbiologie

par

MOSCHETTO Nathalie

Déshydratation de Bradyrhizobium
Japonicum : applications à la
production d'inoculum secs et à
l'enrobage de semences de soja



Présentée le 4 Décembre 1987 devant le jury composé de :

Président : M. J. GUILLAUME, Professeur, USTLFA.
Rapporteur : M. R. TAILLIEZ, Professeur, USTLFA.
Membres : M. M. BONIFACE, Professeur, faculté de pharmacie, Lille
M. O. CERF, Directeur de recherche INRA, Massy
: M. F. CHARPENTIER, Directeur Soc. Recherches TCCO, Montauban
M. G. CUVELLIER, Maître assistant, ENSIA, Villeneuve d'Ascq.

SCD LILLE 1



D 030 322379 6

50376
1987
339

50376
1987
339



Je dédie ce travail à mes parents en témoignage de ma reconnaissance, à Armand et David pour les moments inoubliables que nous passons ensemble.

REMERCIEMENTS .

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois sous la direction scientifique de M. le Professeur J. GUILLAUME. Je tiens à lui exprimer ma sincère gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée et l'intérêt qu'il a porté à cette étude.

Que M. le Professeur R. TAILLIEZ soit assuré de ma profonde reconnaissance pour son aide précieuse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail. Je tiens tout particulièrement à le remercier d'avoir consacré du temps à la lecture attentive de ce document et d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

La collaboration et l'intérêt portés à cette recherche par Monsieur F. CHARPENTIER, Directeur de la Société Recherches Tourneurs Grandes Cultures Obtention ont été précieux dans la réalisation de ce travail. Je tiens à le remercier d'accepter de juger ce mémoire de thèse.

Que Monsieur M. BONIFACE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille, soit sincèrement remercié d'avoir accepté avec amabilité de juger ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur O. CERF, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A. pour l'honneur qu'il me fait en participant au jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur G. CUVELLIER, Maître-Assistant à l'E.N.S.I.A.A, qui a bien voulu examiner ce mémoire.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société Claeys semences dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche. Que Monsieur C. QUANDALLE et toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Que Monsieur D. OCHIN soit remercié de sa gentillesse et de l'intérêt qu'il a toujours porté à la réalisation de cette recherche.

C'est avec plaisir que j'adresse toute mon affection et ma reconnaissance à Yves MOSCHETTO, mon père qui a grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse par ses précieux conseils, ses encouragements permanents et le prêt du matériel nécessaire à l'élaboration de ce document.

Je tiens aussi à remercier très sincèrement

- M. le Professeur TRAISNEL, pour ses conseils en matière d'enrobage.
- Melle Murièle VERGHOTE, qui a amicalement proposé de m'aider dans la dactylographie de ce mémoire et les membres du personnel de l'unité INSERM U279 qui se sont toujours montré très accueillants et serviables ;
- M. André DECO, pour son aide technique efficace ;
- L'ensemble du laboratoire de Microbiologie de Lille et tout particulièrement Max et Françoise BECHET, Viviane THINT, Sabine MARY pour leur sympathie et la chaleur de leur accueil.

Je désire enfin exprimer ma reconnaissance à Armand, David, ma famille et mes amis pour leur assistance et leur soutien moral et témoigner de mon amitié à Pascal, Marc et Marie Joe, Jean-François, Béatrice et tous mes amis de thèse avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

D'ORDRE : 417

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE-FLANDRES ARTOIS

THESE

pour l'obtention du grade de DOCTEUR INGENIEUR

Mention : Biologie et Physiologie végétales
Option Microbiologie

par

MOSCHETTO Nathalie

**Déshydratation de Bradyrhizobium
Japonicum : applications à la
production d'inoculum secs et à
l'enrobage de semences de soja**

Présentée le 4 Décembre 1987 devant le jury composé de :

Président : M. J. GUILLAUME, Professeur, USTLFA.
Rapporteur : M. R. TAILLIEZ, Professeur, USTLFA.
Membres : M. M. BONIFACE, Professeur, faculté de pharmacie, Lille
M. O. CERF, Directeur de recherche INRA, Massy
M. F. CHARPENTIER, Directeur Soc. Recherches TGCO, Montauban
M. G. CUVELLIER, Maître assistant, ENSIA, Villeneuve d'Ascq.

TITRE .

Déshydratation de Bradyrhizobium japonicum : applications à la production d'inoculums secs et à l'enrobage de semences de soja.

RESUME .

La réussite de l'inoculation artificielle du soja est primordiale dans les régions où cette culture est nouvellement implantée. Elle nécessite la sélection de souches adaptées à la plante-hôte et la production d'inoculums renfermant des quantités importantes de Bradyrhizobium japonicum.

La sélection de souches de Bradyrhizobium japonicum a été réalisée par rapport aux critères d'efficacité et de compétitivité, en employant la variété Mapple arrow, comme cultivar de référence du groupe 00. L'efficacité d'une trentaine de souches de Bradyrhizobium japonicum a été estimée. Les souches 3.2 et 3.32 ont été retenues puis testées en compétition avec d'autres souches.

Les paramètres optimaux de production cellulaire (la composition des milieux, le pH de culture...) ont été recherchés pour une production maximale de biomasse. Les conditions permettant la production d'inoculums déshydratés de forte concentration de Bradyrhizobium japonicum ont fait l'objet d'études particulières.

La conservation des inoculums produits a été étudiée en fonction de facteurs tels que l'humidité relative de conservation, la présence d'oxygène, la vitesse de déshydratation, la température, le rôle protecteur de différentes substances...

Enfin, la connaissance des paramètres permettant le maintien des potentialités vitales des cellules déshydratées a permis d'envisager des procédés de pelliculage dont les modalités favorisent le taux de survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine pendant de longues périodes.

TITLE.

Dessication of Bradyrhizobium japonicum : applications on the production of dried inoculants and on soybean seed pelleting.

ABSTRACT.

The success of artificial inoculation is of major importance in areas where this crop is newly implanted. It implies the selection of strains fitted to the host plant and the production of inoculants with high counts of Bradyrhizobium japonicum.

Strain selection of Bradyrhizobium japonicum has been carried out with respect to efficiency and competitiveness criteria, using "Mapple arrow" variety as reference cultivar belonging to 00 group. The efficiency of about 30 strains of Bradyrhizobium japonicum has been estimated. Strains 3.2 and 3.32 have been selected then tested in competition with other strains.

The optimal parameters of cellular production (growth media, pH) have been sought for a maximal production of biomass. The proceedings of drying enabling the production of dessicated inoculants with high concentration of Bradyrhizobium japonicum have been the subject of peculiar studies. Counts up to 10^{12} bacteria per gram could have been obtained.

The conservation of produced inoculants has been studied with respect to factors such as relative humidity, oxygen, protective role of different substances...

Lastly, the knowledge of parameters enabling the preservation of intact viable cells in dessicated state, enabled to consider coating processes, methods of wich improve survival rates of Bradyrhizobium japonicum on the seeds during long periods.

TABLE DES MATIERES.

GENERALITES .

A / IMPORTANCE DE L'INOCULATION ARTIFICIELLE DU SOJA.

I / IMPORTANCE DU CULTIVAR DANS LA REUSSITE DE L'INOCULATION DU SOJA..1

II / IMPORTANCE DES SOUCHES DANS LA REUSSITE DE L'INOCULATION DU SOJA.2

B / PREPARATION DES INOCULATS ET BACTERISATION DES SEMENCES.

I / PREPARATION ET CONSERVATION DES INOCULATS.....4

1 / Cultures sur agar.....4

2 / Cultures en milieu liquide.....4

3 / Inoculums sur supports solides.....6

3.1 / inoculums non déshydratés.....6

3.1.1 / nature des divers inoculats.

3.1.2 / fabrication des inoculats.

3.2 / inoculums déshydratés.....8

II / APPLICATION DE L'INOCULUM SUR LES SEMENCES.....9

C / FACTEURS PHYSIQUES INTERVENANT DANS L'IMPLANTATION ET LA SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.

I / SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.....11

1 / Persistence des "Rhizobiums" dans le sol : observations.....11

2 / Stimulation de "Rhizobium" dans la rhizosphere.....12

II / FACTEURS EDAPHIQUES INTERVENANT DANS L'IMPLANTATION DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.....12

1 / Pratiques culturales.....12

1.1 / influence des traitements chimiques appliqués aux cultures13

1.2 / incidence de l'apport d'amendements.....13

2 /	Caractéristiques chimiques du sol.....	14
2.1 /	incidence du pH du sol.....	14
2.2 /	incidence de certains ions.....	14
III /	FACTEURS PHYSIQUES INTERVENANT DANS L'IMPLANTATION ET LA SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.....	15
1 /	Incidence de la température.....	15
2 /	Incidence de la déshydratation.....	15
2.1 /	survie de "Rhizobium" dans des sols soumis à la déshydratation.....	16
2.2 /	Influence de diverses substances protectrices.....	17
2.3 /	Influence de l'eau résiduelle sur la survie de <u>Rhizobium</u> ..	18
2.4 /	Dommages causés par la déshydratation aux cellules.....	20
IV /	STRATEGIES DE RESISTANCE DES MICROORGANISMES A LEUR ENVIRONNEMENT.....	21
1 /	Production de polysaccharides extracellulaires.....	21
2 /	Diminution de la taille des cellules et formation de microcolonies	21
3 /	Accumulation de métabolites.....	22
	CONCLUSION ET BUTS DU TRAVAIL.....	24

MATERIELS ET METHODES.

I / SOUCHES BACTERIENNES ET VARIETES DE SOJA.....	26
1 / Origine des souches bactériennes.....	26
2 / Conservation des souches.....	26
3 / Matériel végétal.....	26
II / MILIEUX DE CULTURE.....	28
1 / Milieux de culture pour <u>Rhizobium</u>	28
2 / Milieu de culture pour plantules de soja.....	29
III / PRECULTURES ET CULTURES BACTERIENNES.....	29
1 / Cultures en tubes.....	29
2 / Cultures en Erlenmeyer.....	30
3 / Cultures en fermenteur.....	30
3.1 / Description du matériel.....	30
3.2 / Conduite de la fermentation.....	32
3.2.1 / préparation	
3.2.1 / précultures	
3.2.3 / fermentation	
IV / METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.....	33
1 / Mesure de la densité optique.....	33
2 / Dénombrement des cellules viables.....	33

V / METHODES D'ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE MESURE DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES DE "B. JAPONICUM" EN SERRE SUR CULTURES DE PLANTULES.....	34
1 / Cultures de plantules.....	34
1.1 / Stérilisation superficielle des graines.....	34
1.2 / Germination des graines.....	34
1.3 / Inoculation et culture de plantules.....	34
2 / Methodes de contrôle de l'infectivité et de mesure de l'efficience des souches.....	35
2.1 / Contrôle de l'infectivité.....	35
2.2 / Mesure de l'efficience.....	35
2.2.1 / protocole expérimental	
2.2.2 / méthodes de calcul	
2.3 / Poids sec des plantules.....	37
VI / METHODES D'ETUDE DE LA MOBILITE ET DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES.....	38
1 / Mobilité des souches.....	38
2 / Méthode d'étude de la compétitivité des souches.....	38
2.1 / Obtention de mutants spontanés.....	38
2.2 / Inoculation des plantules.....	38
2.3 / Méthodes d'isolement des souches à partir des nodules.....	39
2.3.1 / stérilisation superficielle des nodules	
2.3.2 / isolement des souches	
2.4 / Autres mesures effectuées.....	40
VII / METHODES D'ETUDE EXPERIMENTALE AU CHAMP.....	40
1 / Implantation des parcelles.....	40
2 / Notations effectuées.....	40
VIII / METHODES DE PREPARATION ET DE CONCENTRATION DE LA BIOMASSE.....	43
1 / Concentration de la biomasse.....	43
2 / Inclusion de microorganismes dans des gels d'alginate.....	43

IX / METHODES DE DESHYDRATATION DE LA BIOMASSE.....	44
1 / Déshydratation par atomisation.....	44
1.1 / Principe.....	44
1.2 / Conditions expérimentales.....	45
1.2.1 / description du matériel	
1.2.2 / protocole expérimental	
1.2.3 / mesures effectuées	
2 / Deshydratation en chambre de séchage.....	47
2.1 / Principe.....	47
2.2 / Description du matériel.....	48
3 / Méthodes de conservation de la biomasse.....	48
3.1 / Conditionnement des inoculats déshydratés.....	48
3.2 / Méthodes d'étude de la conservation des inoculats de	
<u>Bradyrhizobium japonicum</u> à différentes humidités relatives.....	48
3.2.1 / principe	
3.2.2 / solutions saturées de sels ou de solutés de faible poids	
moléculaire	
3.2.3 / protocole expérimental	
 X / BACTERISATION PAR ENROBAGE DE GRAINES.....	 52
1 / Inoculum tourbe.....	52
2 / Concentrés cellulaires.....	54
 XI / METHODES STATISTIQUES.....	 54

RESULTATS ET COMMENTAIRES

1ère PARTIE

"SELECTION DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM" ET MISE AU POINT DES PROCEDES CULTURAUX."

A / ETUDE ET SELECTION DES SOUCHES.

I / CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES A L'ETAT LIBRE.....	55
II / "SCREENING" DES SOUCHES EN SYMBIOSE : ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES.....	55
1 / A pH neutre.....	55
1.1 / Infectivité, nodulation.....	55
1.2 / Efficience des souches.....	57
1.3 / Commentaires.....	57
1.3.1 / Acidification du milieu	
1.3.2 / Limites de validité des résultats	
2 / A pH acide.....	61
2.1 / Infectivité des souches.....	61
2.2 / Efficience des souches.....	61
2.3 / Commentaires.....	63
III / ETUDE DE LA COMPETITION ENTRE SOUCHES.....	63
1 / Compétition de la souche 3.2 avec d'autres souches.....	64
2 / Compétition de la souche 3.32 avec d'autres souches.....	64
3 / Discussion, commentaires.....	67
3.1 / Reproductibilité.....	67
3.2 / Commentaires.....	67
3.3 / Conclusion.....	69

B / MISE AU POINT DES PARAMETRES DE CULTURE

I / ETUDE DE LA CROISSANCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM" DANS DIFFERENTS MILIEUX.....	70
1 / Cultures en tubes.....	70
2 / Cultures en Erlens.....	72
3 / Commentaires.....	72
II / INCIDENCE DE LA CONCENTRATION EN MANNITOL DANS LE MILIEU SUR LA CROISSANCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".....	74
III / INFLUENCE DU pH DU MILIEU DE CULTURE.....	77
IV / CHOIX D'UN ANTIMOUSSE.....	81
V / MISE AU POINT D'UN MILIEU SELECTIF POUR NUMERATIONS.....	83
1 / Concentrations minimales de chloramphénicol inhibitrices de la croissance de "Bradyrhizobium japonicum".....	84
2 / Autre agent sélectif.....	86
VI / CONSERVATION DES CONCENTRES CELLULAIRES.....	86

2ème PARTIE

"ETUDE DE LA CONSERVATION DES CELLULES EN VUE DE LA REALISATION D'INOCULATS"

A / ETUDE ET OPTIMISATION DES PARAMETRES DU RENDEMENT DE LA DESHYDRATATION PAR ATOMISATION.

I / INFLUENCE DU PRODUIT SUR LE RENDEMENT DE L'ATOMISATION.....	89
1 / Influence de la présence du milieu dans le support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation.....	89
2 / Influence du support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation.....	91

II / ETUDE DE LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM" A LA DESHYDRATATION.....93

- 1 / Influence du support de déshydratation.....93
- 2 / Influence de la sensibilité des souches à la déshydratation.....93
 - 2.1 / Influence de la souche.....93
 - 2.2 / Age physiologique des cellules.....95
 - 2.3 / Discussion.....95

B / ETUDE DE LA CONSERVATION DES CELLULES DESHYDRATEES

I / ESSAIS PRELIMINAIRES.....99

II / ROLE DE L'ATMOSPHERE DE CONSERVATION ET DU MILIEU DE CULTURE SUR LA VIABILITE DES INOCULUMS.....100

- 1 / Protocole experimental.....100
- 2 / Incidence du milieu de culture.....100
- 3 / Incidence de l'atmosphère de conservation.....105

III / ETUDE DE LA VIABILITE DES INOCULUMS EN CONSERVATION A HUMIDITE RELATIVE CONTROLEE.....111

- 1 / Influence de l'humidité relative de conservation.....112
 - 1.1 / Etude de la perte de viabilité d'inoculums de la souche 3.32 conservés sous différentes humidités relatives à 20°C.....113
 - 1.2 / Conservation d'inoculums de la souche 3.2.....121
 - 1.2.1 / étude de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 sous différentes humidités relatives à 20°C.
 - 1.2.2 / étude de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 sous différentes humidités relatives à 2°C.
 - 1.3 / Discussion.....130
- 2 / Comparaison de la viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à faible a_w et différentes températures de conservation.....134
- 3 / Influence du support et de l'addition de solutés, sur la conservation d'inoculums de la souche 3.2 à 2°C et humidité relative proche de 0...135

3ème PARTIE

"ESSAIS DE BACTERISATION PAR ENROBAGES DE GRAINES"

I / SCREENING DES AGENTS COLLANTS.....	144
1 / Protocole expérimental.....	144
2 / Résultats.....	145
2.1 / Enrobages réalisés avec la tourbe seule.....	145
2.1.1 / Modélisation des courbes de survie.	
2.1.2 / Influence et comparaison de 10 substances collantes appliquées à la bactérisation et à l'enrobage de semences de soja : méthode de Newman et Keuls.	
2.2 / Enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carboante de calcium.....	151
II / INFLUENCE DU SEL DE CALCIUM EMPLOYE POUR LA RETICULATION DES GELS D'ALGINATE SUR LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".....	154
1 / Protocole expérimental.....	154
2 / Résultats.....	154
III / INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE DE CONSERVATION SUR LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM", DANS DES ENROBAGES DE DIFFERENTES NATURES.	160
1 / Protocole experimental.....	160
2 / Résultats.....	161
IV / ESSAIS COMPLEMENTAIRES.....	164
1 / Autres substances protectrices.....	164
2 / Ajout d'un antifongique.....	167

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION.....197

ANNEXES : EXPERIMENTATIONS AU CHAMP

EXPERIMENTATION AU CHAMP 1985.

I / MODE D'IMPLANTATION.....172
II / PRODUCTION DES INOCULATS.....172
III / OBSERVATIONS EFFECTUEES.....178
IV / RESULTATS.....178

EXPERIMENTATION AU CHAMP 1986.

I / PRODUCTION DES INOCULATS.....189
II / IMPLANTATION DES PARCELLES.....189
III / OBSERVATIONS EFFECTUEES.....190
IV / RESULTATS.....195
CONCLUSION.....199

ANNEXES : CALCUL STATISTIQUE

CALCUL STATISTIQUE.....204

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE.....216

TABLE DES FIGURES.

Figure 1	31
Schéma du fermenteur Biolafitte de 20 l.	
Figure 2	42
Schéma des stades reproductifs repères du soja.	
Figure 3	45
Représentation schématique de la dessiccation par atomisation de produits organiques non cristallins.	
Figure 4	46
Schéma de l'alimentation en produit de l'atomiseur Büchi 190.	
Figure 5	46
Schéma de la circulation du produit et de l'air dans l'atomiseur Büchi.	
Figure 6	49
Schéma du sécheur de laboratoire Retsch.	
Figure 7	59
Photos des plantules de soja et du système racinaire des plantules cultivées en serre.	
Figure 8	65
Etude de la compétition de la souche 3.2 avec d'autres souches.	
Figure 9	66
Etude de la compétition de la souche 3.32 avec d'autres souches.	
Figure 10	68
Profils de compétition obtenus dans deux expérimentations indépendantes avec les souches 3.32 et 3.2.	
Figure 11	76
Influence de la concentration en mannitol sur le rendement cellulaire obtenu après 6 jours de culture en milieu TY estimé par la mesure de la densité optique.	
Figure 12	79
Influence du pH initial du milieu de culture, sur les concentrations cellulaires (exprimées en log du nombre de bactéries par ml) obtenues après 6 jours d'agitation à 29°C. Milieu TYm.	

Figure 13.....79

Influence du pH initial du milieu de culture, sur les concentrations cellulaires (exprimées en log du nombre de bactéries par ml) obtenues après 6 jours d'agitation à 29°C. Milieu YEM.

Figure 14.....101

Courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu TY ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

Figure 15.....101

Courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu ISWARAN ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

Figure 16.....102

Modélisation des courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu TY ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

Figure 17.....102

Modélisation des courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu ISWARAN ; support d'atomisation: lait (10 %), saccharose (2 %).

Figure 18.....111

Influence de la présence d'oxygène sur la conservation à 2°C et faible humidité relative, d'inoculums déshydratés à base de lait écrémé et de saccharose, des souches 3.2 et 3.32.

Figure 19.....115

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 9,5$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.

Figure 20.....116

Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 9,5$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.

Figure 21.....	119
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 11$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.	
Figure 22.....	120
Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 11$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.	
Figure 23.....	123
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.	
Figure 24.....	124
Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.	
Figure 25.....	128
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 10,8$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 2°C.	
Figure 26.....	129
Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 10,8$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 2°C.	
Figure 27.....	131
Isotherme d'adsorption d'un inoculum déshydraté à base de lait écrémé additionné de saccharose.	
Figure 28.....	137
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, à faible humidité relative pour différentes températures de conservation.	
Figure 29.....	140
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 à faible humidité relative et 2°C, dans des inoculums à base de maltodextrine ou de lait écrémé, additionnés ou non de saccharose ou de maltose. Résultats des numérations.	

Figure 30.....	140
Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 à faible humidité relative et 2°C, dans des inoculums à base de maltodextrine ou de lait écrémé, additionnés ou non de saccharose ou de maltose. Modélisation des courbes de survie.	
Figure 31.....	142 bis
Isothermes d'adsorption des inoculats à base de maltodextrine et de lait .	
Figure 32.....	179
Photos de parcelles et de plantes de l'expérimentation de Villeneuve d'Ascq 1985.	
Figure 33.....	176
Plan des parcelles de Villeneuve d'Ascq.	
Figure 34.....	177
Plan des parcelles de Pouy-Roquelaure.	

TABLE DES TABLEAUX.

Tableau I.....	27
Nomenclature et origine des souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .	
Tableau II.....	41
Description des stades reproductifs du soja.	
Tableau III.....	53
Activité de l'eau des solutions saturées pour trois températures d'après Bizot et coll., cités par Multon et coll.(124bis).	
Tableau IV.....	56
Caractéristiques physiologiques à l'état libre des souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .	
Tableau V.....	58
Caractéristiques symbiotiques des souches à pH neutre. Infectivité et efficacité.	
Tableau VI.....	62
Caractéristiques symbiotiques des souches à pH acide. Infectivité et efficacité.	
Tableau VIII.....	65
Etude de la compétition de la souche 3.2 avec d'autres souches.	
Tableau IX.....	66
Etude de la compétition de la souche 3.32 avec d'autres souches.	
Tableau X.....	68
Comparaison de l'analyse des nodules des inoculations réciproques des souches 3.2 et 3.32 réalisées lors de deux expérimentations indépendantes.	
Tableau XI.....	71
Comparaison de la croissance de "Bradyrhizobium japonicum" dans divers milieux de culture .	
Tableau XII.....	71
Comparaison de la croissance de "Bradyrhizobium japonicum" dans divers milieux de culture : Tableau d'analyse de la variance.	

Tableau XIII.....	73
Comparaison de la croissance de 4 souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> en milieux TY, TYm, et ISWARAN (pH initial 6,5) exprimée en log du nombre de cellules viables par ml.	
Tableau XIV.....	73
Comparaison de la croissance de 4 souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> en milieux TY, TYm, et ISWARAN (pH initial 6,5) : Tableau d'analyse de la variance.	
Tableau XV.....	75
Comparaison de la croissance de deux souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> en milieu TY additionné de différentes concentrations de mannitol.	
Tableau XVI.....	75
Comparaison de la croissance de deux souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> en milieu TY additionné de différentes concentrations de mannitol. Tableau d'analyse de la variance.	
Tableau XVII.....	78
Etude de la croissance de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> , après 6 jours d'agitation à 29°C en milieu TY et en milieu YEM à différents pH.	
Tableau XVIII.....	80
Etude de la croissance de quelques souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> à différents pH de culture. Calcul des sommes marginales.	
Tableau XIX.....	80
Etude de la croissance de quelques souches de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> à différents pH de culture. Tableau d'analyse de la variance.	
Tableau XX.....	82
Etude de la croissance de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> , en présence de différentes concentrations d'antimousse dans le milieu. Resultats observés après quatre jours de culture par mesure de la densité optique à 600 nm.	
Tableau XXI.....	82
Etude de la croissance de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> , en présence de différentes concentrations d'antimousse dans le milieu. Tableau d'analyse de la variance réalisé à partir des indices de croissance.	

Tableau XXII.....	85
Etude de la croissance de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> sur milieu YEM gélosé contenant différentes concentrations de chloramphénicol.	
Tableau XXIII.....	87
Etude de la conservation de concentrés cellulaires de la souche 3.2 en congélation : Résultats des numérations exprimés en log.	
Tableau XXIV.....	90
Influence de la présence du milieu de culture dans le support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation. Souche Bioprox.	
Tableau XXV.....	90
Influence de la présence du milieu de culture dans le support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation. Souche Bioprox. Analyse de la variance.	
Tableau XXVI.....	92
Rendements en matière sèche observés avec différents supports.	
Tableau XXVII.....	94
Etude de la survie à la déshydratation des souches 3.2, CB 1809 et Bioprox atomisées en présence de différents supports.	
Tableau XXVIII.....	98
Comparaison des taux de survie des souches 3.2 et 3.32 atomisées dans des conditions identiques, et tableau d'analyse de la variance.	
Tableau XXIX.....	103
Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote. Culture en milieu ISWARAN.	
Tableau XXX.....	104
Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote. Culture en milieu TYm.	
Tableau XXXbis.....	106
Comparaison de l'évolution des concentrations bactériennes au cours du temps, d'inoculums de la souche Bioprox confectionnés avec ou sans polysaccharides bactériens.	

Tableau XXXI.....	107
Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Conservation sous air. Cultures en milieu ISWARAN ou TYm.	
Tableau XXXII.....	108
Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche 3.32. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote.	
Tableau XXXIII.....	109
Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche 3.2. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote.	
Tableau XXXIV.....	114
Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 à différentes humidités relatives de conservation. Population initiale Y = 9,5.	
Tableau XXXV.....	118
Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 à différentes humidités relatives de conservation. Population initiale Y = 11,0	
Tableau XXXVI.....	122
Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes humidités relatives de conservation à 20°C. Population initiale Y = 11,7	
Tableau XXXVII.....	127
Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes humidités relatives de conservation à 2°C. Population initiale Y = 10,8	
Tableau XXXVIII.....	136
Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes températures de conservation et faible humidité relative. Population initiale Y = 10,8.	
Tableau XXXIX.....	139
Modélisation des courbes de survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> dans des inoculums additionnés de deux sucres différents.	

Tableau XL.....	141
Survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> dans des inoculums additionnés de deux sucres différents. Comparaison des coefficients de régression par la méthode de la plus petite amplitude significative.	
Tableau XLI.....	146
Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe seule. Etude de la survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> sur la graine. Conservation à + 6°C	
Tableau XLII.....	147
Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe seule. modélisation, recherche des modèles de régression. Conservation à + 6°C	
Tableau XLIII.....	148
Screening des agents collants, analyse de la variance.	
Tableau XLIV.....	150
Comparaison des enrobages réalisés avec 10 substances collantes : méthode de Newman et Keuls.	
Tableau XLV.....	152
Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carbonate de calcium. Etude de la survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> sur la graine, conservation à +6°C.	
Tableau XLVI.....	153
Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carbonate de calcium. Modélisation, recherche des modèles de régression.	
Tableau XLVII.....	155
Survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à +6°C.	
Tableau XLVIII.....	156
Modélisation des courbes de survie de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à +6°C.	

Tableau XLIX.....157
Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 6°C. Analyse de la variance

Tableau L.....158
Modélisation des courbes de survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 20°C.

Tableau LI.....159
Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 20°C. Analyse de la variance.

Tableau LII.....162
Influence de l'humidité relative de conservation, du mode d'application, et du temps sur la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine : conservation à 20°C.

Tableau LIII.....163
Influence de l'humidité relative de conservation, du mode d'application, et du temps sur la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine : tableau d'analyse de la variance.

Tableau LIV.....165
"Screening" des agents collants, essais complémentaires : enrobages réalisés avec inoculum sur tourbe. Etude de la survie de la souche G49 de Bradyrhizobium japonicum sur la graine, conservation à 6°C et à 20°C.

ANNEXES .

Tableau LV.....173
Nombre de Bradyrhizobium japonicum survivant dans les inoculats déterminé par numération (c.f.u.).

Tableau LVI.....174
Villeneuve d'Ascq : semis du 04/05/1985 ; liste des inoculations effectuées.

Tableau LVII.....175
Analyse de terre effectuée à Villeneuve d'Ascq ; 07/05/1985

Tableau LVIII.....	180 & 181
Résultats des parcelles expérimentales de Villeneuve d'Ascq 1985.	
Tableau LIX.....	183
Résultats expérimentaux des parcelles de Pouy-Roquelaure.	
Tableau LX.....	184
Résultats expérimentaux des parcelles de Coulommiers.	
Tableau LXbis.....	186 & 187
Rendements observés à 14%, sur les parcelles expérimentales des trois stations.	
Tableau LXI.....	191
Désignation des parcelles et population bactérienne dans les inoculats.	
Tableau LXII.....	192
Résultats expérimentaux de l'essai n°1 réalisé à Villeneuve d'Ascq.	
Tableau LXIII.....	193
Résultats expérimentaux de l'essai n°2 réalisé à Villeneuve d'Ascq.	
Tableau LXIV.....	194
Résultats expérimentaux des parcelles de Coulommiers 1986.	

TABLE DES ABBREVIATIONS.

NS	: Non significatif
*	: Significatif avec un risque d'erreur $\alpha = 5 \%$
**	: Significatif avec un risque d'erreur $\alpha = 1 \%$
***	: Significatif avec un risque d'erreur $\alpha = 0,1 \%$
t	: Variable de Student
t_{obs}	: Valeur observée de t
$t_{1-\alpha/2}$: Valeur théorique de t
F	: Variable de Snedecor
F_{obs}	: Valeur observée de F
H_{obs}	: Valeur observée du test de Hartley
$H_{1-\alpha}$: Valeur théorique du test de Hartley
SCE	: Somme des carrés des écarts
CM	: Carré moyen
CMr	: Carré moyen résiduel
b	: Valeur observée des coefficients de régression

GENERALITES

A / IMPORTANCE DE L'INOCULATION ARTIFICIELLE DU SOJA.

Les augmentations de rendements des espèces cultivées nécessitent des apports azotés importants. Ces apports peuvent être assurés de deux manières, soit par voie minérale (engrais azotés dont le coût est très élevé), soit par la culture d'espèces vivant en symbiose, ou en association étroite, avec des microorganismes fixateurs d'azote atmosphérique.

La littérature scientifique évoquant la fixation d'azote par les différents systèmes symbiotiques est vieille de plus de cent ans. L'importance de la famille des légumineuses, tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif en a fait un sujet d'étude de prédilection et la symbiose Rhizobium-légumineuse est certainement la mieux connue à ce jour.

Bien que de culture récente, les oléoprotéagineux (tel que le soja, Glycine max L.Merr.), ont un intérêt considérable en tant que source majeure de protéines (38% à 45% dans la graine) pour l'alimentation animale et humaine et en tant que source d'huile (17% à 22% dans la graine). Sa culture est restée longtemps le monopole de quelques pays tels que les U.S.A., la Chine, le Brésil et l'U.R.S.S.. L'importance de cette légumineuse et les progrès considérables réalisés dans l'obtention de nouvelles variétés, à savoir l'accroissement de précocité (groupe 000), de rendement, stérilité mâle (54,83)..., ont contribué à élargir sa culture à de nouvelles zones géographiques. Le succès de cette implantation est assujéti à la présence du microsymbionte spécifique. Or, la distribution des Rhizobiums dans le sol est étroitement liée à la présence de la plante-hôte (110). Le choix des souches et des cultivars est donc à étudier sérieusement, notamment en ce qui concerne la compatibilité des deux symbiontes.

I / IMPORTANCE DU CULTIVAR DANS LA REUSSITE DE L'INOCULATION.

Le soja exige la présence de Rhizobiums très spécifiques : le Bradyrhizobium japonicum, généralement absent des nouvelles zones de culture. Si il en existe dans le sol, ils induisent une faible nodulation (2, 128) surtout si le cultivar est d'origine lointaine.

Cette spécificité est plus ou moins étroite suivant les cultivars. Par exemple (128), des cultivars américains introduits en Afrique ("Jupiter", "Bossier") nécessitent impérativement une inoculation, alors que l'inoculation des graines des cultivars asiatiques ("Orba", "TGM686", "Malayan") n'améliore pas les rendements de ces variétés qui présentent une nodulation très satisfaisante avec les espèces de Rhizobium indigènes.

En outre, des caractéristiques symbiotiques particulières sous contrôle génétique (49, 52, 54) ont été mises en évidence. La présence de certains allèles dans le génôme est responsable de l'échec de la nodulation:

Rj2 : nodulation déficiente avec les souches du groupe 122 et c1

Rj4 : nodulation déficiente avec la souche USDA61 de Beltsville

rj1/rj1 : nodulation affectée avec de très nombreuses souches de Bradyrhizobium japonicum (50, 53, 128).

Il est donc très important de tenir compte de la présence ou de l'absence de ces allèles dans le choix des variétés et des souches introduites.

La compatibilité entre souches et cultivars intervient ultérieurement dans l'efficacité de la symbiose établie. Elle se traduit par une fixation d'azote atmosphérique variable, fonction à la fois de la souche et du cultivar sur lequel elle nodule (48, 96), ainsi que de facteurs abiotiques (climatiques et édaphiques)(72)

II / IMPORTANCE DES SOUCHES DANS LA REUSSITE DE L'INOCULATION

Le choix d'une souche doit tout d'abord tenir compte des facteurs abiotiques rencontrés.

- du climat : en effet, les souches isolées de zones tempérées ont une activité nitrogénasique optimale à des températures plus basses que celles isolées sous climat tropical (73). De même l'aptitude à noduler à températures élevées est une caractéristique marginale des souches (104).

- des caractéristiques du sol, notamment du pH vis à vis duquel la réponse des différentes espèces et souches de Rhizobium est très

variable (89, 139). La présence de quantités importantes d'ions toxiques (par ex. l'Aluminium) peut également compromettre le succès de l'implantation des deux symbiotes ou diminuer significativement les rendements (6, 14, 123, 159). De même des quantités ou une disponibilité insuffisantes de minéraux ou métaux (Ni, Cu, Fe, Mn) dont dépend l'activité de certains enzymes (uréase et nitrogénase) limite les rendements (38, 159). Il est donc important que ces facteurs soient maîtrisés avant l'implantation d'une culture de soja.

En cas d'absence de Rhizobium spécifique, l'introduction de souches à forte efficacité avec les variétés cultivées est nécessaire. Ceci suppose une sélection préalable de Rhizobiums adaptés aux variétés cultivées, et présentant si possible une activité nitrogénasique élevée sur plusieurs variétés.

L'inoculation de cultures réalisées dans des zones géographiques pourvues de Rhizobiums spécifiques est plus délicate et souvent infructueuse (59). Elle est cependant nécessaire car l'efficacité des souches indigènes est en général peu élevée (144, 149). Outre l'efficacité des souches, il est impératif de tenir compte de la compétitivité des souches introduites par rapport aux souches indigènes, ces dernières étant en général particulièrement bien adaptées à leur environnement. Cette donnée qui conditionne les chances de succès de la nodulation des plantes par la souche introduite, est indépendante de l'efficacité des souches (77). Des investigations récentes ont montré que la compétitivité des souches est en relation étroite avec le groupe de précocité auquel appartiennent les variétés de soja (72). De plus les profils de compétition entre souches dépendent de facteurs abiotiques tels que la nature du sol (101). Il est cependant possible de s'affranchir de ces contraintes par des techniques de repiquage. KOSSLACK et al ont montré qu'une préexposition des racines de soja à une souche favorise la colonisation des racines et permet à la souche introduite d'occuper jusqu'à plus de 95 % des nodules, suivant les temps de préexposition (100, 101). Cette technique n'est cependant envisageable qu'à condition que le surcoût entraîné soit compensé par des gains de rendements importants.

MYTTON suggère une sélection conjointe des deux symbiontes qui porterait aussi bien sur des critères d'efficience et de compatibilité que sur les aptitudes compétitives du Rhizobium par rapport aux autres microorganismes du sol (mobilité, chimiotactisme, multiplication dans la rhizosphère...) (64, 127, 136). Ces différents critères conditionnent le succès de la nodulation.

B / PREPARATION DES INOCULATS ET BACTERISATION DES SEMENCES.

Le deuxième aspect qui contribue au succès de l'implantation des Rhizobiums dépend de la réussite de l'inoculation. De nombreux facteurs peuvent être responsables de l'échec de l'inoculation artificielle des légumineuses.

- l'inoculum doit contenir un nombre élevé de Rhizobiums.
- les conditions physiques rencontrées dans le sol (pH, températures, humidité, nature) ne doivent pas être incompatibles avec la survie de Rhizobium jusqu'à l'émergence des racines, ni inhiber la nodulation.
- de même, certains traitements appliqués aux semences (fongicides, insecticides, désherbants) sont toxiques pour les Rhizobiums.
- l'implantation des Rhizobiums peut également être entravée par la prédation et la compétition exercées par les microorganismes indigènes.

I / PREPARATION ET CONSERVATION DES INOCULATS.

1 / CULTURES SUR AGAR.

Les premières formes d'inoculum appliqués à la bactériation des semences de légumineuses, consistent en des cultures effectuées sur gélatine ou agar, appliquées soit directement sur la graine soit après mélange au sol et épandage dans le champ. Cette pratique fut vite abandonnée en raison de ces piètres résultats (41).

2 / CULTURES EN MILIEU LIQUIDE.

Des cultures en phase stationnaire de croissance sont surtout employées de façon marginale. En effet, la grande sensibilité de ce type d'inoculum aux températures élevées (mortalité totale à 40°C)(125), et le déclin rapide de la viabilité des cellules en milieu liquide non

agité (41), a limité son emploi aux régions tempérées et aux pays où la distribution est bien organisée (Hollande).

Meade et al. suggèrent l'emploi de concentrés cellulaires congelés de Rhizobium leguminosarum pour l'inoculation du pois, soit pour un emploi direct soit pour la confection d'inoculums sur tourbe ou de granulés (121). Il souligne l'importance de la longévité d'un tel inoculum par rapport aux autres préparations communément employées et la standardisation possible des préparations commerciales. Des populations de 10^{11} bactéries par ml subsistent après 76 semaines de conservation à -20°C .

D'autres proposent l'emploi d'inoculum à base d'eau pure (33). En effet les auteurs ont montré une prolifération cellulaire constante à 10^7 bactéries / ml sans qu'il y ait altération des propriétés symbiotiques des Rhizobiums. L'intérêt principal d'une telle méthode réside dans son faible coût de production, et la possibilité de maintenir sur de longues périodes des inoculums stables (souche et concentration cellulaire) pouvant servir pour les précultures industrielles.

Ces deux types de préparations restent d'un emploi limité en raison des contraintes de stockage (température, stérilité), et de manipulations au moment du semis, les formes liquides ne pouvant en aucun cas être mises en contact avec les herbicides, fongicides et insecticides.

Une autre préparation liquide est constituée d'une suspension de Rhizobiums dans un support à base d'huile. L'inoculation peut être réalisée avec des cellules déshydratées (102). Cette forme d'inoculum est commercialisée aux Etats-Unis. Elle permet l'adjonction de molybdène et de fongicides, tout en préservant la viabilité de Bradyrhizobium japonicum (59). En outre, cette forme d'inoculum est plus apte à maintenir la viabilité des cellules, en cas d'exposition temporaire à des températures élevées, ce qui présente un intérêt pour son emploi en zone aride.

3 / INOCULATS SUR SUPPORTS SOLIDES.

3.1 / Inoculats non déshydratés.

3.1.1 / Nature des divers inoculats.

La grande majorité de ces inoculum est réalisée à partir de tourbes pulvérisées ou compactées en granulés. Elles constituent à l'heure actuelle la majorité des préparations commerciales car elle sont un des meilleurs supports pour la production d'inoculum (59, 80, 171). Cependant son emploi est conditionné par sa présence sur les lieux de production. Or la qualité de la tourbe est très variable (163) surtout sous climat tropical. Certains gisements sont souvent impropres à son utilisation (152). Des études sont donc en général réalisées afin de connaître l'aptitude des Rhizobiums à proliférer et à survivre dans les tourbes avant exploitation des gisements (1, 80, 163).

Dans l'hypothèse où il n'y a pas de tourbes propres à la confection d'inoculum, d'autres supports peuvent être employés avec succès. Des inoculum à base de terre peuvent utilement remplacer la tourbe (30). De même, des études comparatives ont souligné les excellents résultats obtenus avec des inoculum préparés avec la mélasse additionnée de charbon de bois, ou du fumier additionné de charbon de bois (177). D'autres auteurs ont montré l'emploi possible de matières premières très diverses telles que de la lignite (32, 93, 102, 177), le mélange Bentonite-charbon (47), la poudre de cellulose (147), les boues de filtration (145) ou des résidus végétaux divers (177). Leur utilisation est en général justifiée par l'abondance de ces substances sur les lieux de production et leur faibles prix de revient.

3.1.2 / Fabrication des inoculats.

La réalisation à proprement parler des inoculum nécessite plusieurs étapes :

- broyage et neutralisation du support suivi ou non d'une granulation ;
- conditionnement et stérilisation ;
- inoculation du support ;
- incubation ;
- contrôle et distribution.

Chacune des étapes est importante et des négligences peuvent être à l'origine d'une perte importante de viabilité de l'inoculum. Nombreuses sont les études qui soulignent l'importance de ces contraintes dans la production d'inoculum de bonne qualité :

Le conditionnement le plus courant est constitué de sacs de polypropylène ou de polyéthylène suivant les traitements thermiques appliqués. Les propriétés d'échanges gazeux des sacs sont déterminantes sur la croissance de Rhizobium. La porosité du film doit assurer un approvisionnement en oxygène suffisant pour le développement des cellules. Roughley a montré qu'une capacité d'échange de 6 % est suffisante et que les films ayant une capacité d'échange supérieure se prêtent en général mal aux manipulations (151).

Plusieurs méthodes de stérilisation sont employées : stérilisation par l'oxyde d'éthylène, autoclavage, irradiation. La première méthode donne des résultats variables, car il est nécessaire que le gaz pénètre puis soit éliminé complètement de la tourbe (41). Certains auteurs préfèrent la stérilisation par irradiation (153), d'autres montrent que autoclavage et irradiation sont équivalents (163, 172). Par contre l'absence de stérilisation est particulièrement néfaste à la prolifération des Rhizobiums, puisque de nombreux contaminants se développent simultanément. Ainsi des écarts de 1 à 1000 ont été mis en évidence, entre les concentrations en Rhizobium d'inoculums commercialisés aux U.S.A., suivant que l'inoculum soit monoxénique ou non. Certaines préparations vendues se sont même montrées incapables d'induire la formation de nodosités sur le soja, la concentration en Bradyrhizobium japonicum étant insuffisante (80).

L'inoculation du support suppose une production préalable de biomasse. La production est généralement effectuée en fermenteurs contenant un milieu à base d'extrait de levure ou autres milieux empiriques (40, 41). Des précautions particulières doivent être prises afin d'assurer la pureté des cultures en fermenteurs. Des fractions aliquotes des cultures sont ensuite utilisées pour l'ensemencement des tourbes. Cette étape délicate doit garantir le maintien de la pureté des inoculums. Somasegaran et al montrent que le coût de cette opération

peut être fortement diminué en inoculant les tourbes par une culture diluée ; cette façon de procéder modifie peu les durées d'incubation des inoculums sur tourbes et augmente les capacités de production d'un fermenteur (163, 164).

La multiplication des Rhizobiums est en général assurée par entreposage des préparations à 29°C. La période optimale d'utilisation se situe environ quatre à six semaines après ensemencement du support. Materon et al insistent sur l'importance de cette période d'incubation en terme de maturité de l'inoculum, le respect de cette étape conditionnant les taux de survie des Rhizobiums dans les heures qui suivent la bactérisation des graines (119). Après cette période de prolifération, les inoculums doivent être stockés à basse température ; la mortalité des cellules croît en fonction de l'élévation de température (1, 41, 102, 125, 165, 177). De même, lors du transport et de la distribution, il est nécessaire qu'une température de 40°C ne soit pas dépassée (125, 165). Les emballages doivent pouvoir d'autre part limiter les pertes d'eau néfastes à la survie de Rhizobium (30).

3.2 / Inoculums déshydratés.

D'autres formulations existent : elles consistent en des granulés appliqués dans le rang au moment du semis ; ils peuvent être à base de tourbe (12), ou constitués de matériaux poreux (sulfate de calcium, vermiculite, pumice...) imprégnés de la suspension bactérienne puis déshydratés (68). Elles présentent l'avantage d'une utilisation facile en diminuant les manipulations préalables au semis (bactérisation des graines) ; de plus les formes déshydratées ne nécessitent pas un stockage en conditions stériles, la faible disponibilité de l'eau dans ces inoculums prévenant tout développement ultérieur de contaminants. Des préparations commerciales d'inoculum déshydraté sous forme de poudre ou de granulés, à base de polyacrylamide ou de biopolymères sont actuellement proposées (57, 108, 124). Elles garantissent une longévité importante des inoculums, ont un faible encombrement stérique, et supportent des températures élevées.(91, 92).

II / APPLICATION DE L'INOCULUM SUR LES GRAINES.

Trois méthodes sont employées avec plus ou moins de succès pour la bactérisation des légumineuses (16).

- mise en contact de l'inoculum et de la graine au moment du semis.
- application de l'inoculum sur le sol indépendamment du semis.
- préinoculation par enrobages de graines.

Toutes ces méthodes doivent permettre d'apporter un minimum de 10^5 Rhizobiums par graine pour le soja, car pour les quantités inférieures la nodulation est insuffisante (80, 161).

Les techniques les plus couramment employées consistent à inoculer les graines au moment du semis soit :

- par mélange direct de l'inoculum sur la graine : par cette méthode les quantités d'inoculum par graine sont en général insuffisantes. Aussi cette technique est très peu employée, et reste limitée principalement aux inoculums liquides de forte concentration bactérienne pour les essais de laboratoire ou de serre.

- par mise en suspension de l'inoculum dans l'eau ou dans une solution contenant un adhésif afin d'accroître les quantités d'inoculum fixées. Des gommes, des sucres, des dérivés de la cellulose présentent un intérêt à cette fin (16, 42, 65).

- Par épandage de l'inoculum sur le sol, soit uniformément, soit dans le rang de semis des graines. Les inoculums à base de tourbe, les granulés, les poudres, se prêtent à ces techniques. Cette méthode se révèle dans certains cas, supérieure à la précédente car elle permet d'augmenter le nombre de bactéries apportées par graine, ce qui est souvent nécessaire dans les sols pourvus de Rhizobiums indigènes. De plus, cette technique présente un intérêt pour les cultures de légumineuses à germination épigée (soja), dont la cuticule sort de terre lors de l'émergence des cotylédons.

L'autre méthode à laquelle voudraient arriver de nombreux producteurs de semences, consiste à distribuer des graines préalablement

bactérisées par toute technique d'enrobage. L'objectif principal des distributeurs de semences, est de maintenir des quantités importantes de bactéries sur les graines, afin qu'au moment de la commercialisation, la quantité de Rhizobium soit au même niveau que si les graines venaient d'être enrobées par les techniques classiques.

Dans la pratique deux méthodes ont été testées à grand échelle avec un succès très variable :

- L'imprégnation des graines consiste à immerger les semences dans la suspension bactérienne puis à les placer sous vide afin de faire pénétrer les Rhizobiums sous la cuticule. Par cette méthode toutes les graines ne sont pas bactérisées et le nombre de bactéries éventuellement présentes reste en général assez faible (16).

- Le pelliculage des semences par une ou plusieurs étapes a été largement mis en oeuvre. De très nombreuses substances sont utilisées. En général, adhésif, inoculum, et substances minérales entrent dans la composition de ces enrobages. Les supports à base d'argile ou plus fréquemment de minéraux calcaires sont utilisés dans les sols acides. Les résultats souvent décevants (17) ont grandement contribué à la limitation du développement de ces techniques qui restent encore aujourd'hui d'un emploi marginal.

Les études spécifiques visant à déterminer les causes de ces échecs, et à améliorer les protocoles de préinoculation sont peu nombreuses et restent très limitées ; les facteurs pouvant nuire à la survie de Rhizobium sont souvent analysés individuellement. Certains auteurs ont montré l'effet des températures sur la survie sur la graine de Bradyrhizobium japonicum, mais l'étude n'est réalisée qu'à une seule humidité relative de stockage (42) ; dans ce cas particulier, les quantités de bactéries au bout de trois semaines sont au mieux égales à 14% de la quantité initiale.

C / FACTEURS INFLUENCANT LA SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.

I / SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.

1 / PERSISTENCE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL : OBSERVATIONS.

Les premières observations de la persistance des Rhizobiums dans le sol ont révélé des capacités de survie variables à l'intérieur d'un même groupe et entre les différents groupes d'inoculation. Nutman a reporté que des sols, dans lesquels aucune culture de légumineuses n'avait été faite depuis plus d'un siècle contenaient en abondance des souches efficaces de Rhizobium trifolii et leguminosarum et dans une moindre mesure de Rhizobium lupini et meliloti (134).

Norman a montré que des Rhizobiums japonicum à croissance lente étaient à même de survivre pendant 24 ans dans des sols non plantés en soja, et que l'inoculation des cultures après cette période était inutile en terme de rendements puisque les Rhizobiums indigènes induisaient une nodulation très satisfaisante (13).

Ultérieurement, Weaver a montré par l'étude de 52 sols d'Iowa, que la présence de quantités importantes de Rhizobium japonicum était directement liée à la culture du soja dans les sols mais indépendante de la date à laquelle les dernières plantations avaient été effectuées (133). Dowdle montre lors d'une étude de la population bactérienne de sols chinois, que les sols ayant portés du soja, contiennent des Rhizobiums japonicum à croissance lente (Bradyrhizobium japonicum (90)) et à croissance rapide, alors que ces derniers sont totalement absents des sols dans lesquels aucune culture de soja n'avait été faite. Seules des souches de Bradyrhizobium japonicum existent dans ces sols.

De même la survie de Bradyrhizobium japonicum est tout à fait satisfaisante en absence de la plante-hôte, suite à son introduction dans des sols français. Crozat et al montrent que la population de la bactérie atteint un plateau (> 1000 Rhizobiums/g sol sec) au bout de trois ans (après 5 ans la concentration en Rhizobiums est identique) (35). Par contre, il est difficile de maintenir des souches nouvellement introduites dans un sol normalement pourvu de Rhizobiums spécifiques.

Dans le cas du soja, le bénéfice de l'inoculation est rapidement perdu, en termes d'occupation des nodules par la souche introduite (86).

Toutes les études menées soulignent le fait que Bradyrhizobium japonicum est apte à survivre sur de longues périodes en absence de la plante-hôte, bien qu'il ne soit pas possible de prédire le comportement spécifique d'une souche dans un type de sol donné.

2 / STIMULATION DE "RHIZOBIUM" DANS LA RHIZOSPHERE.

De nombreux auteurs ont montré l'importance de la présence d'une couverture végétale sur la prolifération bactérienne dans le sol (25, 114).

Tuzimura (179) remarque que Rhizobium trifolii prolifère en présence de trèfle, de luzerne ou de tomate alors que la multiplication de Rhizobium meliloti n'est stimulée que par la présence de luzerne dans un sol volcanique. De même Rhizobium phaseoli est fortement stimulé par la présence de la plante-hôte ou du soja (149). Cependant, la stimulation de la croissance des Rhizobiums et de la réponse aux exsudats racinaires produits par diverses espèces dépend de la nature du sol ; dans un sol argileux Rhizobium meliloti peut être stimulé par certaines graminées (179).

La formation de nodules conditionne également l'implantation des souches. Kuykendall montre par l'inoculation de lignées isogéniques de soja dans un sol dépourvu de Bradyrhizobium japonicum, que les Rhizobiums sont moins nombreux l'année suivante, dans les parcelles ayant porté le mutant déficient pour la nodulation. Les résultats suggèrent que les nodules libèreraient des quantités importantes de bactéries viables après leur dégénérescence (103).

II / FACTEURS EDAPHIQUES INTERVENANT DANS L'IMPLANTATION DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.

1 / PRATIQUES CULTURALES.

Les pratiques culturales telles que les traitements chimiques, l'apport d'amendements divers ont un effet déterminant sur l'implantation des Rhizobiums dans le sol..

1.1 / Influence des traitements chimiques appliqués aux cultures.

La protection des espèces cultivées contre les pathogènes passe par l'emploi de fongicides et de pesticides. Ces substances sont communément appliquées aux semences ou administrées par pulvérisation ou poudrage des plantes. Les données de la littérature suggèrent que l'effet de ces traitements est variable suivant les espèces de Rhizobium (71). Les fongicides organo-mercuriels induisent une très forte mortalité des Rhizobiums (55). Chamber et Montes soulignent l'effet néfaste du Thiram (TMTD) et du captan sur la nodulation du soja, alors que le PCNB et le Benomyl n'ont que peu d'effet sur la survie des bactéries (28, 175). Diatloff ne détecte aucune inhibition de développement, ni de baisse d'activité nitrogénasique des nodules de soja par l'emploi de fongicides systémiques (Metalaxyl, Benalaxyl)(55).

Les exemples sont nombreux et les résultats des données expérimentales de cultures au champ ne concordent pas systématiquement avec les données d'étude de toxicité faites in vitro (71). Une des voies retenues par de nombreux auteurs consiste à isoler et employer des souches de Rhizobium résistantes au produit appliqué aux semences (79bis, 81bis, 109, 154). L'intérêt de telles méthodes est évident. L'emploi de mutants peut même dans certains cas favoriser l'implantation des Rhizobiums. Hossain et Alexander ont montré que l'utilisation de Benomyl, de streptomycine et de souches résistantes à ces substances permet d'augmenter significativement le nombre de Rhizobiums, dans la rhizosphère après l'inoculation. Ces produits agissent principalement en diminuant la prédation par les protozoaires qui sont inhibés, et en supprimant une fraction de la population des compétiteurs et antagonistes bactériens (81bis, 109).

1.2 / Incidence de l'apport d'amendements.

Des études plus anciennes soulignent l'incidence de l'incorporation d'amendements et de fumures sur la prolifération des Rhizobiums dans le sol. Walker et Brown notent un accroissement du nombre de Rhizobium trifolii d'un facteur 100 à 1000 par addition de fumier, de phosphate de roche (pH 6,9) dans un sol acide (112, 183).

L'incorporation d'amendements calcaires tels que la calcite et la dolomite permet d'implanter du soja dans des sols très acides (Brésil). Les auteurs montrent que ces amendements apportent du Mg échangeable, qui fait cruellement défaut dans la plupart de ces sols, augmentent le pH du sol, et diminuent la toxicité de l'aluminium (4, 123, 159). On ne sait cependant pas si Bradyrhizobium japonicum peut survivre dans de tels sols en absence de la plante hôte.

2 / CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU SOL.

2.1 / Incidence du pH du sol.

Les premières investigations concernant l'influence du pH du sol sur la survie des Rhizobium remontent au début du siècle. La synthèse de ces différentes données expérimentales (89, 112, 139) a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques. Les pH extrêmes de croissance de Rhizobium sont très variables entre groupes d'inoculation et à l'intérieur d'un même groupe. Par exemple, les valeurs limites des pH acides permettant la survie des Rhizobium reportées dans ces études sont de 3,3 pour Bradyrhizobium japonicum, de 4,5 pour Rhizobium trifolii, et aux alentours de 5 pour Rhizobium meliloti. A l'opposé, les pH alcalins favorisent davantage Rhizobium meliloti que Bradyrhizobium japonicum. Ainsi 100% des souches de Rhizobium meliloti survivent à pH 9 alors que 3% seulement des souches de Bradyrhizobium japonicum le peuvent (139, 155).

2.2 / Incidence de certains ions.

Outre le pH du sol, des concentrations élevées en Al et en Mn qui sont souvent associées aux sols acides, sont toxiques pour Rhizobium (95). Des études récentes ont montré dans le cas de Stylosanthes, que la toxicité de l'aluminium n'intervient pas dans le développement de la plante (43, 123), mais à un effet dépresseur de la nodulation par inhibition de l'infection (44, 45, 126). De Carvalho suggère que la baisse du nombre de nodules serait en rapport direct avec une diminution de la densité des racines latérales et donc du nombre possible de sites d'infection (44). L'aluminium monomérique serait la forme la plus active. Il a un effet très significatif sur la longueur et la densité

des racines de soja alors que Al^{+++} n'a aucun effet sur le développement du système racinaire (5).

Des quantités importantes de chlorure de sodium peuvent également être responsables de l'inhibition de la nodulation des légumineuses. Cependant les données de la littérature soulignent la sensibilité de la plante-hôte plutôt que celle des Rhizobiums qui survivent en général très bien aux concentrations auxquelles les légumineuses ont un développement fortement entravé (112, 173).

III / FACTEURS PHYSIQUES INTERVENANT DANS L'IMPLANTATION ET LA SURVIE DES "RHIZOBIUMS" DANS LE SOL.

1 / INCIDENCE DE LA TEMPERATURE.

La température du sol dans certaines régions atteint des valeurs très élevées. La survie des Rhizobiums dans ces sols est grandement conditionnée par le fait que le sol soit mouillé ou déshydraté, et par la capacité propre de la souche à survivre dans les sols humides aux températures modérées (39, 67, 112). Les températures moyennes maximales de croissance ont été recherchées et résumées par Lowendorf (112) ; elles se situent en général autour de 35-37°C, et certains maxima ont été notés à 42-43°C. Au dessus de ces températures la survie de Rhizobium est très mauvaise voire nulle en milieu humide (102, 125, 165), alors qu'il est possible de maintenir en vie les cellules dans des systèmes déshydratés à des températures supérieures à 40°C (27, 91, 92, 102, 112). Aux températures élevées (régime diurnes à 42°C), la nodulation de plantules de soja est fortement inhibée pour de nombreuses souches. La favre (104) montre que l'aptitude des souches à noduler à températures élevées, est indépendante de l'aptitude à croître à des températures identiques.

2 / INCIDENCE DE LA DESHYDRATATION.

Dans de nombreuses contrées, une partie de l'année se déroule sans qu'il n'y ait de pluies, ce qui provoque un assèchement du sol. On reconnaît depuis longtemps que la dessiccation peut altérer la survie des Rhizobiums dans le sol, d'autant plus qu'elle est généralement

accompagnée de températures élevées. Les phases de déshydratation peuvent également intervenir au moment du ressuyage qui suit l'inoculation des graines.

2.1 / Survie de "Rhizobium" dans des sols soumis à la déshydratation.

De nombreuses études visent à observer le comportement des Rhizobiums face à la déshydratation dans différents types de sol.

Danso et Alexander (39) soumettent Rhizobium meliloti à la dessiccation dans des enceintes contenant du CaCl_2 à 28°C . Trois types de sol sont inoculés, du sable fin stérile, du limon, du sable fin argileux tous deux non stériles. La conservation des Rhizobiums est étudiée pendant 8 semaines dans les échantillons soumis ou non à déshydratation. Après cette période, il n'y a plus de bactéries dans le sable déshydraté stérile, alors que la population bactérienne atteint un plateau pour les deux autres échantillons. Les sols non déshydratés supportent des populations bactériennes élevées. Certains auteurs ont essayé d'établir des corrélations entre la teneur en eau résiduelle de divers échantillons de sol et la survie de Rhizobium, sans succès (67). Pena- Cabriales (143) montre que la perte de viabilité de plusieurs espèces de Rhizobium dans un sol limoneux soumis à déshydratation se découpe en deux phases. Pendant la première phase, on observe une perte de viabilité élevée, alors que dans la deuxième, la population décline plus lentement. Il met également en évidence, que les populations bactériennes déclinent plus rapidement pour des humidités moyennes que pour les sols fortement déshydratés ou très peu déshydratés.

Chao et Alexander (29) montrent que certaines caractéristiques du sol interfèrent avec la survie des Rhizobiums. Des pH supérieurs à 7 favorisent la survie de Rhizobium meliloti et phaseoli. Une concentration élevée en argiles (>25%), est défavorable à la survie de Rhizobium meliloti alors qu'elle est sans effet significatif sur celle de Rhizobium phaseoli. De même la mortalité de ces deux espèces est une fonction croissante de la teneur en aluminium disponible. Une augmentation du taux de matière organique de 0 à 2% améliore

significativement la survie des deux espèces de Rhizobium citées. Au delà de ce seuil, il n'y a plus d'augmentation significative du taux de survie. Ces auteurs mettent également en évidence, que la mortalité croît avec la capacité de rétention en eau, mesurée à 15 bars, de sols contenant moins de 3% de matière organique. Une autre étude montre (30) que, les températures basses (4°C) permettent de maintenir en vie les Rhizobiums déshydratés dans des sols sur de plus longues périodes que les températures élevées (30°C). En outre, un séchage lent permet d'obtenir des taux de survie de Bradyrhizobium japonicum plus importants que ceux obtenus avec un séchage rapide. L'importance de la rapidité de séchage a également été mise en évidence pour d'autres microorganismes (8).

La nature des argiles contenues dans les sols semble avoir une incidence sur la survie des Rhizobiums lors de la déshydratation. Bushby et Marshall (26) reportent que Rhizobium meliloti présente un taux de survie plus élevé dans un sol sableux additionné de montmorillonite en poudre, alors que l'addition de la même argile en suspension dans l'eau n'a aucun effet. Les Rhizobiums à croissance lente ne sont pas protégées par cette argile. Les raisons qui expliquent ces différences de protection ne sont pas claires et on ne connaît pas avec précision les propriétés qui sont responsables de son action. La présence de montmorillonite dans les sols est un facteur déterminant de la survie de nombreux microorganismes (24, 168). Par exemple, la multiplication des Fusariums est fortement inhibée dans les plantations de bananiers dont les sols contiennent de la montmorillonite (168).

2.2 / Influence de diverses substances protectrices.

Bushby et Marshall (26) ont étudié l'influence de diverses substances sur la survie des Rhizobiums lorsqu'ils sont soumis à la déshydratation. Du glucose, du saccharose, du maltose, en solutions à 20% sont mélangés dans un rapport 1:1 (v/v) avec un sol contenant des Rhizobiums. Ces échantillons et le témoin non amendé sont soumis à la déshydratation et les bactéries survivantes dénombrées. Les concentrations bactériennes sont beaucoup plus élevées dans les sols additionnés de sucres que dans le témoin pour les quatre espèces de

Rhizobium testées. D'autres substances telles que le polyvinyl pyrrolidone 40000 (20%) protègent Rhizobium japonicum et lupini alors que ce dernier est sans effet sur Rhizobium leguminosarum. Le polyéthylène glycol 6000 (20%) protège les Rhizobiums à croissance rapide mais pas les Rhizobiums à croissance lente ; Le glycérol (5%) ne confère pas de protection particulière, tandis que les polyéthylène glycol 400 et 1500 (20%) ont un effet délétère.

Dye (61) obtient des taux de survie élevés lorsque différentes espèces de Rhizobium à croissance rapide sont déshydratées par lyophilisation dans un milieu peptoné additionné de saccharose, ou dans un milieu à base de glutamate, dextran, saccharose. La déshydratation dans l'eau distillée ne permet pas de taux de survie supérieurs à 6%. L'effet protecteur du saccharose a également été mis en évidence par Fraser lors de la déshydratation de granulés d'argiles imbibés d'une suspension de Rhizobium meliloti (68). Scott (158) montre l'effet stabilisateur du saccharose et dans une moindre mesure du glucose, sur la conservation des cellules déshydratées de Salmonella newport conservées à différentes humidités relatives. L'effet le plus marqué se situe à a_w 0,00 ; les numérations de cellules viables sont identiques en présence d'air ou sous vide, alors que la viabilité des cellules déshydratées sans support, décline fortement en présence d'air.

Ochin (135, 137) met en évidence l'intérêt de substances telles que la maltodextrine pour la protection de Rhizobium meliloti au cours de la déshydratation par atomisation.

2.3 / Influence de l'eau résiduelle sur la survie de "Rhizobium".

On sait peu de choses sur la mortalité des microorganismes en relation avec l'état de déshydratation des cellules. Il a été montré par les études de conservation de différentes espèces bactériennes qu'une déshydratation insuffisante peut provoquer une forte mortalité (158). De même une déshydratation extrême a un effet adverse sur la survie de Lactobacilles (46) et les produits protecteurs sont dans ce cas ceux qui limitent les pertes en eau.

Bushby et Marshall (26, 27) entreprennent une étude sur l'eau résiduelle contenue dans les cellules de Rhizobium soumises à déshydratation. Ils établissent que les transferts d'eau (déterminés par RMN) sont défavorables à la survie de tous les Rhizobiums. Ils émettent l'hypothèse que la susceptibilité variable des différents groupes de Rhizobium serait en relation étroite avec les quantités d'eau résiduelle retenue à différentes humidités relatives de conservation. Les Rhizobiums meliloti plus sensibles à la dessiccation retiennent des quantités plus importantes d'eau quelle que soit l'humidité relative. Ils sont en outre protégés par la montmorillonite dont les capacités de rétention en eau sont plus élevées. Les auteurs suggèrent qu'une teneur en eau résiduelle basse serait nécessaire pour assurer une bonne conservation des cellules déshydratées (inhibition enzymatique) et que la montmorillonite agirait en abaissant la teneur en eau résiduelle. Cependant aucune des données expérimentales n'en apporte la preuve.

Mary (116, 118) lors d'une étude détaillée de la déshydratation de Rhizobium meliloti sous différentes humidités relatives, montre que la mortalité de Rhizobium meliloti est forte à une humidité relative de 0% et de 66%. Les humidités relatives intermédiaires permettent une survie plus longue des cellules, de même une humidité relative égale à 83%. En outre, la vitesse de déshydratation est déterminante sur la survie de Rhizobium meliloti, un séchage lent est favorable au maintien des potentialités vitales des cellules déshydratées.

Mügnier et Jung (91, 92, 124) émettent l'hypothèse, que la forte mortalité observée aux humidités relatives intermédiaires, dans des inoculums déshydratés à base de biopolymères, est en relation avec la réactivité de l'eau pour cette gamme d'humidités relatives ; la déshydratation n'étant pas en elle même responsable de la mortalité des cellules en conservation. Aux très faibles humidités relatives, l'eau présente dans le produit serait de l'eau fortement liée sans effet sur les cellules ; les cellules peuvent se conserver sans dommage sur de longues périodes. La deuxième fraction de l'eau serait quant-à elle très réactive, et l'intensité des réactions conduisant à la détérioration de l'inoculum augmenterait en même temps que cette deuxième fraction est plus abondante. On peut supposer que cette eau, rende certains solutés

suffisamment mobiles pour qu'ils atteignent la surface cellulaire, qui conduirait par un mécanisme non expliqué à la mort des cellules. L'effet protecteur ou délétère de différents solutés serait régi par les caractéristiques thermodynamiques du produit, et notamment le point de mobilisation de la molécule ; au delà de cette valeur d'humidité relative, l'eau présente peut agir comme solvant pour le soluté, ce qui change l'environnement de la cellule.

2.4 / Dommages causés par la déshydratation aux cellules.

Les dommages les plus importants de la déshydratation se situent au niveau de l'A.D.N. et au niveau membranaire. Les observations in situ réalisées par Kilbertus suggèrent ce genre de dommage (99).

Les travaux de Webb (186, 188), montrent l'effet mutagène de l'exposition de cellules animales et de *Escherichia coli* à des humidités relatives situées autour de 40%. Il attribue ces dégats à l'élimination de l'eau de constitution des macromolécules cellulaires, et note que certaines petites molécules telles que l'inositol sont à même de prévenir les dégats. Il affirme que la stabilité et le fonctionnement de l'A.D.N. seraient liés à la présence de molécules dans une conformation particulière à l'extérieur de celui-ci. La conformation fonctionnelle de ces molécules serait assurée par des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau ou éventuellement avec des petits solutés qui se substitueraient à l'eau au cours de la déshydratation.

Crowe (34) a montré que la déshydratation de membranes artificielles, provoque des phénomènes de changement de phase de la phase phospholipidique. L'auteur montre que ces changements de phase liés à l'élimination de l'eau, sont responsables de la déstabilisation des membranes. De petites molécules comme le tréhalose permettent de préserver la structure des membranes ainsi que le fonctionnement des protéines membranaires. Le mécanisme de stabilisation résiderait principalement en une substitution des molécules d'eau de constitution par des molécules de tréhalose qui assurerait une conformation identique à celle des membranes non déshydratées. On trouve le tréhalose dans des microorganismes capables de supporter une déshydratation complète.

IV / STRATEGIES DE RESISTANCE DES MICROORGANISMES A LEUR ENVIRONNEMENT.

1 / PRODUCTION DE POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES.

L'observation in situ de très nombreuses bactéries telluriques Gram-, révèle la présence de polysaccharides extracellulaires (98). La production de telles substances confèrerait à ces bactéries certains avantages écologiques (168, 189). On a montré que leur présence permet la chélation de certains ions et qu'il existe une corrélation positive entre leur présence et l'aptitude des Rhizobiums à survivre à pH acide (36). Ils empêchent en outre, les attaques virales en masquant les sites récepteurs, limitent la phagocytose et les pertes en eau des cellules, et nombre d'enzymes extracellulaires permettant la dégradation de substrats y sont situés (24). Ces polysaccharides bactériens peuvent également servir de substrat carboné en conditions limitantes de croissance.

2 / AGE PHYSIOLOGIQUE, FORMATION DE MICROCOLONIES ET DIMINUTION DE LA TAILLE DES CELLULES.

Les observations mettant en évidence l'influence d'une prémultiplication des Rhizobiums dans leur milieu, sur les taux de survie à la déshydratation sont nombreuses.

Fraser (68) observe des taux de survie plus importants, lorsque des granulés imprégnés de Rhizobiums meliloti sont déshydratés après incubation et multiplication des Rhizobiums dans le support. Materon (119) montre que la survie dans le sol de Rhizobium trifolii après inoculation de graines, est plus importante lorsque la tourbe est incubée pendant 3 semaines, que lorsque l'inoculum est employé dans les jours qui suivent son ensemencement. Il souligne l'importance de la notion de maturité de l'inoculum.

Cette notion de maturité reflète en fait l'âge physiologique des cellules. Certains auteurs ont noté lors d'observations in situ des bactéries du sol, des changements morphologiques importants. Kilbertus (98) note la présence de microcolonies noyées dans des polysaccharides comme forme la plus fréquente sous laquelle les bactéries peuvent être

observées dans le sol. La formation de ces microcolonies pourrait être en relation avec la tolérance accrue à la déshydratation, des inoculums préalablement incubés. Crozat et al (35) remarquent lors de prélèvements d'échantillons de sol dans un champ ayant contenu du soja, que la forme des cellules de Bradyrhizobium japonicum passe d'une forme de bâtonnet typique à une forme plus petite ressemblant à des cocci.

Roszak et Colwell (150) établissent l'existence de cycles des bactéries dans leur environnement naturel. Il a été observé pour de nombreuses bactéries aquatiques un état particulier dans lequel les bactéries sont intactes et vivantes mais incapables de se diviser dans des conditions habituelles de laboratoire. Ce phénomène semble refléter un mécanisme de survie des bactéries dont les caractéristiques sont variables, et qui dépend des conditions de l'environnement et du temps d'exposition à ces conditions. Il résulte en général en une diminution très importante de la taille des cellules ($<0,1\mu$), et une baisse de l'activité métabolique. Cet état semble analogue à un état de dormance.

3 / ACCUMULATION DE METABOLITES.

De nombreux organismes lorsqu'ils sont exposés à des situations de stress (salinité, dessiccation) répondent par l'accumulation d'osmolytes intracellulaires.

Ces phénomènes sont bien connus chez les cyanobactéries qui vivent en milieu saumâtre et qui doivent faire face à d'importantes fluctuations de la teneur en sel. Une revue générale a été faite par Mackay (113). Les osmolytes compatibles, les plus fréquemment accumulés sont le saccharose, le tréhalose, le glucose, le fructose, la bêtaïne, le glycosyl-glycérol. Bernard et Le Rudulier (11, 107) montrent l'accumulation de bêtaïnes par différents groupes de Rhizobium en réponse à l'exposition à des milieux salins.

D'autres auteurs soulignent l'importance de l'accumulation d'acides aminés dans les mécanismes d'osmorégulation chez les bactéries non halophiles (21). L'accumulation de proline et de K^+ a été observée chez Salmonella typhimurium (60). Pseudomonas fluorescens accumule en quantités importantes de l'acide glutamique lorsqu'il est soumis à un milieu de faible a_w par addition de NaCl, alors qu'il accumule du

sorbitol, lorsque la réduction d' a_w est provoquée par le sorbitol (146). L'importance de l'accumulation de polyols serait, aux yeux des auteurs, sous estimée, dans l'étude des phénomènes d'osmorégulation chez les bactéries, alors que ce phénomène est reconnu pour les microorganismes eucaryotes telles que les levures (22, 138). De nombreux polyols sont accumulés (ou produits) et lorsque le stress est important le glycérol est accumulé pour la protection des enzymes intracellulaires (22, 81).

On connaît, par contre, très peu de choses des mécanismes de tolérance des bactéries aux stress hydriques imposés par la déshydratation. Certains organismes (spores fongiques, larves de nématodes, levure de boulangerie...) sont cependant capables de supporter une déshydratation complète, sans perte de potentialités vitales (34). Une des caractéristiques communes est la présence de tréhalose en quantités importantes. Des polyols sont également accumulés (113). La mobilisation et la consommation du tréhalose correspond dans ces organismes à une reprise de la phase de croissance active en présence d'eau. Ce phénomène est bien connu en levurerie, et l'accumulation de tréhalose correspond à la fin du cycle de croissance, moment choisi pour soumettre la levure à la déshydratation (176).

Récemment, certains auteurs ont montré l'accumulation de tréhalose et dans une moindre mesure de mannitol en quantités variables chez les bactéries du genre Rhizobium (170). Les bactéries cultivées en présence de glutamate accumulent les quantités maximales en phase stationnaire de croissance. Les auteurs montrent que l'infectivité des souches est corrélée négativement avec les quantités de tréhalose intracellulaire. De même, on en trouve dans les bactéroïdes âgés. Streeter suggère que ce phénomène pourrait intervenir dans les mécanismes de résistance des Rhizobiums à la déshydratation et aux conditions adverses rencontrées dans le sol en absence de la plante-hôte. La notion de maturité mise en avant par d'autres auteurs pourrait en fait refléter de tels changements dans la composition des métabolites intracellulaires (68, 119).

CONCLUSION ET BUTS DU TRAVAIL.

Les progrès appréciables réalisés dans la sélection variétale du soja, et particulièrement la création de groupes de précocité 00 et 000, laissent présager son introduction dans des conditions rentables, dans de nouvelles zones géographiques froides. L'intérêt cultural d'une telle plante est important ; la culture du soja laisse des reliquats azotés importants, ameublissent le sol et permet en outre de rompre le cycle de maladies des céréales dans les régions de monoculture.

Dans ce cas, la réussite de l'inoculation artificielle du soja est primordiale. Elle nécessite la sélection de souches adaptées à la plante-hôte et la production d'inoculums renfermant des quantités importantes de Bradyrhizobium japonicum.

L'importance de caractéristiques telles que l'efficacité et la compétitivité des souches, nous amène à envisager la sélection de Bradyrhizobium japonicum par rapport à ces deux critères en employant la variété Mapple arrow, comme cultivar de référence du groupe 00. Une trentaine de souches de Bradyrhizobium japonicum seront testées ; leur aptitude à noduler, l'activité nitrogénasique mesurée par le test de réduction de l'acétylène ainsi que le poids sec des plantules serviront de mesures d'appréciation des performances des souches. Les souches les plus efficaces feront l'objet d'études complémentaires afin d'observer leurs aptitudes compétitives pour la nodulation, lorsqu'elles sont ajoutées en mélange avec d'autres souches au voisinage de la racine.

Des travaux ont déjà été entrepris au laboratoire, concernant la déshydratation de Rhizobium meliloti. L'intérêt croissant et les efforts portés pour l'implantation et à la promotion du soja dans nos régions, nous amènent à envisager la production d'inoculums déshydratés de forte concentration de Bradyrhizobium japonicum. Ceci suppose la production préalable de biomasse. Les paramètres optimaux de production cellulaire notamment la composition des milieux et le pH de culture, seront recherchés. De même, différents procédés de séchage seront mis en oeuvre afin de déterminer les conditions permettant le meilleur rendement cellulaire à la déshydratation.

Les paramètres affectant la conservation des inoculums produits seront étudiés. Une attention particulière sera portée sur l'influence de facteurs tels que l'humidité relative de conservation, la présence d'oxygène, la vitesse de déshydratation, la température, l'âge physiologique des cellules, les souches, le rôle protecteur de différentes substances, la présence d'exopolysaccharides. La maîtrise de ces facteurs doit permettre de déterminer les conditions optimales de conservation des cellules déshydratées.

Enfin, la connaissance des paramètres permettant le maintien des potentialités vitales des cellules déshydratées nous permettra d'envisager des procédés de pelliculage dont les modalités favorisent la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine pendant de longues périodes.

MATERIELS

ET

METHODES

I / SOUCHES BACTERIENNES ET VARIETES DE SOJA.

1 / ORIGINE DES SOUCHES BACTERIENNES .

Les souches de Bradyrhizobium japonicum mentionnées dans le tableau I ont été utilisées dans notre travail. La Faculté Agronomique de Gembloux (Belgique) nous a fourni la plupart des souches dont la nomenclature a été conservée. Les 5 dernières souches du tableau proviennent de la collection du laboratoire (tableau I).

Des mutants présentant un caractère de résistance à certains antibiotiques (Néomycine, Streptomycine, Chloramphénicol) ou au Bénomyl (antifongique), ont été isolés à partir de certaines souches.

2 / CONSERVATION DES SOUCHES.

Après isolement et contrôle de l'appartenance des souches au genre Rhizobium par inoculation de plantules de soja, les souches sont conservées:

- en routine, par des isolements sur boîte de Pétri (milieu YEM). La viabilité de Bradyrhizobium japonicum peut ainsi être facilement maintenue 4 mois à +4°C.

- pour des durées de stockage de plusieurs années, les souches sont conservées à -20°C dans leur milieu de culture (YEM, TY, ISWARAN) additionné de 20 % de glycérol.

3 / MATERIEL VEGETAL

Les variétés de soja Glycine max L. Merr. utilisées dans nos travaux, sont les variétés du groupe de précocité 00, "Mapple arrow" obtenue par Rustica (inscription 1980), et la variété "Effi" obtenue par Tourneur Grandes Cultures (inscription 1987).

Tableau I

Nomenclature et origine des souches de Bradyrhizobium japonicum.

SOUCHE	ORIGINE DES SOUCHES
3.1	! Souche 501 de Thornton
3.2	! Souche 502 de Thornton
3.4.3	! Souche origine pois
3.8	! Espagne
3.14	! ATCC 10323
3.15	! ATCC 10324
3.15b3	! Sélectionnée à partir de 3.15
3.17	! J5, F.S.A.G
3.20	! Yangambi, Zaïre
3.22	! Yangambi, Zaïre
3.28	! Coll. Beltsville 3Ilb149
3.30	! Espagne
3.32	! Espagne
3.40	! Coll. Beltsville 3Ilb142
3.41	! Coll. Beltsville 3Ilb143
3.54bis	! Isolée inoculum commercial Bidoz
3.55	! Isolée inoculum commercial Bioprox
3.56	! G49 Isolée inoculum commercial Bioprox
3.57	! isolée inoculum commercial Lipha
R3.4.1	! F.S.A.G
J67	! R.I.O, Glycine Hispida, Japon 1929
J68	! R.I.O, Glycine hispida, Yougoslavie 1955
CB1809	! C.S.I.R.O, Glycine max 1968
J315	! F.S.A.G
T83005	! Souche isolée inoculum commercial Bidoz 1983



II / LES MILIEUX DE CULTURE

1 / MILIEUX DE CULTURE POUR "RHIZOBIUM"

- Milieu TY : Tryptone Yeast (additionné de mannitol) (10)

.Tryptone.....5 g
.Extrait de levure (I.P.P.).....3 g
.CaCl₂, 2H₂O.....0,88 g
.Mannitol.....10 g
.Eau distillée.....qsp 1 l

- Milieu YEM (69)

.K₂HPO₄.....0,5 g
.MgSO₄, 7H₂O.....0,2 g
.Yeast Extract.....1 g
.NaCl.....0,1 g
.Mannitol.....10 g
.Eau distillée.....qsp 1 l

- Milieu R.C. (105)

.K₂HPO₄.....1 g
.MgSO₄, 7H₂O.....0,2 g
.Yeast Extract.....1 g
.Mannitol.....10 g
.Eau distillée.....qsp 1 l

- Milieu ISWARAN (84)

.K₂HPO₄.....0,5 g
.MgSO₄, 7H₂O.....0,2 g
.FeCl₃, 6H₂O.....0,01 g
.NaCl.....0,1 g
.Yeast Extract.....2 g
.Gluconate de Potassium.....1,5 g
.Mannitol.....10 g
.Eau distillée.....qsp 1 l



Tous les milieux précédemment décrits sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

Sous forme liquide, ils sont utilisés pour la production de cellules, et gélosés à 1,5 % avec de l'agar-agar, ils nous ont servi de milieu d'isolement, de conservation, ou de dénombrement.

En vue de la culture de Bradyrhizobium japonicum, le pH des différents milieux est ajusté:

- à pH 5,5 pour les milieux liquides
- à pH 6 pour les milieux gélosés. (en deça, le durcissement de la gélose est insuffisant.)

2 / MILIEU DE CULTURE POUR PLANTULES DE SOJA.

- Milieu de STREET modifié (148)

.MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	70 mg
.KCl.....	67 mg
.Na ₂ SO ₄ , 10H ₂ O.....	50 mg
.KH ₂ PO ₄	0,75 mg
.MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	7 mg
.ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 mg
.H ₃ BO ₃	1,5 mg
.Fe(SO ₄) ₃ , 7H ₂ O.....	2,5 mg
.Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O.....	0,3 mg
.CoCl ₂ , 6H ₂ O.....	0,03 mg
.CaCl ₂	45 mg
.H ₂ O.....	qsp 1 l

Une solution mère, concentrée 10 fois sert à la préparation du milieu. Après dilution, le pH est ajusté à 7 par addition de potasse, et le milieu est stérilisé à 105°C pendant 30 min.

III / LES PRECULTURES ET CULTURES BACTERIENNES.

1 / CULTURES EN TUBES.

Les précultures ont été effectuées en tubes de 20 x 220 mm, fermés par des bouchons en caoutchouc siliconé cylindro-conique (diamètres

inférieur et supérieur respectivement 15 et 19 mm), contenant 10 ou 20 ml du milieu désiré. Chaque tube est inoculé par un clône provenant d'un isolement, ou lorsque plusieurs tubes doivent être ensemencés par des quantités identiques de bactéries, les tubes sont ensemencés par 0,1 ml d'une suspension bactérienne contenant au minimum 10^9 bactéries / ml.

Les cultures sont incubées à 29°C sur table d'agitation horizontale (Biolaffite) à 50 saccades / min.

2 / CULTURES EN ERLNMEYER.

La préparation de petites quantités d'inoculum, est faite à partir d'1 litre de culture effectuée en Erlenmeyer d'une contenance de 2 l. Ces derniers sont ensemencés par 20 ml d'une préculture (préparée comme décrit ci-dessus) en fin de phase exponentielle, puis fermés par des capuchons en caoutchouc siliconé.

L'incubation des cultures est réalisée à 29°C sur table d'agitation rotative Biolaffite à 85 rotations / minute.

La pureté des cultures est contrôlée par observation microscopique en fin de culture.

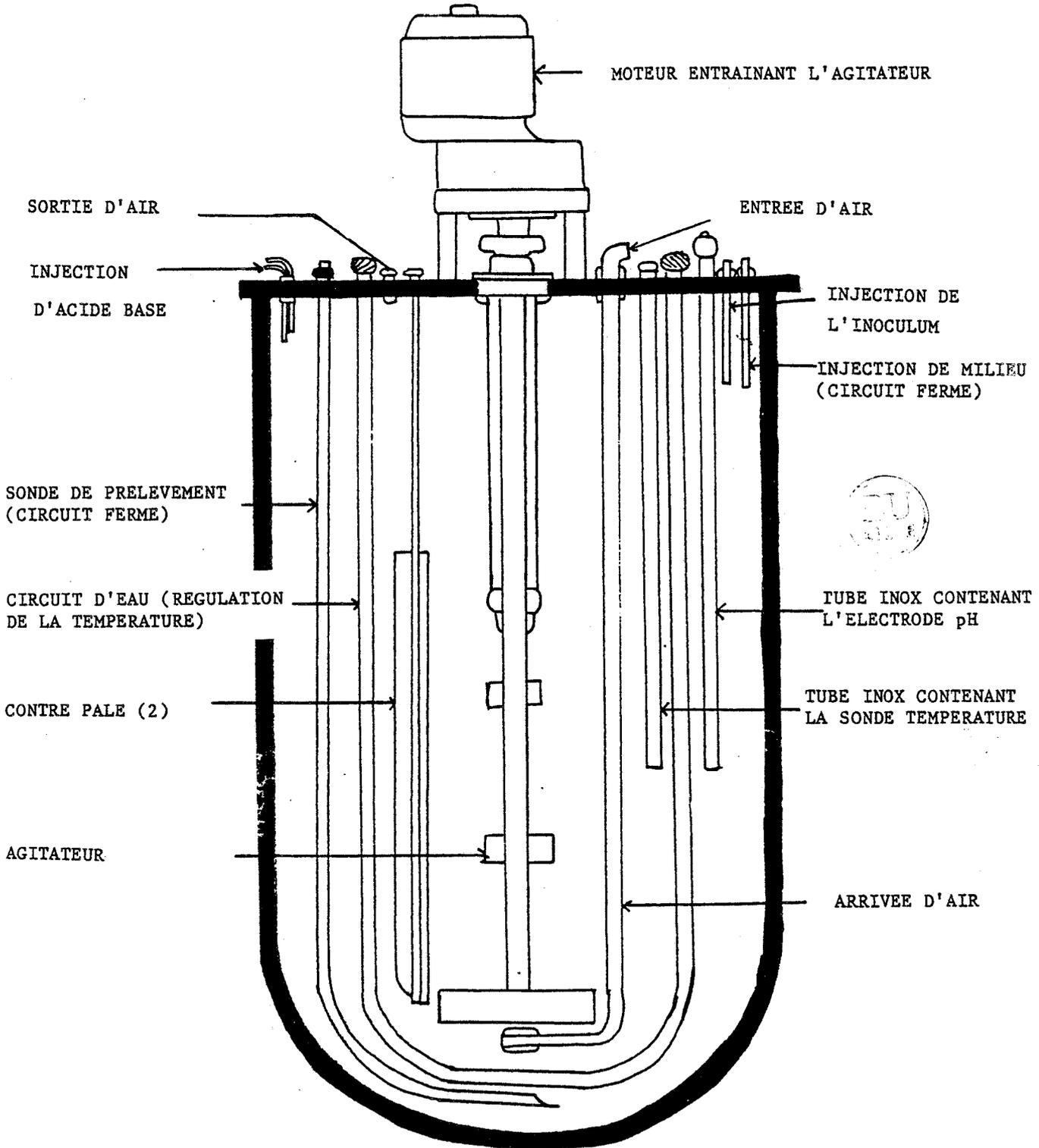
3 / CULTURES EN FERMENTEUR.

3.1 / Description du matériel.

La préparation de quantités importantes de cellules de Bradyrhizobium japonicum a été faite à partir de fermenteurs Biolafitte de 20 l type 60.001 (figure 1) dont les caractéristiques sont:

- cuve en verre
- agitation mécanique de 0 à 800 tours/min
- aération par injection d'air comprimé stérile de 0 à 20 l/min
- filtres d'entrée et de sortie d'air, en acier inoxydable et pyrex avec laine de verre ou coton cardé
- condenseur à circulation d'eau sur la sortie d'air
- régulation de la température par circulation d'eau thermostatée
- régulation de pH par électrode et dispositif d'injection acide / base par pompe péristaltique

Figure 1
Schéma du fermenteur Biolafitte de 20 l.



- dispositif de dérivation entraîné par pompe péristaltique avec raccords rapides stérilisables à la flamme pour inoculation ou prélèvements stériles.

3.2 / Conduite de la fermentation.

3.2.1 / Préparation.

Après autoclavage 1/2 heure à 130°C du fermenteur muni de tous ses accessoires, 13 litres de milieu TY mannité et 2 ml d'antimousse Gensil 420 sont introduits dans la cuve. Un litre de ce milieu sert à remplir une fiole d'inoculation d'une capacité de 2 litres. La stérilisation de l'ensemble est assurée par un deuxième autoclavage d'une heure à 121°C.

3.2.2 / Précultures.

Les précultures sont amenées jusqu'à la fin de phase exponentielle, (environ 4 jours), et servent d'inoculum initial pour la fiole d'inoculation (tube) ou pour le fermenteur (fiole d'inoculation).

3.2.3 / Fermentation.

Le fermenteur, préchauffé à 29°C estensemencé aseptiquement avec la préculture. La concentration bactérienne initiale se situe entre 10^7 et 10^8 bactéries par ml.

- Le pH est régulé à 6 par addition d'acide orthophosphorique 3N.
- L'aération optimale pour la croissance de Bradyrhizobium japonicum assure un coefficient de transfert d'oxygène de 28 mmoles d'O₂ / heure /litre (41, 135), ce qui correspond à une vitesse d'agitation de 200 tours/min pour un débit d'air de 3 l/min.
- Le contrôle de la pureté et de la croissance est assuré lors des prélèvements biquotidiens effectués sur une dérivation alimentée par pompe péristaltique.

IV / METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.

1 / MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE.

La mesure de l'absorbance à 600 nm au spectrophotomètre Zeiss nous a servi en routine pour l'estimation de la croissance bactérienne des cultures.

2 / DENOMBREMENT DES CELLULES VIABLES.

Le dénombrement des cellules viables a été employé en routine,
- pour l'estimation de la croissance bactérienne,
- pour le contrôle et l'estimation de la viabilité de Bradyrhizobium japonicum dans les inoculats déshydratés et dans les enrobages de semences de soja.

Des dilutions décimales des suspensions à étudier sont effectuées dans l'eau distillée stérile. L'homogénéisation est assurée par mélangeur de type Vortex. Des fractions de 1 ml de chaque dilution sont déposées en double exemplaire, dans le fond d'une boîte de Pétri. 15 ml de milieu gélosé liquide, maintenu à 40°C, sont alors coulés dans les boîtes et homogénéisés avec la suspension bactérienne. Après solidification, les boîtes sont mises à incuber à 29°C et le comptage des colonies est effectué après 9 jours.

Le milieu YEM est utilisé

- sans adjonction pour les numérations de cultures pures.
- avec addition d'agents sélectifs pour les numérations effectuées sur les échantillons déshydratés et sur les enrobages de graines. Pour toutes les souches, les produits suivants ont été ajoutés :

- 25 mg/l de rouge Congo, sélectif contre certaines bactéries Gram + courantes. De plus le rouge Congo facilite l'identification des Rhizobium qui ne prennent pas le colorant.

- 10 µg/ml de chloramphénicol préparé en solution alcoolique à 50%
- 0,2 ml/l d'antimousse (Gensil 420): l'antimousse ajouté dans le milieu gélosé, abaisse la température de solidification du milieu, ce qui limite les risques de mortalité des cellules induits par l'emploi d'un milieu trop chaud.

Ces trois composés sont ajoutés avant autoclavage, la stérilisation n'affectant pas leurs propriétés respectives.

Pour les souches résistantes à la streptomycine ou à la néomycine, on ajoute, au moment de l'emploi, l'antibiotique correspondant. Préparés en solution, les antibiotiques sont stérilisés sur unité de filtration Millipore 0,2 μm stérile. La concentration finale dans le milieu est de 100 μg / ml

V / METHODES D'ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM", EN SERRE SUR CULTURES DE PLANTULES.

1 / CULTURES DE PLANTULES.

1.1 / Stérilisation superficielle des graines.

On procède à une stérilisation superficielle des graines en les plongeant dans une solution de chlorure mercurique à 0,1% pendant 3 à 5 min. Cette solution est éliminée stérilement au moyen d'une pipette Pasteur stérile raccordée sur une pompe péristaltique. Les graines sont rincées 5 fois à l'eau distillée stérile qui est éliminée par le même procédé.

1.2 / Germination des graines.

Les graines sont transférées au moyen d'une pince stérilisée à la flamme dans des boîtes de Pétri contenant un milieu riche (TY ou YEM) et mises à germer à l'obscurité à 25°C. Leur asepsie est contrôlée par l'absence de germes contaminants se développant à leur périphérie.

1.3 / Inoculation et culture des plantules.

Lorsque la racine atteint une longueur de 2 cm, on procède à une immersion des graines dans la suspension bactérienne durant 1 heure à température ambiante. L'inoculum est constitué par une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. La culture est centrifugée et le culot repris dans le même volume d'eau distillée stérile, ceci afin d'éliminer l'azote contenue dans le milieu.

Les graines ainsi bactériisées sont transférées aseptiquement soit :

- sur des pots à prélèvement transparents stériles (contenance 200ml, diamètre 60 mm) remplis de milieu de STREET, et dont le couvercle est percé pour permettre le passage de la racine. Les pots sont ensuite placés dans la serre, à une température de 25°C et une photopériode de 16 heures. A ce stade, toutes les précautions doivent être prises pour qu'il n'y ait pas de contaminations entre souches. Cette technique permet un suivi de la nodulation aisé.

- dans des pots coprologiques emplis de vermiculite imbibée de 100 ml de milieu de STREET et stérilisés 2 fois à 121°C, 20 min. Cette façon de procéder permet un meilleur enracinement et offre un environnement bien tamponné. Cette méthode est utilisée lorsqu'il n'est pas utile de contrôler l'évolution de la nodulation.

L'arrosage des plantules se fait alternativement avec du milieu de STREET modifié et avec de l'eau distillée additionnée de potasse pour corriger les importantes variations de pH du milieu.

2 / METHODES DE CONTROLE DE L'INFECTIVITE ET DE MESURE DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES.

2.1 / Contrôle de l' infectivité.

Une souche de Rhizobium est considérée comme infective sur une plante-hôte donnée, lorsque celle-ci est capable d'induire la formation de nodosités. On a l'habitude de noter ce caractère par le symbole inf+. Dans nos conditions expérimentales, ce caractère s'apprécie par l'apparition ou non de nodules, et leur localisation sur les racines des plantules.

2.2 / Mesure de l'efficience.

La notion d'efficience traduit, pour une souche, l'aptitude à fixer l'azote moléculaire en symbiose avec une plante-hôte donnée. Plusieurs méthodes d'évaluation des quantités d'azote fixées existent (62, 120, 140, 174, 178, 180, 181).

Nous avons choisi le test de réduction de l'acétylène classiquement employé au laboratoire (56, 79). Cette technique utilise l'aptitude de la nitrogénase à réduire l'acétylène en éthylène, couramment notée A.R.A. (activité réductrice de l'acétylène). Par extension, on estime que le taux horaire de réduction de l'acétylène, reflète l'activité nitrogénasique réelle et donc la quantité d'azote moléculaire fixé.

2.2.1 / Protocole expérimental.

Au moment du test, le système racinaire des plantules est sectionné et transféré dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement par un bouchon de caoutchouc évidé. A l'aide d'une seringue, on prélève 17 ml d'air que l'on remplace par:

- 15 ml d'acétylène
- 2 ml d'un témoin interne de propane

Ce témoin qui servira d'étalon pour le dosage est obtenu comme suit : Une fiole Wheaton est remplie de propane. On en prélève 2 ml que l'on injecte dans un flacon hermétique de 150 ml, le mélange air-propane ainsi obtenu est injecté dans les flacons contenant les racines.

Le moment de l'injection de l'acétylène correspond au temps $T=0$. Après un temps d'incubation à 29°C, identique pour toutes les plantules, le contenu du flacon est homogénéisé. L'analyse du mélange gazeux est effectuée en chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme :

- chromatographe INTERSMAT 112F
- colonne Sphérosyl XOB 075, longueur 2 m
- température du four: 50°C
- température du détecteur: 115°C
- température d'injection: 70°C
- gaz vecteur: azote, débit de 40 ml/min, P=2 Bars
- détecteur à ionisation de flamme

2.2.2 / Méthodes de calcul

La formule appliquée pour le calcul de la quantité d'éthylène produite est la suivante:

$$Q = C * K * \frac{\text{Hauteur pic } C_2H_4 \text{ (éthylène)}}{\text{Hauteur pic } C_3H_8 \text{ (propane)}}$$

- Le calcul des résultats nécessite la connaissance du coefficient de proportionnalité K établi à partir du dépouillement d'un chromatogramme, d'un mélange en proportions égales de propane et d'éthylène dans l'air. Ce coefficient est alors:

$$K = \frac{\text{Hauteur pic } C_3H_8}{\text{Hauteur pic } C_2H_4}$$

La valeur varie en fonction des concentrations de C_3H_8 et de C_2H_4 . Nous avons adopté un coefficient moyen $K = 1,5$ pour des quantités de gaz étalon injectées comprises entre 0,5 et $5 \cdot 10^{-9}$ moles.

- De plus, les pics doivent avoir une base étroite et identique pour pouvoir utiliser dans le calcul, la hauteur au lieu de la surface du pic. Le cas échéant, l'injection du mélange gazeux est recommencée.

- C = nombre de moles de C_3H_8 injectées dans le flacon, soit dans nos conditions expérimentales $C = 1,19$ micromoles

- Le taux horaire de réduction de l'acétylène en éthylène est déduit de la formule précédente.

2.3 / Poids sec des plantules.

Parallèlement à la mesure de l'A.R.A., les parties aériennes des plantules sont mises à déshydrater à l'étuve à $110^\circ C$, jusqu'à poids constant, puis pesées à 5 mg près.

VI / METHODES D'ETUDE DE LA MOBILITE ET DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES.

1 / MOBILITE DES SOUCHES

La mobilité des souches est étudiée, en déposant 0,1 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance, au milieu d'une boîte de Pétri contenant du milieu TY gélosé à 0,3%.

Après incubation une semaine à 29°C, une souche est considérée comme mobile, si un anneau de migration s'est formé autour de la nappe bactérienne initiale.

2 / METHODE D'ETUDE DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES.

2.1 / Obtention de mutants spontanés présentant un caractère de résistance aux antibiotiques Streptomycine et Néomycine.

Après préparation et stérilisation sur unité de filtration Millipore de 0,2 μm stérile, les solutions d'antibiotique sont ajoutées à différentes concentrations finales dans le milieu (50-100-150 ou 200 $\mu\text{g/ml}$). L'obtention de mutants spontanés résistants à ces concentrations d'antibiotique est réalisée en étalant 0,1 ml d'une culture en début de phase stationnaire des souches désirées, sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM gélosé additionné de l'antibiotique en question. Les clones se développant après 9 jours d'incubation à 29°C sont sélectionnés et isolés sur le même milieu.

En pratique, des concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$ ont été retenues pour la streptomycine et 200 $\mu\text{g/ml}$ pour la néomycine car certaines souches présentent une croissance résiduelle à 100 $\mu\text{g/ml}$.

2.2 / Inoculation des plantules.

La technique de culture en pots remplis de vermiculite a été retenue. Les graines stérilisées superficiellement sont semées à raison d'une par pot. Les cultures en phase exponentielle de croissance sont centrifugées, et le culot cellulaire repris dans de l'eau distillée dont la quantité est calculée pour que toutes les cultures soient ramenées à la même densité optique.

L'inoculation est réalisée comme suit :

10^7 bactéries d'une souche X résistante à la streptomycine et 10^7 bactéries d'une souche Y résistante à la Néomycine sont ajoutées au voisinage de la graine au moment du semis.

De même l'inoculation réciproque est effectuée avec :

10^7 bactéries de la souche Y résistante à la streptomycine et 10^7 bactéries de la souche X résistante à la Néomycine, ceci afin de déceler une influence éventuelle du marquage sur les profils de compétition entre souches.

2.3 / Methodes d'isolement des souches à partir des nodules.

Après culture des plantules jusqu'au stade R1 (tableau II) soit 5 à 6 semaines, 50 nodules par traitement, sont prélevés au hasard afin d'en analyser le contenu.

2.3.1 / Stérilisation superficielle des nodules.

Les nodules sont stérilisés superficiellement par immersion dans une solution de chlorure mercurique à 0,1% pendant 3 min puis rincés abondamment à l'eau distillée stérile. Chaque nodule est ensuite transféré aseptiquement dans un tube à hémolyse (50 x 10 mm) stérilisé contenant 2,5 ml de solution de saccharose à 25%.

2.3.2 / Isolement des souches.

La ou les souches contenues dans chaque nodule sont extraites par écrasement du nodule avec une tige en verre flambée à l'alcool. Une goutte de la suspension bactérienne est étalée sur deux boîtes de Pétri, l'une contenant le milieu YEM additionné de Néomycine, l'autre le milieu YEM additionné de Streptomycine.

La lecture des résultats s'effectue après une semaine, la résistance à l'un des antibiotiques ou aux deux (cas des nodules mixtes) permettant le repérage des souches.

2.4 / Autre mesures effectuées.

Le contrôle de la nodulation, le poids sec des plantules, ainsi que des mesures d'efficience ont également été effectuées.

VII / METHODES D'ETUDE EXPERIMENTALE AU CHAMP.

Les expérimentations au champ ont pour but de tester :

- les capacités symbiotiques des souches au champ.
- l'incidence du mode d'inoculation des semences, sur le succès de l'implantation des souches.

1 / IMPLANTATION DES PARCELLES.

Les essais ont été réalisés en trois lieux : Coulommiers, Pouy-Roquelaure et Villeneuve d'Ascq, avec une répétition par traitement et par lieu.

Après préparation fine de la terre, les semis ont été effectués à la main, en parcelles de 7,5 m² (3 lignes de 5m écartées de 50cm) à raison de 450 graines par parcelle, ce qui correspond à un peuplement de 600000 pieds / ha. Les graines sont inoculées au moment du semis, en prenant soin d'éviter tout mélange de souches.

2 / NOTATIONS EFFECTUEES.

Afin de discerner l'incidence de l'inoculation sur le développement des plantes, plusieurs données ont été collectées tout au long de la culture :

- pourcentage de germination au stade 2 feuilles trifoliées.
- vigueur au stade jeune (échelle de 1 à 9).
- couleur du feuillage : mi-août, échelle de 1 à 9.
- précocité : notation des stades de développement suivant la nomenclature américaine (figure 2, tableau II, 66). L'estimation des stades reproductifs et végétatifs se fait par observation d'un échantillonnage de 10 plantes par parcelle. La fréquence des passages est

Tableau II

Description des stades reproductifs du soja (66)

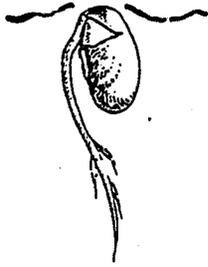
STADE REPRODUCTIF	DESCRIPTION
R1	Début de floraison ! Une fleur ouverte à n'importe quel noeud sur la tige principale.
R2	Pleine floraison ! Une fleur ouverte à l'un des deux noeuds supérieurs de la tige principale avec une feuille complètement développée.
R3	début de formation ! Une gousse de 5mm à un des quatre noeuds supérieurs de la tige principale avec une des gousses. feuille complètement développée.
R4	élongation des ! Une gousse de 2cm de long à un des quatre noeuds supérieurs de la tige principale avec gousses. une feuille complètement développée.
R5	début de formation ! Une gousse contenant une graine verte de 3mm de long à un des quatre noeuds supérieurs de des graines ! la tige principale avec une feuille complètement développée.
R6	grossissement des ! Une gousse contenant une graine verte remplissant la cavité à un des quatre graines ! noeuds supérieurs de la tige principale avec une feuille complètement développée.
R7	début de maturité ! Une gousse de la tige principale qui atteint sa couleur de maturité.
R8	pleine maturité ! 95% des gousses qui ont atteint leur couleur de maturité. 5 à 10 jours sont nécessaires après ce stade avant que les graines aient moins de 15% d'humidité.

Figure 2

Stades repères du soja

Variétés de type indéterminé

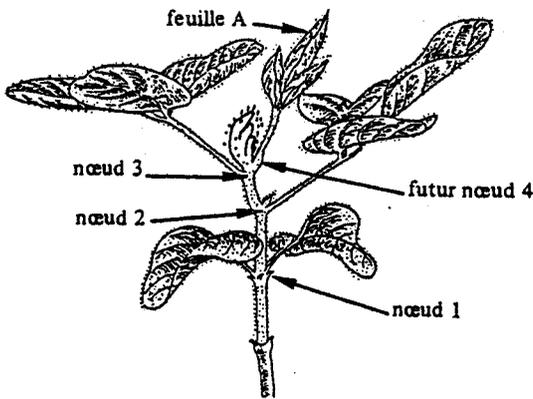
Stade V.E. : Emergence des cotylédons.



Stade V1 : Premier nœud. Développement complet des feuilles unifoliées.

Stade V2 : Deuxième nœud.

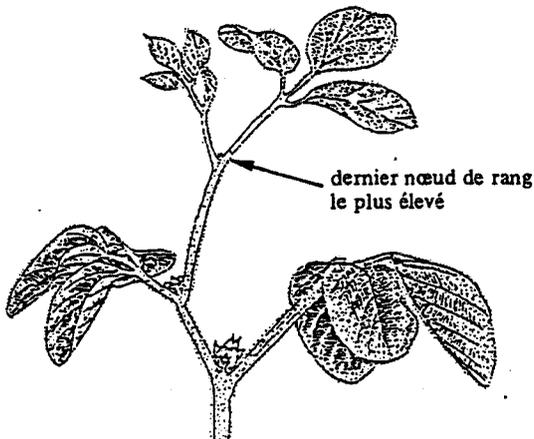
Principe de numérotation des nœuds



Stade V3 : Le nœud 4 sera pris en compte lorsque les bords du limbe de la feuille A ne se toucheront plus. Seuls les nœuds de la tige principale comptent.

Stade Vn : n^{ième} nœud.

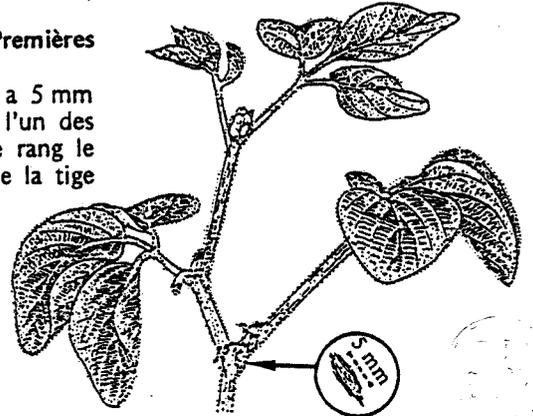
Stade R1 : Début floraison. Une fleur est ouverte sur la tige principale à n'importe quel nœud.



Stade R2 : Pleine floraison. Fleur ouverte à l'un des 2 nœuds de rang le plus élevé.

Stade R3 : Premières gousses.

Une gousse a 5 mm de long sur l'un des 4 nœuds de rang le plus élevé de la tige principale.



Stade R4 : Gousses.

Une gousse de 2 cm de long apparaît à l'un des 4 nœuds de rang le plus élevé de la tige principale.



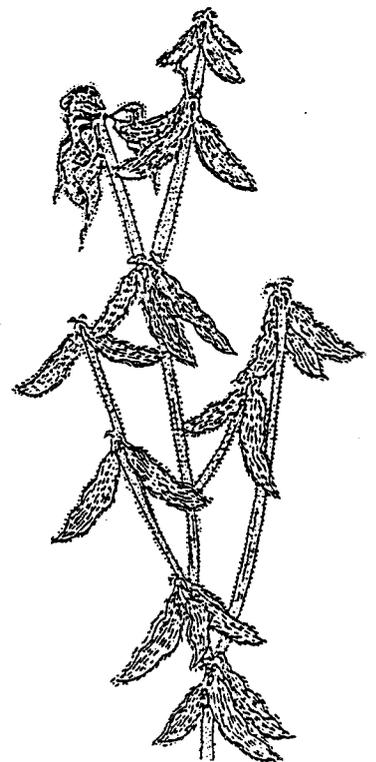
Stade R5 : la graine mesure 3 mm dans l'une des gousses de l'un des 4 nœuds de rang le plus élevé de la tige principale.



Stade R6 : grossissement des graines. Gousse contenant une graine verte qui remplit entièrement la cavité sur l'un des 4 nœuds de rang le plus élevé de la tige principale.

Stade R7 : Une gousse contenant au moins une graine a atteint sa couleur de maturité (marron).

Stade R8 : maturité. 90 % des gousses ont atteint leur stade de maturité (couleur marron).



de 3 par semaine. On considère qu'un stade donné est atteint quand au moins 50% des plantes observées a atteint le stade en question.

- récolte : l'humidité résiduelle et le poids des mille grains sont mesurés à ce stade.

- nodulation : la nodulation a été contrôlée en cours de végétation par comptage du nombre de plantes nodulées, et du nombre de nodules par plante.

VIII / METHODES DE PREPARATION ET DE CONCENTRATION DE LA BIOMASSE.

1 / CONCENTRATION DE LA BIOMASSE.

1.1 / Centrifugation en pots.

Les petites quantités de culture (1 litre) sont centrifugées en pots Nalgène de 250 ml stériles à 11000 tours/min au moyen d'une centrifugeuse Beckman, rotor JA14 pendant 10 minutes.

1.2 / Centrifugation en continu.

Les quantités de culture plus importantes, sont centrifugées en continu au moyen d'une centrifugeuse de paillasse, type Labofuge 15000. La vitesse de rotation angulaire du rotor, d'une capacité de sédimentation de 300ml est de 10000 tours/min ; ce qui correspond à une accélération angulaire de 7500g. Les culots de sédimentation sont ensuite récupérés et remis en suspension dans le support d'atomisation. Lorsque les cellules ne peuvent être déshydratées le jour même, les concentrés cellulaires obtenus sont congelés en état.

2 / INCLUSION DE MICROORGANISMES DANS DES GELS D'ALGINATE.

Des inoculums déshydratés réalisés à partir de gels d'alginate, suivant le protocole du brevet EP 0 083 267 A1 (91) ont été réalisés à titre comparatif. L'obtention des gels est réalisée comme suit.

1 à 2 g d'alginate sont ajoutés en pluie dans 100 ml d'une culture bactérienne en début de phase stationnaire (milieu TY) ou dans 100 ml de concentré cellulaire sous agitation. Des alginates de différentes

viscosités ont été employés (Satialgine S60 : 20-25cPo ; S550 : 400-750 cPo ; S1100 : 1000-1200cPo)

La réticulation est obtenue par l'emploi de sels de calcium (solution à 170 g/litre de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou à 6 g/litre de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.) Il y a échange des ions Ca^{++} et H^+ au sein d'une solution d'alginate alcalin, ce qui provoque la réticulation des gels.

La réticulation en forme de billes est réalisée en établissant un goutte à goutte de la suspension bactérienne dans la solution de sel de calcium, mise en mouvement par agitation magnétique. La réticulation en masse est obtenue en versant la solution de calcium dans la culture maintenue en agitation. Les gels sont ensuite déshydratés en chambre de séchage.

IX / METHODES DE DESHYDRATATION DE LA BIOMASSE.

Trois méthodes ont été employées pour la déshydratation de la biomasse :

- l'atomisation. (137)
- la déshydratation en deux étapes, atomisation et emploi d'enceintes à humidité relative contrôlée.
- la déshydratation en chambre de séchage à air pulsé.

Les deux premières méthodes s'appliquent au traitement des suspensions bactériennes, alors que la dessiccation en chambre de séchage, s'applique à des phases solides ou semi-solides telles que des gels contenant moins de 85 % d'eau.

1 / DESHYDRATATION PAR ATOMISATION.

1.1 / Principe.

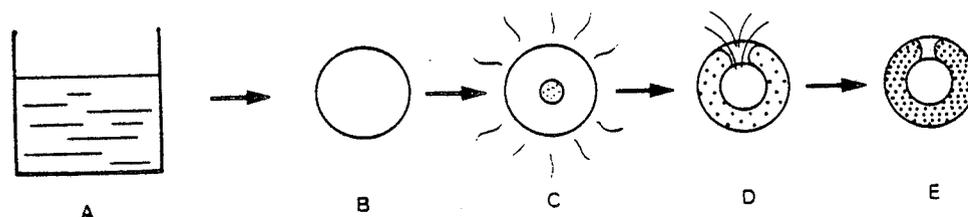
Le séchage d'un produit liquide ou colloïdal par atomisation, consiste à éliminer le solvant (par ex. de l'eau) par pulvérisation du produit dans un courant d'air chauffé à une température d'entrée supérieure à la température d'ébullition du solvant.

Pour les produits organiques non cristallins, ce dernier s'évapore dans un premier temps de la surface des goutelettes, puis il se forme à

l'intérieur du produit pulvérisé une bulle de vapeur qui éclate sous l'effet d'une pression de vapeur croissante. Le produit final, qui prend la forme de globules creux (figure 3), est séparé du flux d'air dans le cyclône, la vapeur étant éliminée dans le courant d'air chaud.

Figure 3 :

Représentation schématique de la dessiccation par atomisation de produits organiques non cristallins.



1.2 / Conditions expérimentales.

1.2.1 / Description du matériel.

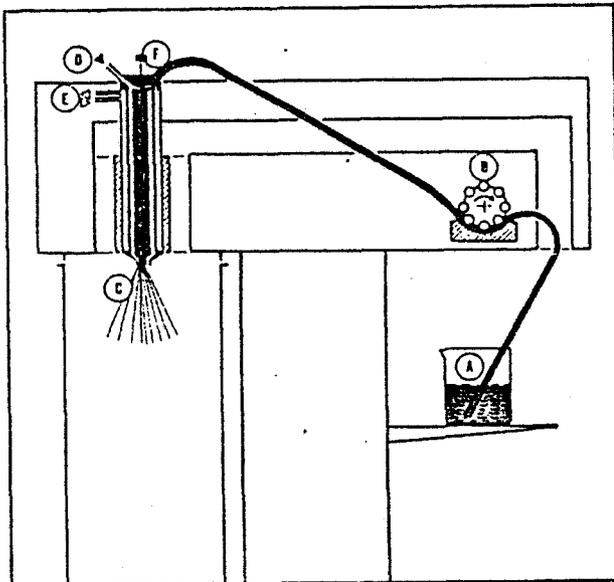
L'atomiseur de laboratoire Büchi 190 a été utilisé pour la déshydratation des concentrés cellulaires. Il fonctionne selon le principe de l'atomisation par buse en courant parallèle, c'est à dire que le produit atomisé et l'air de dessiccation s'écoulent dans la même direction. Il permet en outre le séchage de petites quantités de produit.

caractéristiques techniques :

- L'alimentation en produit se fait au moyen d'un tuyau branché sur pompe péristaltique (figure 4).
- La circulation du produit et de l'air sont schématisés dans la figure 5.
- L'alimentation en air peut se faire suivant les modalités suivantes.
 - température maximale : 220°C
 - débit maximal : 45 m³ / heure
 - pression de l'air comprimé : 5 à 8 Bars

Figure 4

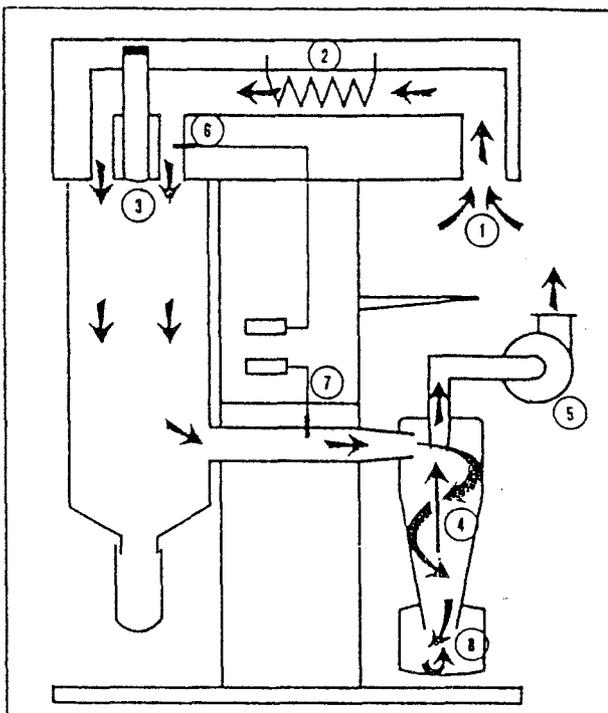
Schéma de l'alimentation en produit de l'atomiseur Büchi 190.



- A Solution, émulsion ou dispersion du produit
- B Pompe péristaltique
- C Canal du produit
- D Raccordement pour air comprimé ou gaz inerte
- E Raccordement de l'eau de refroidissement
- F Pointeau avec canal à rainure. Le pointeau sert à déboucher la buse lors de colmatages éventuels par le produit. Pour des produits difficiles, le pointeau peut être actionné automatiquement de manière pneumatique. Ce dispositif est en vente comme accessoire.

Figure 5

Schéma de la circulation du produit et de l'air dans l'atomiseur



- 1 Aspiration-Ouverture
- 2 Chauffage
- 3 Admission à écoulement stabilisé de la chambre de dessiccation
- 4 Cyclone. Le produit est ici séparé du flux d'air
- 5 Appareil aspiratoire
- 6 Prise de température de l'air à l'admission. Cette température peut être réglée à l'aide du chauffage
- 7 Prise de température de l'air à la sortie. Le choix optimal de la différence de température entre celle d'entrée et celle de sortie est un des points importants de la dessiccation par dispersion. La température de sortie ne peut pas être ajustée arbitrairement, elle résulte de la combinaison entre la température d'entrée, le réglage de l'aspiration et le débit de la pompe.
- 8 Récipient collecteur pour produit

1.2.2 / Protocole expérimental.

Dans la plupart de nos essais, le protocole suivant a été employé :

Les culots cellulaires obtenus par centrifugation sont remis en suspension dans le support d'atomisation à 10 % de matière sèche, préalablement stérilisé et dont le volume est ramené au dixième du volume initial de culture. Le concentré cellulaire est alors atomisé, après stérilisation préalable de l'atomiseur par circulation d'air comprimé, chauffé à 220°C pendant 10 min.

Les températures d'entrée et de sortie d'air sont respectivement ajustées à 135°C et 70°C \pm 10°C, et le débit de produit établi à 600 ml / heure. La température de sortie est difficile à stabiliser et est intimement liée au débit du produit et à la dépression causée par l'aspiration. Dans nos conditions expérimentales, une aspiration élevée (position 15 sur le régulateur), permet un bon rendement en matière sèche.

1.2.3 / Mesures effectuées.

La poudre obtenue est récupérée à la sortie du cyclône dans un collecteur en verre. Plusieurs paramètres sont alors mesurés.

- teneur en eau résiduelle.
- dénombrement des cellules viables.
- rendement en matière sèche (quantité de matière sèche récupérée dans le collecteur / quantité de matière sèche initiale).

2 / DESHYDRATATION EN CHAMBRE DE SECHAGE.

2.1 / Principe.

Les substances solides ou semi-solides, telles que des graines enrobées ou des gels, sont déshydratées en chambre de séchage dans un courant d'air pulsé à température variable. Cette technique permet un séchage rapide, uniforme et ménagé par brassage permanent des matériaux qui offrent ainsi une grande surface de séchage.

2.2 / Description du matériel.

Le sécheur Retsch de laboratoire (figure 6), d'une capacité maximale de 5 kg a été utilisé. Une soufflerie (débit d'air variable de 900 à 1800 l / min) envoie de l'air filtré sur un élément chauffant (température réglable de 40°C à 120°C) au dessus duquel est fixé un tamis. Ce tamis sert à la réception des matériaux à déshydrater. Sous l'effet du courant d'air chaud, ils sont brassés dans le bac de séchage en inox, au dessus duquel est placé un sac-filtre de sortie d'air.

Des chambres de séchage plus petites, d'une capacité de 300 ml sont adaptables sur l'appareil.

3 / METHODES DE CONSERVATION DE LA BIOMASSE.

3.1 / Conditionnement des inoculats déshydratés.

A la sortie de l'atomiseur, les poudres obtenues sont réparties en flacons hermétiques de 150 ml (flacon à plasma) ou 30 ml (flacons type anaérobie) suivant les quantités d'inoculat produit.

Les récipients de ce type permettent grâce à leurs bouchons de caoutchouc hermétiques d'établir à l'intérieur de l'enceinte, l'atmosphère désirée :

- conditionnement sous air
- conditionnement sous azote
- conditionnement sous vide partiel (10^{-3} mm Hg)

Les inoculats ainsi conditionnés sont alors placés à différentes températures de conservation.

3.2 / Méthodes d'étude de la conservation des inoculats de "Bradyrhizobium japonicum" à différentes humidités relatives.

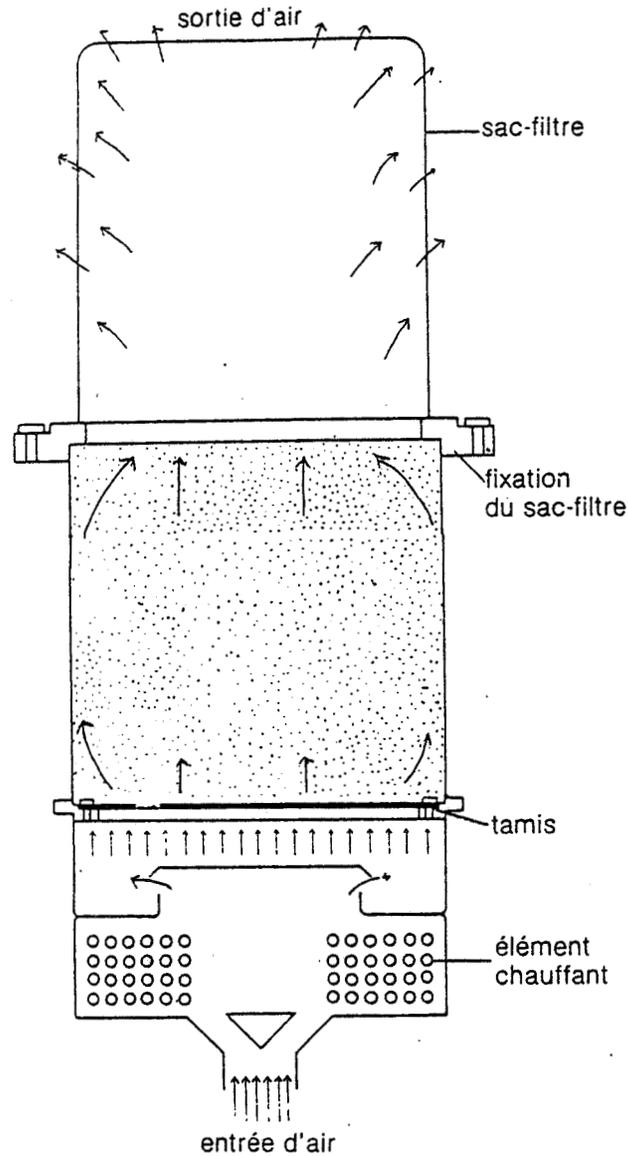
3.2.1 / Principe

Les inoculats déshydratés sont placés dans des enceintes closes contenant des boues salines.

D'après la théorie du corps pur, dans un système hétérogène à deux phases, la phase liquide et la phase gazeuse d'un même corps pur sont deux systèmes ouverts. L'entropie est donc une fonction $G=f(P, T, n)$ (n = nombre de moles). Il vient

Figure 6

Schéma du sécheur de laboratoire Retsch.



• CARACTÉRISTIQUES TECHNIQUES

- Capacité : environ 5 kg
- température : 40 à 120 °C ± 4 °C réglable en continu
- réglage de la puissance de chauffe : 0 à 2 000 W
- thermomètre de contrôle de la température
- soufflerie à 3 étages, blindée
- débit d'air réglable en continu 900 à 1 800 l/mn
- filtre à air côté aspiration, finesse 10 à 15µm, taux d'épuration de l'air environ 96 %
- insonorisation grâce à un silencieux installé au niveau de l'aspiration ainsi qu'un amortissement de la soufflerie.
- filtre à air à l'échappement : sac filtre
- chambre en acier inoxydable
- capacité de la chambre : 6 litres
- boîtier en tôle d'acier recouvert de polyamide
- alimentation 220 V - 50 Hz - 2 750 W
- dimensions : l × h × p = 300 × 520 × 460 mm / poids : 19 kg
(avec le filtre à air à l'échappement la hauteur atteint 920 mm).

$$dG = \left(\frac{\delta G}{\delta P} \right)_{T,n} dP + \left(\frac{\delta G}{\delta T} \right)_{P,n} dT + \left(\frac{\delta G}{\delta n} \right)_{P,T} dn$$

On note $\left(\frac{\delta G}{\delta n} \right)_{P,T} = \mu = \text{potentiel chimique (grandeur intensive)}$

A température et pression constantes,

$$G = dG_{\text{vap}} + dG_{\text{liq}} = \mu dn + \mu' dn'$$

Or $dn = -dn'$ d'où $dG = (\mu - \mu')dn$. Il y a équilibre quand $dG = 0$, c'est à dire $\mu = \mu'$. On peut généraliser au cas de plusieurs corps purs dans deux phases différentes. Pour chaque corps pur, le potentiel chimique de chaque phase est le même à l'équilibre.

On démontre que dans le cas de mélange de gaz parfaits $G = \sum G_i$ (G_i : entropie de chaque gaz)

$$dG_i = v dp_i - S dt \text{ et dans une isotherme } dG_i = \frac{nRT}{P_i} dP_i$$

$$\text{d'où } G_i(P_i, T) - G_i^\circ(P_0, T) = nRT \text{ Log } \frac{P_i}{P_0}$$

$$\frac{\delta(G_i - G_i^\circ)}{\delta n} = RT \text{ Log } \frac{P_i}{P_0} \quad \text{On écrit } \frac{P_i}{P_0} = a_i$$

$$\mu_i = \frac{\delta G_i}{\delta n}, \quad \mu_0 = \frac{\delta G_i^\circ}{\delta n} \quad \langle \implies \rangle \quad \mu_i = \mu_i^\circ + RT \text{ Log } a_i$$

Pour les gaz réels, on introduit des notions d'activité.

En assimilant la vapeur d'eau à un gaz parfait dans un tel système, il vient :

$$\mu_w = \mu_w^\circ + RT \text{ Log } a_w ; \quad a_w = \frac{P'_w}{P^\circ_w}$$

R : constante des gaz parfaits

T : température absolue (°K).

P'_w : pression de vapeur d'eau dans le mélange.

P°_w : pression de vapeur d'eau de référence (pression de vapeur d'eau pure à la même température.).

μ_w est une grandeur intensive caractéristique d'état. A l'équilibre, (T, P, n constants), les potentiels chimiques des deux phases sont identiques. L'activité ainsi définie est une constante d'état caractéristique du système, qui dépend de la pression et de la température.

Parallèlement, on définit l'humidité relative de la phase gazeuse d'un système comme étant le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau dans le système / pression de vapeur saturante d'eau à P et T données. Dans la pratique, activité de l'eau et humidité relative ont des valeurs très proches.

3.2.2 / Solutions saturées de sels ou de solutés de faible poids moléculaire.

L'emploi de solutions saturées à chaud par les sels dans lesquelles un excès de cristaux est ajouté, ou l'emploi de solutions à concentration connue de tels sels, permet de modifier les valeurs du potentiel chimique de l'eau dans ces solutions et d'obtenir ainsi des gammes de solutions à différentes a_w .

Il est nécessaire d'employer des enceintes de faible volume (afin que l'équilibre s'établisse rapidement) et d'introduire dans l'enceinte des échantillons contenant une masse d'eau quantitativement négligeable par rapport à celle contenue dans la solution. Dans ces conditions, le potentiel chimique de l'eau dans la phase vapeur et dans la phase liquide, sont sensiblement égales, et l' a_w est celle induite par la solution étalon. Les principales valeurs d' a_w connues correspondant aux solutions saturées de sels ou de solutés de faible poids moléculaire sont résumées dans le tableau III.

3.2.3 / Protocole expérimental.

Des flacons à plasma de 150 ml fermés par un bouchon de caoutchouc sont remplis au 1 / 5^{ème} par les boues salines. Des fractions d'environ 100 mg d'inoculum sont répartis dans des tubes de 50 x 10 mm et placés dans les enceintes.

Les enceintes sont ensuite placées sous azote, sous vide ou sous air suivant les besoins de l'expérimentation. Les numérations sont faites sur les échantillons à intervalles de temps réguliers, afin d'étudier l'influence de l' a_w de conservation sur la survie des cellules de Bradyrhizobium japonicum.

Parallèlement une partie de l'inoculum est déshydratée sous une a_w proche de 0, puis répartie dans des tubes par fraction de 200 mg qui sont placés dans les différentes enceintes. Après 15 jours, les échantillons serviront à établir les isothermes d'adsorption des inoculats par pesée et calcul de la teneur en eau résiduelle. Quatre tubes par valeur d' a_w sont utilisés à cette fin.

Suivant le même protocole, on étudie la survie de B. japonicum sur les graines bactérisées en les plaçant par échantillons de 20 dans les enceintes.

X / BACTERISATION PAR ENROBAGE DE GRAINES.

La bactérisation par enrobage de graines a été effectuée soit en turbine, soit par homogénéisation directe obtenue par agitation vigoureuse des différents constituants.

La première méthode a été appliquée pour la bactérisation par des concentrés cellulaires, la deuxième pour le pelliculage d'inoculum tourbe. Les protocoles d'application sont les suivants :

1 / INOCULUM TOURBE.

Pour 200 g de graines, 2 à 5 ml de la substance adhésive retenue sont ajoutés aux graines; l'ensemble est homogénéisé. L'inoculum tourbe (2 à 4 g) est appliqué et mélangé jusqu'à obtention d'une couche homogène. L'ensemble est légèrement déshydraté en chambre de séchage, à

Tableau III

Activité de l'eau des solutions saturées pour trois températures d'après Bizot et Coll., cités par Multon et Coll. (124 bis)

Soluté	20°C	25°C	30°C
NaOH	0,0698	0,0595	0,0687
LiCl	0,114	0,1115	0,1116
KC ₂ H ₃ O ₂	0,231	0,226	0,220
MgCl ₂	0,303	0,3273	0,3238
NaI	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	0,436
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
KI	0,6983	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

température minimale, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de compactage des semences enrobées.

2 / CONCENTRES CELLULAIRES.

400 g de graines sont placés en turbine en agitation permanente. 2 ml du produit d'enrobage sont ajoutés au concentré cellulaire (10 ml) qui est alors pulvérisé sur les semences par pistolet à air comprimé. 50 ml (environ) du produit sont ensuite pulvérisés autour des bactéries. Simultanément les graines sont soumises à un courant d'air chaud pulsé afin d'éliminer le solvant.

XI / METHODES STATISTIQUES.

Les méthodes d'analyse statistique suivantes ont été utilisées.

- analyse de la variance à 1, 2 ou 3 critères de classification ;
- méthodes relatives à la régression ;
- comparaison multiple de moyennes par la méthode de la plus petite amplitude significative ;
- test de Student, Hartley...(37).

Les calculs relatifs à la réalisation des trois premiers types d'analyse ainsi que les tables correspondantes sont reportés en annexe (p 201).

RESULTATS ET COMMENTAIRES.

1ère PARTIE

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES

ET

DES PARAMETRES DE CULTURE

A / ETUDE ET SELECTION DES SOUCHES

I / CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES A L'ETAT LIBRE.

L'observation nous a montré certaines caractéristiques physiologiques que nous avons jugées utile de rassembler dans le tableau IV. Ces caractéristiques concernent:

- la forme des colonies après culture sur boîte de Pétri ; les colonies sont soit petites et dépourvues de quantités importantes de polysaccharides, soit larges et muqueuses .
- l'aptitude des souches à produire du polysaccharide de type "slime" en milieu liquide. Ceci s'observe par l'aspect d'un culot de centrifugation qui apparait soit net, soit séparé en deux phases, l'une constituée des cellules, l'autre des polysaccharides.
- la mobilité des souches sur milieu TY gélosé à 0,3% mesurée par le rayon de la nappe bactérienne après une semaine de migration à 29°C. Ces observations sont récapitulées dans le tableau IV.

II / "SCREENING" DES SOUCHES EN SYMBIOSE : ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES.

1 / A pH NEUTRE.

Les plantules de soja Glycine max (L.Merr.) cv. Mapple arrow (10 par souche), inoculées stérilement par immersion dans la suspension bactérienne, sont transférées dans les pots de culture remplis de milieu de STREET modifié à pH 7.

La culture des plantules est arrêtée après six semaines (stade R1) dans la première expérimentation, et après quatre semaines dans la seconde (stade V4).

1.1 / Infectivité - Nodulation (tableau V)

Toutes les souches testées sont infectives, dans le sens où elles induisent la formation de nodosités, au site d'infection primaire (collet). La vitesse de différenciation des nodules est par contre variable:

TABLEAU IV

Caractéristiques physiologiques à l'état libre des souches de Bradyrhizobium japonicum.

SOUCHE	COLONIES	POLYSACCHARIDE	MOBILITE
J67	-	-	++
J68	-	-	++
3.1	-	-	++
3.2	-	-	++
3.4.3	-	-	++
3.8	+	+	+
3.14	+	+	+-
3.15	+	+	++
3.15b3	+	+	+
3.20	+	+	++
3.22	+	+	+
3.30	-	-	+
3.32	+	+	-
3.40	+	+	-
3.41	+	+	+
3.54bis	+	+	+-
3.55	+	+	-
R3.4.1	+	+	+
CB1809	+	+	-
J5	+	+	+
J315	+	+	-
T83005	+	+	-
3.56	+	+	-
3.57	+	+	+-

légende

aspect des colonies: - petites non muqueuses ; + larges et muqueuses

production de polysaccharides de type "slime" en milieu liquide :

- pas de production ; + production de polysaccharides

mobilité des souches mesurée par le rayon de la nappe de migration:

-: rayon < 2mm ; +-: 2mm < rayon < 5mm ; +: 5mm < rayon < 10mm ; ++: rayon > 10mm

Le pourcentage de plantes nodulées et le nombre de nodules n'évoluent plus après une semaine pour la majorité des souches alors que pour cinq souches (3.1, 3.2, 3.4.3, J67, R3.4.1), les nodules n'apparaissent qu'entre dix jours environ et trois semaines après inoculation.

1.2 / Efficience des souches. (tableau V, figure 7)

Le test de réduction de l'acétylène et le rendement en matière sèche des parties aériennes ont été utilisés, comme estimateurs de l'activité nitrogénasique des nodules. Dans nos conditions expérimentales, des différences importantes d'activité nitrogénasique entre les souches sont mises en évidence.

Les souches ont été classées arbitrairement en trois catégories :

- Les souches présentant une efficience élevée dans les deux expérimentations : 3.2 ; 3.4.3 ; 3.1 ; 3.32
- Les souches d'efficience moyenne : J67 ; T83005 ; BIOPROX ; 3.30 ; 3.41 ; 3.40 ; 3.28 ; 3.20 ; 3.15b3 ; 3.14 ; 3.54bis ; J5 ; 3.15
- Les souches peu efficaces: R3.4.1 ; J315 ; 3.8 ; CB1809 ; 3.22

Pour les expérimentations ultérieures, les souches suivantes ont été retenues :

- 3.2 la plus efficace, et ayant une nodulation lente
- 3.32 très efficace, et ayant une nodulation rapide
- souche G49 isolée d'un inoculum commercial BIOPROX

1.3 / Commentaires

1.3.1 / Acidification du milieu.

En moins de deux jours en phase de croissance, une baisse générale du pH à 3,5-4 a été observée dans le milieu contenant les plantes nodulées, alors que ce phénomène ne se produit pas avec les témoins non inoculés. Nous avons donc veillé à maintenir le pH au dessus de 5,5 , en arrosant les plantules avec une solution diluée de potasse. Ce phénomène a été étudié par Jarvis et Hatch (88). Leurs travaux montrent, que l'acidification de la rhizosphère est directement liée à l'assimilation de l'azote soit minéral, soit atmosphérique ainsi qu'à une croissance rapide des plantes. On pense que la synthèse d'acide organique se

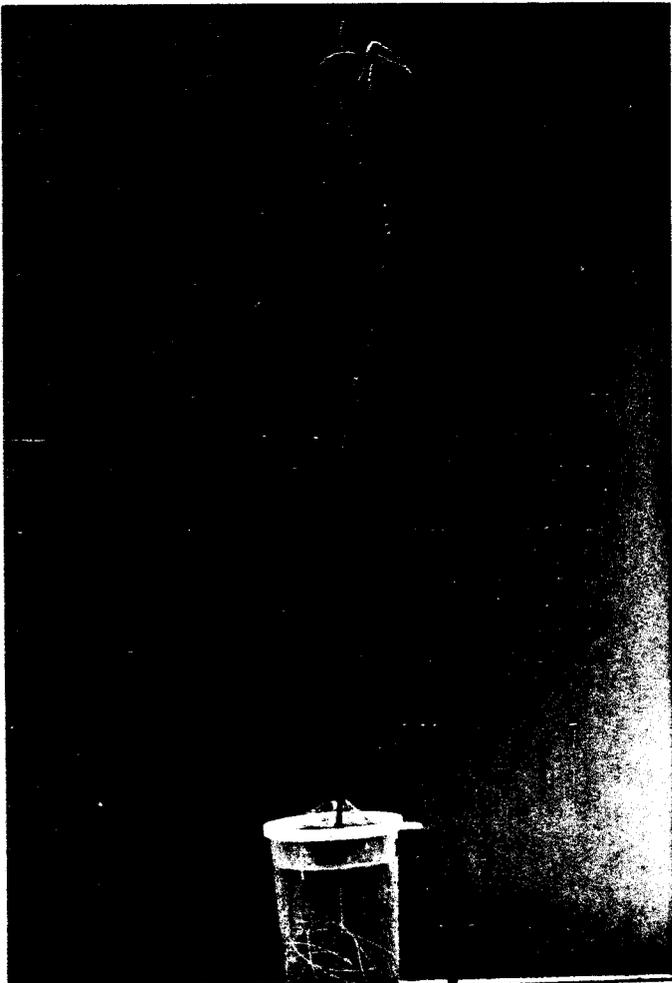
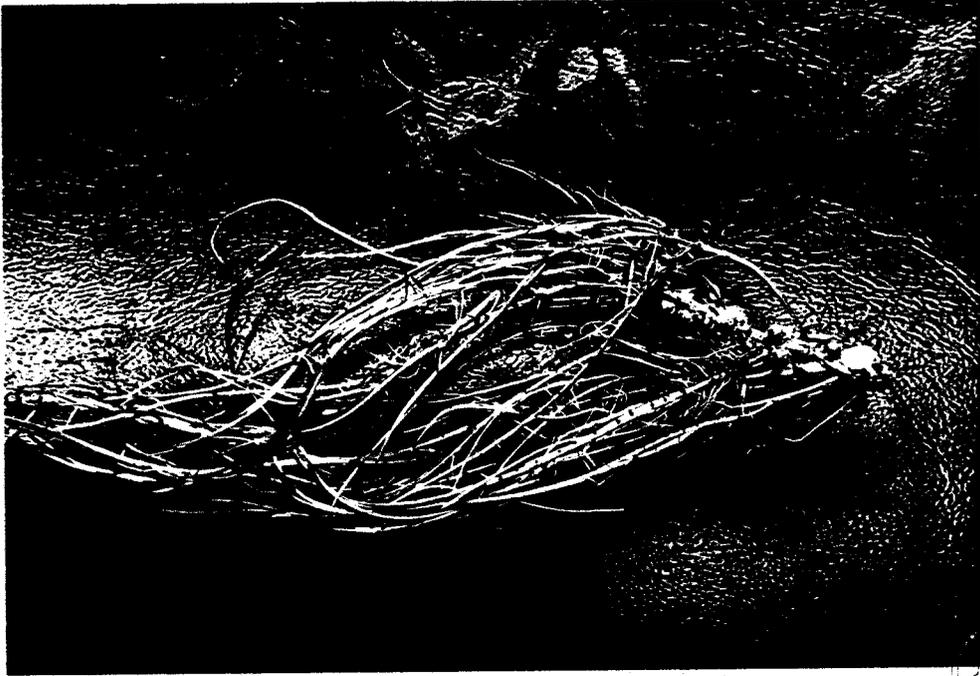
Tableau V

Caractéristiques symbiotiques des souches à pH neutre.
infectivité et efficience.

souche	% de plantes nodulées	nb moyen de nodules par plante		efficience horaire par plante (μ mole)		poids sec /plante parties aériennes (mg)
		Exp.1 28 jours	Exp.2 35 jours	Exp.1 28 jours	Exp.2 35 jours	
3.2	80 %	5,0	5,3	0,55	2,0	670
3.4.3	80 %	3,0	2,6	0,42	1,7	500
3.1	100 %	4,3	4,6	0,31	1,5	500
J67	100 %	ND	20,2	ND	1,3	610
3.32	100 %	20,1	22,2	0,38	1,4	620
Bioprox G49	100 %	17,8	18,6	0,30	1,2	535
T83005	100 %	20,4	22,0	0,28	1,1	620
3.40	100 %	17,4	16,8	0,24	1,1	535
3.28	100 %	9,2	10,6	0,27	1,0	620
3.30	100 %	12,4	12,0	0,21	1,0	600
3.20	100 %	17,0	18,2	0,14	1,0	620
J 5	100 %	18,0	19,6	0,17	1,0	550
3.41	100 %	14,8	14,3	0,30	0,9	600
3.15b3	100 %	14,6	12,5	0,19	0,9	510
3.54bis	100 %	17,5	18,5	0,24	0,9	500
3.15	100 %	13,0	13,4	0,30	0,8	550
R3.4.1	100 %	16,0	17,4	0,14	0,8	540
3.14	100 %	13,0	17,2	0,24	0,8	540
3.8	100 %	10,0	15,2	0,13	0,6	510
CB1809	100 %	14,5	16,2	0,09	0,6	560
J 315	100 %	14,3	16,0	0,12	0,6	590
3.22	100 %	16,0	14,0	0,07	0,4	500
témoïn	0 %	0	0	0	0	470

Figure 7
Photos de culture in vitro de plantules de soja.

racines nodulées.



Culture de plantule en pots à
prélèvement.



réalisation du test de
réduction de l'acétylène.

produit dans les tissus, car il n'existe pas de mécanisme de neutralisation des ions H^+ intracellulaires qui sont excrétés dans le milieu en contrepartie de l'absorption de cations minéraux. Ce mécanisme aiderait les légumineuses à absorber les cations du sol en augmentant leur disponibilité, mais aboutirait à une acidification non négligeable du sol: par exemple, il faut apporter un amendement de 80 kg de $CaCO_3$ pour compenser l'acidification induite par la production d'1 tonne de matière sèche de luzerne (88).

1.3.2 / Limites de validité des résultats.

Facteurs inhérents à la méthode.

L'emploi de la mesure de l'A.R.A. comme estimateur des quantités d'azote fixé suppose que l'activité de la nitrogénase soit identique en présence d'acétylène et en présence d'azote. Or, l'acétylène provoque un déclin rapide de l'activité nitrogénasique et de la respiration des nodules, dans les minutes qui suivent son injection dans l'enceinte (122).

De plus, l'emploi de racines excisées aboutit à une chute de l'activité enzymatique des nodules après cinquante minutes et l'activité nitrogénasique enregistrée se révèle n'être que de 20% à 50% de l'activité mesurée sur plantes entières (10, 79).

Les valeurs calculées ici sont donc à prendre à titre comparatif en prenant comme hypothèse que les erreurs liées à la méthode sont sensiblement de même amplitude pour toutes les souches.

Facteurs inhérents à la symbiose.

L'efficacité traduit l'aptitude des souches testées à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec la plante-hôte. Cette donnée reflète de fait la qualité de l'association Rhizobium-légumineuse. Ainsi, certaines souches très efficaces sur certains cultivars, ne le sont pas sur d'autres et vice-versa (48, 96, 127). Ces observations ont été faites aussi bien sur le trèfle et la luzerne (127), que sur le soja (48, 96). Il est donc important d'effectuer la sélection des souches en tenant compte des variétés de soja, l'idéal étant d'avoir une souche efficace sur de nombreuses variétés.

Cette compatibilité s'exprime en retour par l'aptitude de la plante-hôte à sélectionner préférentiellement une souche parmi d'autres (18, 48, 128). Dans la pratique, certaines variétés sélectionnées pour des rendements supérieurs, ne présentent au champ cette caractéristique, que si elles sont nodulées par la ou les souches de sélection. Cette adaptation de la plante hôte est héréditaire, et s'exprime d'un côté par l'efficacité de la symbiose, et de l'autre par l'aptitude de la plante hôte à sélectionner le microsymbionte parmi d'autres espèces indigènes.

Notre étude se limite donc à la variété Mapple Arrow, employée comme souche de référence du groupe 00. Parmi les souches retenues, nous avons jugé utile dans un deuxième temps de les tester en compétition avec d'autres souches (voir III).

2 / A pH ACIDE (Tableau VI).

La culture des plantules est réalisée suivant le même protocole que précédemment, avec 5 plantules par souche étudiée ; La culture est arrêtée au bout de six semaines. Les pH initiaux et finaux sont respectivement de 5,5 et 3,5 à 4. Dans ces conditions, au moment de l'arrêt de la culture, certaines souches maintiennent leurs capacités symbiotiques à pH4.

2.1 / infectivité des souches.

Dans la zone de pH 4 à 5,5, toutes les souches induisent une nodulation moins abondante, voire absente ou très faible pour les souches 3.1, 3.2, J315, et R3.4.1.

2.2 / efficacité des souches.

A l'issue de la culture une mesure de l'activité nitrogénasique a été effectuée. La matière sèche des parties aériennes a été pesée après 24 heures de séchage à 110°C.

En fin de culture, certaines symbioses sont totalement inefficaces (cas des souches 3.1, 3.2, J315, CB1809, R.3.4.1, 3.40), alors que d'autres ont gardé une activité nitrogénasique élevée (cas des souches 3.54bis, 3.15, 3.15b3, 3.22). Dans tous les cas la quantité de

Tableau VI

Caractéristiques symbiotiques des souches à pH acide.
infectivité et efficience.

Souche	% de plantes nodulées	nb de nodules par plante		efficience horaire(µmole) par plante	poids/plante des parties aériennes (mg)
		15 jours	42 jours		
CB1809	80 %	9,2	10,5	0,065	180
J5	100 %	4,6	7,2	0,160	155
J315	60 %	3,0	2,5	0,005	178
T83005	100 %	4,8	9,6	0,180	179
3.1	20 %	0,0	1,0	0,002	204
3.2	40 %	1,0	1,0	0,004	189
3.8	100 %	10,6	12,4	0,070	177
3.14	100 %	7,2	8,2	0,094	175
3.15	100 %	2,2	8,6	0,32	187
3.15b3	100 %	3,0	7,5	0,36	202
3.20	100 %	5,5	8,8	0,170	150
3.22	80 %	3,3	7,0	0,25	200
3.28	80 %	9,2	6,0	0,074	228
3.30	100 %	4,2	8,8	0,150	147
3.32	100 %	5,6	9,0	0,170	130
3.40	100 %	9,3	5,3	0,026	181
3.41	100 %	8,8	8,0	0,087	176
3.54bis	100 %	3,6	7,0	0,37	218
3.4.3	80 %	1,8	3,8	0,14	171
R.3.4.1	20 %	0,0	5,0	0,002	190
témoin	0 %	0	0	0	192

matière sèche produite par les plantes à pH acide, est nettement inférieure à celle produite à pH neutre.

2.3 / commentaires.

L'A.R.A. mesure l'activité nitrogénasique à un moment donné et les résultats de certaines mesures ne concordent pas avec le poids sec des parties aériennes (cas des souches 3.1 et 3.28 qui fournissent des poids de matière sèche élevés): ceci pourrait s'expliquer par l'existence d'une A.R.A. de valeur plus élevée, à des conditions moins drastiques (pH entre 4 et 5,5), ou par une variation naturelle aléatoire de la taille des plantules. Pour la souche 3.28, la première hypothèse est très probable car la nodulation s'est altérée en cours de culture, mais pour choisir entre ces deux hypothèses, il faudrait augmenter le nombre des plantules soumises au test, ou employer une méthode de mesure non destructive (178, 181).

Des expérimentations analogues à celles que nous avons effectuées, ont montré, par la mesure du poids sec et de l'A.R.A. de plantules cultivées en serre en conditions acides, une variabilité importante de la tolérance des souches de Bradyrhizobium japonicum aux pH acides (156). Dans notre étude, il est intéressant de noter l'existence de souches de Bradyrhizobium japonicum présentant des capacités symbiotiques élevées à pH inférieur à 5.

III / ETUDE DE LA COMPETITION ENTRE SOUCHES.

Un critère très important de la sélection d'une souche de Bradyrhizobium japonicum concerne son aptitude à noduler la plante-hôte (Glycine max (L. Merr) cv Mapple arrow) en compétition avec d'autres souches de la même espèce bactérienne. Cet aspect conditionne les chances de succès de l'implantation dans le sol de souches mises en mélange dans un inoculum ou de souches introduites dans des sols qui sont normalement pourvus de Rhizobiums spécifiques (72, 95, 100, 101). Cette étude a été réalisée avec les deux souches préalablement sélectionnées : 3.2 et 3.32. qui sont testées en compétition avec les souches J67, 3.4.3 et G49 (Bioprox).

1 / COMPETITION DE LA SOUCHE 3.2 AVEC D'AUTRES SOUCHES.

La souche 3.2, qui est très efficiente, a été testée en compétition avec les souches 3.4.3, J67, 3.32 et G49.

Pour chaque essai, cinq plantes sont mises en culture pendant six semaines. La bactérisation avec les deux souches en concentration égale dans l'inoculum est réalisée comme décrit dans Matériels et méthodes. Après des périodes de 38 à 45 jours de culture, plusieurs notations sont faites :

- nombre de nodules par plante.
- stade végétatif.
- poids sec des parties aériennes.
- efficience des symbioses par mesure de l'A.R.A. après une heure de contact avec l'acétylène.
- analyse du contenu des nodules (sur 50 nodules prélevés au hasard pour chaque essai expérimental).

Les résultats sont consignés dans les tableau VIII et figure 8.

L'analyse des résultats montre que, dans nos conditions expérimentales, la souche 3.2, très efficiente, n'est pas compétitive par rapport aux souches 3.32 et G49 (Souches à nodulation rapide synthétisant des quantités importantes de polysaccharides) ; cependant, elle réussit à noduler les plantules en compétition avec les souches 3.4.3 et J67 (ayant les mêmes caractéristiques phénotypiques que la souche 3.2).

Toutes les inoculations croisées réalisées ici, aboutissent à des symbioses de forte efficience. Cependant, seules les plantes où la souche 3.2 est quantitativement bien représentée aboutissent à une efficience au moins égale à celle de la souche 3.2 seule. Dans le cas des inoculations croisées avec les souches 3.32 et G49, où la souche 3.2 n'est pas compétitive, l'A.R.A. a des valeurs inférieures.

2 / COMPETITION DE LA SOUCHE 3.32 AVEC D'AUTRES SOUCHES.

Dans les mêmes conditions que précédemment, la compétition de la souche 3.32 avec les souches 3.2, 3.4.3, J67, G49 a été étudiée. Cette étude se limite à l'analyse du contenu des nodules suivant le même protocole que précédemment. Les résultats sont résumés dans les tableau IX et figure 9.

Tableau VIII

Etude de la compétition de la souche 3.2 avec d'autres souches.

! inoculation !	!durée ! !(jours)!	!Nombre ! !nodules!	! stade !	! poids ! ! (mg) !	! Q ! !µmoles !	! analyse nodules ! ! 3.2 - mixte - autre!
! 3.2Sm x 3.2Nm !	! 38 !	! 20 !	! R1 V4 !	! 621 !	! 4,0 !	! 82% - 8% - 8% !
! 3.2Sm x 3.32Nm !	! 41 !	! 15 !	! R2 V5 !	! 667 !	! 2,6 !	! 16% - 8% - 76% !
! 3.2Nm x 3.32Sm !	! 38 !	! 20 !	! R1 V5 !	! 540 !	! 2,1 !	! 0% - 4% - 96% !
! 3.2Sm x G 49Nm !	! 41 !	! 25 !	! R2 V5 !	! 507 !	! 3,5 !	! 2% - 8% - 90% !
! 3.2Nm x G 49Sm !	! 38 !	! 15 !	! R1 V4 !	! 504 !	! 2,6 !	! 12% - 16% - 72% !
! 3.2Sm x 3.4.3Nm !	! 45 !	! 15 !	! R3 V4 !	! 836 !	! 6,2 !	! 34% - 7% - 59% !
! 3.2Nm x 3.4.3Sm !	! 38 !	! 15 !	! R1 V4 !	! 687 !	! 3,5 !	! 12% - 16% - 72% !
! 3.2Sm x J67Nm !	! 45 !	! 20 !	! R3 V4 !	! 763 !	! 5,5 !	! 54% - 24% - 22% !
! 3.2Nm x J67Sm !	! 41 !	! 15 !	! R2 V5 !	! 623 !	! 7,1 !	! 36% - 4% - 60% !

Légende

stade: stade de développement d'après la nomenclature américaine (66).

poids: poids sec moyen des parties aériennes par plante.

Q : quantité d'éthylène produite par heure et par plante, par le test de réduction de l'acétylène.

souche Sm: souche résistante à la streptomycine

souche Nm: souche résistante à la néomycine

Figure 8

Etude de la compétition de la souche 3.2 avec d'autres souches.

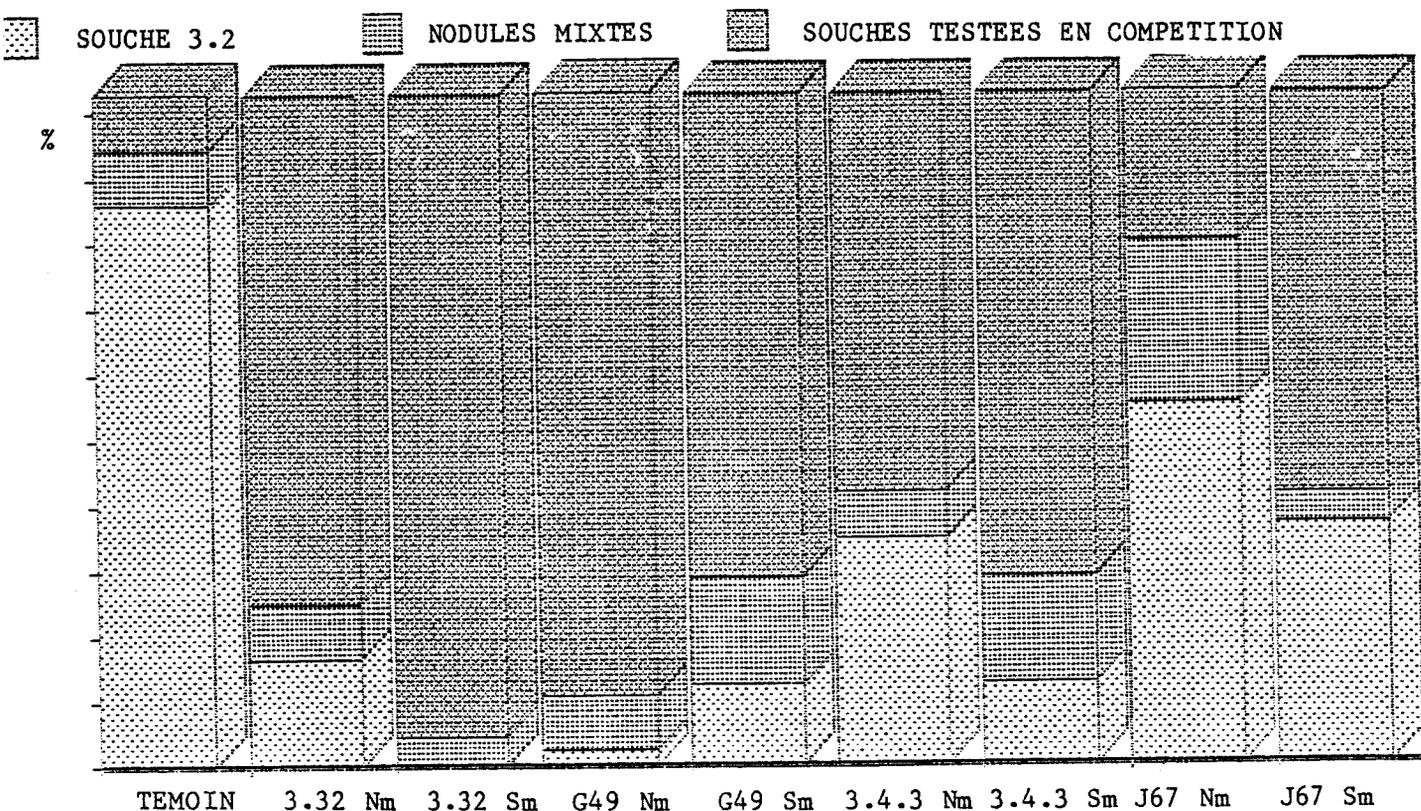


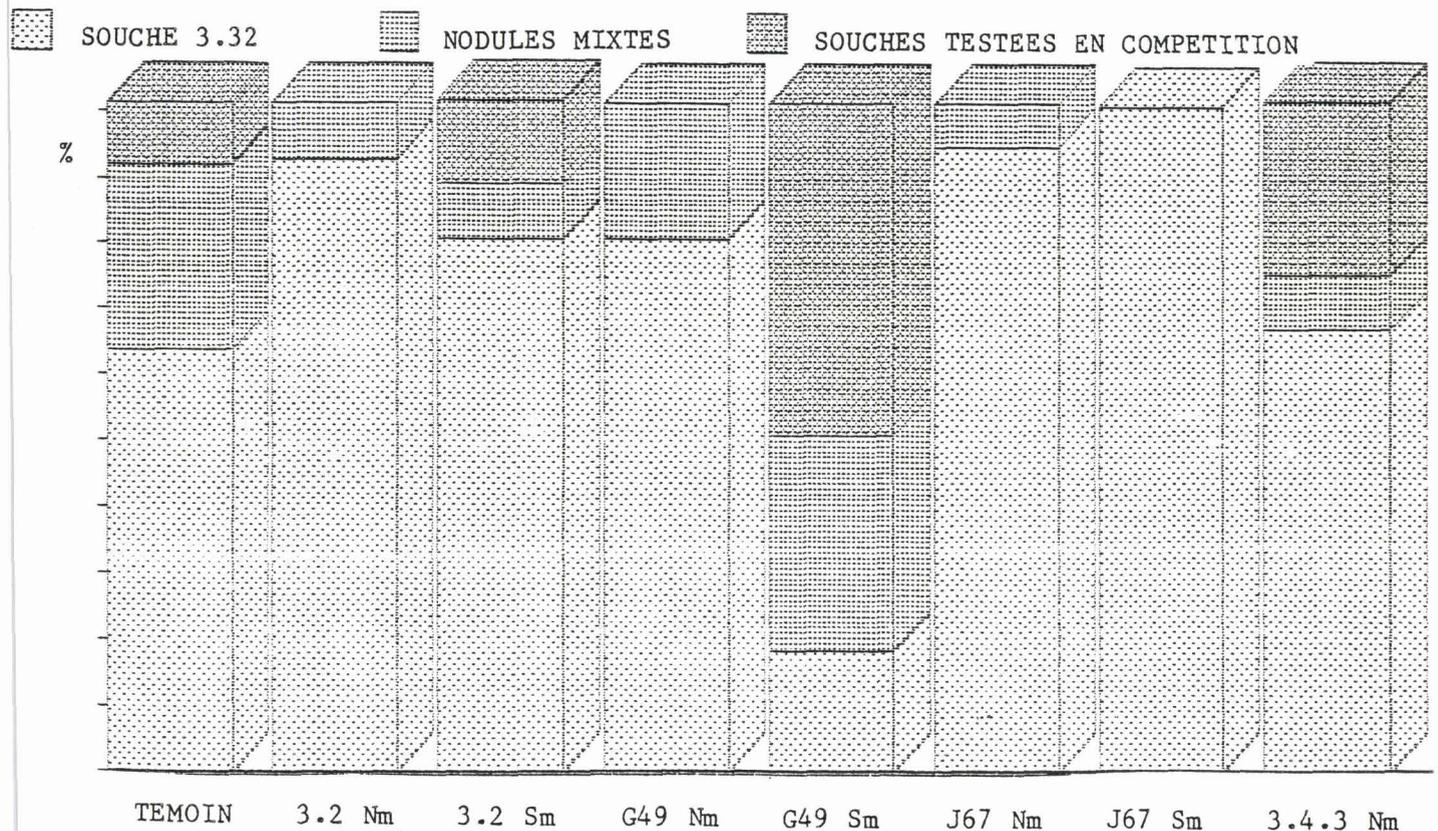
Tableau IX

Etude de la compétition de la souche 3.32 avec d'autres souches

! Inoculation !	! Nombre de ! nodules	! analyse des nodules !		
		! 3.32	mixte	autre !
! 3.32Sm x 3.32Nm	! 18	! 63%	- 28%	- 9% !
! 3.32Sm x 3.2Nm	! 25	! 92%	- 8%	- 0% !
! 3.32Nm x 3.2Sm	! 25	! 80%	- 8%	- 12% !
! 3.32Sm x G 49Nm	! 18	! 80%	- 20%	- 0% !
! 3.32Nm x G 49Sm	! 20	! 18%	- 32%	- 50% !
! 3.32Sm x J67Nm	! 20	! 94%	- 6%	- 0% !
! 3.32Nm x J67Sm	! 25	! 100%	- 0%	- 0% !
! 3.32Sm x 3.4.3Nm	! 15	! 66%	- 8%	- 26% !

Figure 9

Etude de la compétition de la souche 3.32 avec d'autres souches.



Il ressort que la souche 3.32 est très compétitive par rapport à toutes les souches testées. Il faut cependant noter que l'interprétation des résultats des inoculations réciproques avec la souche G49 est rendue délicate pour les raisons citées ci-dessous.

3 / DISCUSSION - COMMENTAIRES.

3.1 / Reproductibilité

Afin de vérifier la reproductibilité de l'expérimentation et de déceler une influence éventuelle du marquage par les antibiotiques, l'expérimentation a été renouvelée de façon indépendante pour les inoculations réciproques des souches 3.2 et 3.32 (tableau X, figure 10). Les résultats se sont montrés reproductibles sur le nombre de nodules analysés. La lourdeur du protocole expérimental ne nous a cependant pas permis de renouveler l'expérimentation pour chaque traitement.

3.2 / Commentaires.

En dehors des marquages par la streptomycine et la spectinomycine (74), le marquage par des antibiotiques, très utilisé pour ce genre d'études aboutit parfois à des altérations des propriétés symbiotiques des souches (157, 180). Dans notre cas, ce marquage modifie légèrement les profils de compétition entre souches sans qu'il y ait pour autant d'importants écarts entre les inoculations réciproques. La seule exception qui apparaît dans nos résultats, est celle des inoculations réciproques des souches 3.32 et G49. Le marquage par la néomycine de la souche G49 a provoqué d'importantes modifications des caractéristiques de croissance (le temps de génération de la souche a augmenté considérablement consécutivement au marquage, que la culture soit réalisée avec ou sans l'antibiotique). Or l'aptitude à proliférer rapidement dans la rhizosphère de la plante est l'un des éléments qui jouent un rôle dans le succès compétitif d'une souche. Il paraît évident dans de telles conditions, que, sans envisager de perturbations plus profondes, à pouvoir compétitif proche, une modification des caractéristiques de croissance soit déterminante dans le succès compétitif d'une souche. De telles altérations par le marquage à la néomycine, ainsi que des pertes d'efficacité ont déjà été signalées (157).

Tableau X

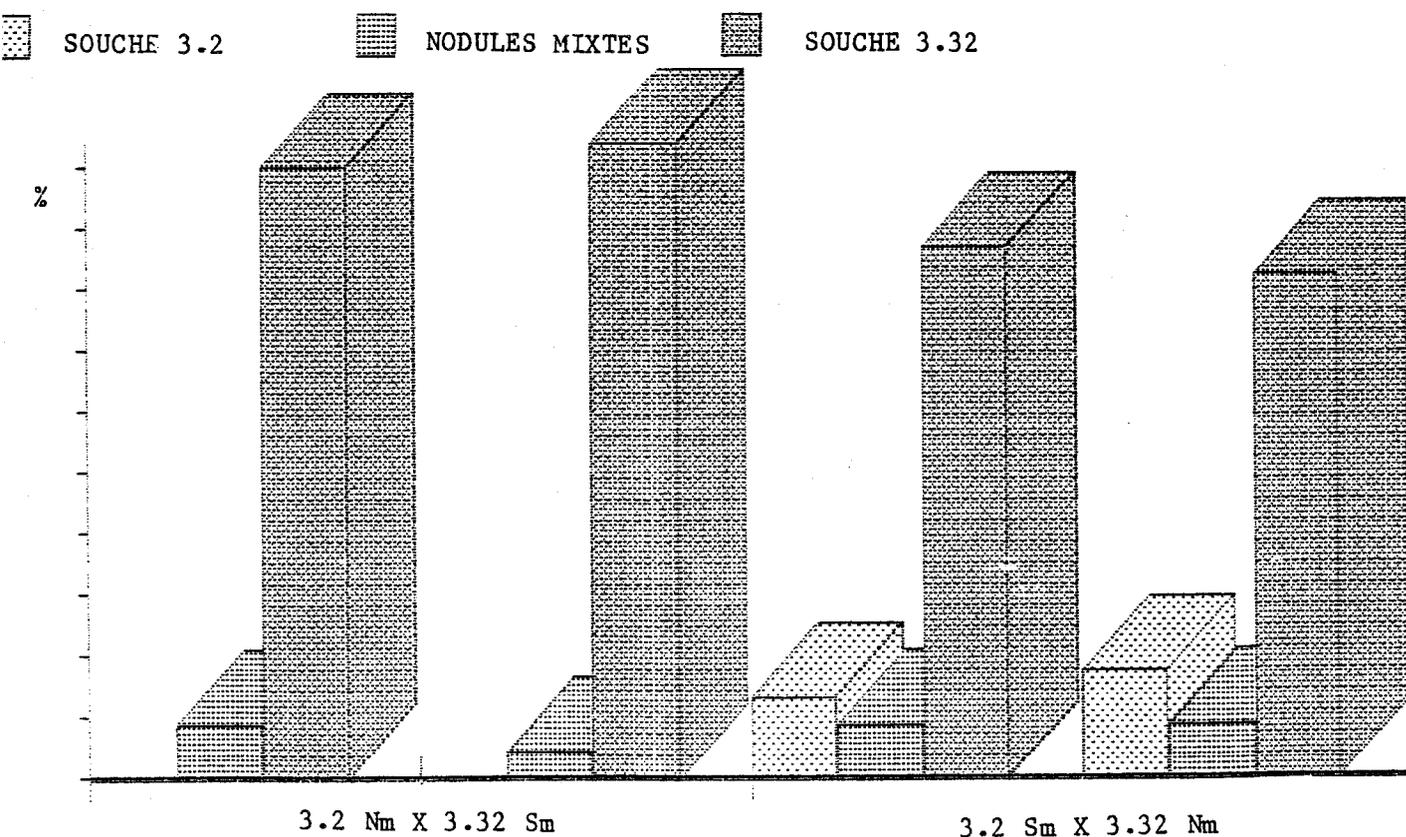
Comparaison de l'analyse des nodules des inoculations réciproques des souches 3.2 et 3.32 réalisées lors de deux expérimentations indépendantes.

Inoculation	Souche 3.2	Nodules mixtes	Souche 3.32
3.2Nm x 3.32Sm	0%	8%	92%
	0%	4%	96%
3.2Sm x 3.32Nm	12%	8%	80%
	16%	8%	76%



Figure 10

Profils de compétition obtenus dans deux expérimentations indépendantes avec les souches 3.32 et 3.2.



Cette technique très largement employée, parce que simple, assez fiable et peu coûteuse, n'est certainement pas la mieux adaptée aux études de ce type. Il serait actuellement envisageable d'utiliser des techniques beaucoup plus rapides et précises telles que les méthodes sérologiques ELISA (9, 70, 115), anticorps polyclonaux et monoclonaux (190, 111).

D'autre part, Hahn et al (77) ont montré, par l'étude des profils de compétition entre une souche sauvage et un de ses mutants dont les propriétés nitrogénasiques sont altérées par transposition ($nifD::Tn5$), que l'efficacité n'est pas corrélée avec le pouvoir compétitif d'une souche. Parallèlement, l'expérience a mis en évidence l'origine des nodules mixtes. Par observations macroscopique et microscopique des coupes transversales de nodules mixtes, des zones claires (mutant inefficace) et des zones colorées en rouge (souche sauvage) distinctes ont pu être observées. L'analyse statistique de ces résultats montre que 2 à 4 bactéries sont à l'origine de la formation d'un nodule.

3.3 / Conclusion.

D'un point de vue pratique, afin de ne pas compromettre les chances d'implantation de la souche 3.2 dans de nouvelles zones de culture, la confection d'inoculum contenant des souches de fort pouvoir compétitif en mélange est à éviter.

Il serait par ailleurs, intéressant d'améliorer le pouvoir compétitif des souches. Une des voies retenues au laboratoire avec Rhizobium meliloti (63, 64, 136) est d'accroître la mobilité des souches par obtention d'un mutant hypermobile et hyperchimiotactique, qui présente un avantage compétitif certain par rapport à la souche sauvage parentale. La mobilité et le chimiotactisme font partie des facteurs influençant le succès compétitif d'une souche (138, 162). Cependant, cette étude nous montre que, bien que mobile, la souche 3.2 a un faible pouvoir compétitif (sur la variété Mapple arrow), par rapport aux souches 3.32 et G49 non mobiles. Cette voie de sélection pourrait améliorer le pouvoir compétitif de la souche 3.2, mais serait surtout intéressante avec des souches non mobiles et compétitives, comme le sont les souches 3.32 et G49.

B / ETUDE DES PARAMETRES DE CULTURE.

I / ETUDE DE LA CROISSANCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM" DANS DIFFERENTS MILIEUX.

1 / CULTURES EN TUBES.

Cinq milieux de culture complets, couramment utilisés pour la culture de Rhizobium ont été testés à deux reprises. Les milieux de culture ont tous été réalisés avec le même extrait de levure, étant donné l'importance de son origine et de sa composition en acides aminés (40, 60). L'extrait de levure de "Pasteur Productions" qui permet une croissance plus forte que l'extrait de levure Difco a été choisi pour cette étude.

Le pH a été ajusté à 5,8. Pour une même souche, les tubes sont ensemencés avec une fraction aliquote d'une préculture, afin d'obtenir des concentrations cellulaires initiales identiques. L'estimation de la croissance se fait par appréciation de la densité optique, après six jours de culture en tubes fermés par des bouchons de silicone. (Tableau XI)

L'analyse de la variance des résultats (Tableau XII), montre que les concentrations cellulaires moyennes finales ne sont pas significativement différentes entre souches. Par contre, les différences de rendements entre milieux sont hautement significatives. De même l'interaction milieux-souches est significative au seuil $\alpha = 1 \%$, ce qui signifie que les souches n'ont pas toutes les mêmes exigences de culture, ni les mêmes rendements cellulaires pour un milieu donné. La plus petite différence significative entre les moyennes observées est de 1,67 au seuil $\alpha = 5 \%$.

Pour toutes les souches, le milieu TY mannité (et dans une moindre mesure le milieu TY), permet l'obtention d'une concentration cellulaire la plus forte à un pH initial de 5,8. Les trois autres milieux ne présentent que des différences significatives marginales de rendement cellulaires et peuvent être considérés comme équivalents. L'addition de mannitol à 10 g /litre dans le milieu TY améliore la prolifération

Tableau XI

Comparaison de la croissance de Bradyrhizobium japonicum dans divers milieux de culture :

La concentration bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm de cultures effectuées en tubes après 6 jours d'agitation à 29°C.

souche milieu	3.2	3.4.3	J67	3.15b3	G49	3.32	sommes marginales
TY	6,5	6,2	6,0	5,1	4,5	4,5	65,1
TY mannité	6,5	6,3	5,9	9,3	6,1	7,4	82,9
ISWARAN	4,4	3,0	5,1	3,5	3,3	4,6	47,85
YEM	4,2	2,8	3,2	2,6	2,7	3,1	37,35
RC	3,7	5,1	3,0	2,7	2,4	4,2	42,2
sommes marginales résultats	50,65	47,8	46,35	46,3	37,8	46,5	229,1

Tableau XII

Comparaison de la croissance de Bradyrhizobium japonicum dans divers milieux de culture : Tableau d'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
souches	5	5,55	1,11	1,66 NS
milieux	4	116,78	29,2	34,86***
interaction	20	40,07	2,0	2,99**
variation résiduelle	30	20,00	0,67	
TOTAUX	59	182,4		

cellulaire des souches 3.32, G49, et 3.15b3 alors qu'elle ne semble pas influencer celle des 3 autres souches.

2 / CULTURES EN ERLIENMEYER.

La production en masse de cellules de Bradyrhizobium japonicum en Erlenmeyer a souligné l'importance de la concentration en mannitol dans le milieu. L'étude concerne la comparaison des milieux TY, TY mannité à 10 g/l et ISWARAN (Tableau XIII). Le pH initial des milieux est ajusté entre 6,5 et 7.

Dans ces conditions de pH, les milieux TYm et ISWARAN permettent une production cellulaire importante et équivalente. L'addition de mannitol dans le milieu TY accroît très significativement le rendement cellulaire d'un facteur 2 à plus de 10 (Tableau XIV).

A un pH initial de 6,5 à 7, les différences de rendement cellulaire entre les milieux TYm et ISWARAN, constatées en cultures en tubes n'existent plus et il est vraisemblable que le pH de culture soit un facteur déterminant de la croissance cellulaire. Ce point sera abordé ultérieurement.

3 / COMMENTAIRES.

Dans tous les cas, la croissance en milieu TY, s'accompagne d'une forte alcalinisation du milieu (pH entre 8 & 8,5), alors que le pH reste proche du pH initial pour les autres milieux. Ceci s'explique, car les changements de pH du milieu sont surtout influencés par l'utilisation des composés azotés (3, 139), dont le milieu TY est très riche. La consommation par les Rhizobiums à croissance lente, des composés carbonés (tels que mannitol, fructose, galactose, mannose, xylose) n'aboutit qu'à une légère alcalinisation du milieu alors que l'utilisation du ribose provoque une acidification (3, 167). Par contre, la nature du composé azoté et sa concentration dans le milieu, influencent fortement l'évolution du pH. Ainsi, l'utilisation des nitrates, de l'urée, du glutamate, de l'extrait de levure induit une réaction alcaline, dont l'intensité dépend de la concentration du substrat dans le milieu, alors que le sulfate d'ammonium produit une réaction acide (3).

Tableau XIII

Comparaison de la croissance de 4 souches de Bradyrhizobium japonicum en Erlenmeyer dans les milieux TY, TY_m, et ISWARAN (pH initial 6,5) exprimée en log du nombre de cellules viables par ml.

SOUCHE	TY	TY _m mannité	ISWARAN
3.15b3	9,3	10,8	10,6
Bioprox	9,3	10,3	10,0
3.32	9,2	9,9	10,4
3.2	9,5	10,3	10,3
3.4.3	9,7	10,0	10,3

Tableau XIV

Comparaison de la croissance de 4 souches de Bradyrhizobium japonicum en milieux TY, TY_m, et ISWARAN (pH initial 6,5) : Tableau d'analyse de la variance

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
milieu	2	2,65	1,32	18,92***
variation résiduelle	12	0,84	0,07	
TOTAUX	14	3,49		

II / INCIDENCE DE LA CONCENTRATION EN MANNITOL DANS LE MILIEU SUR LA CROISSANCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".

Le rôle de différentes concentrations de mannitol dans le milieu, sur la croissance des souches 3.2 et 3.32 a été étudié. Des concentrations de 1 à 12 g/l ont été employées. Le pH du milieu est ajusté à 5,8. Après 6 jours d'agitation des cultures effectuées en tube, la croissance est estimée par mesure de la densité optique.

Dans les deux cas, jusqu'à une certaine concentration (5 g/l pour la souche 3.32 et 7 g/l pour la souche 3.2), la densité optique des cultures est une fonction croissante de la quantité de mannitol du milieu (Tableau XV, figure 11). Les courbes s'infléchissent ensuite et l'augmentation de densité optique reprend au seuil de 7 g/l et 10 g/l respectivement pour les deux souches. Au seuil de neuf g/l la densité optique d'une culture de la souche 3.2 est identique à celle d'une culture en milieu TY avec 1g/l de mannitol. Ceci expliquerait l'absence d'écart de densité optique pour cette souche entre les cultures réalisées en milieu TY et milieu TY mannité dans la première partie de cette étude (tableau XI).

L'incidence de la concentration en mannitol sur la croissance de Bradyrhizobium japonicum est hautement significative (Tableau XVI). Des études complémentaires seraient nécessaires pour connaître les quantités de sucre réellement consommées, et pour déterminer les doses optimales de croissance.

En routine le milieu TY additionné de 10 à 12 g/l de mannitol a été choisi. Il permet une bonne croissance bactérienne, et en outre le milieu TY avec ou sans mannitol n'induit pas la synthèse de polysaccharides de type "slime" dans le milieu (131). Or, chez les espèces de Rhizobium à croissance lente, ce type de polysaccharide est très difficile à séparer du culot bactérien par centrifugation. Sa synthèse en quantités importantes (cas des milieux YEM, ISWARAN, RC) entraîne une perte élevée de cellules lors de la concentration de la biomasse et rend cette opération très délicate.

Tableau XV

Comparaison de la croissance de deux souches de Bradyrhizobium japonicum en milieu TY additionné de différentes concentrations de mannitol ; cultures effectuées en tubes.

souche	3.32		3.2		sommes marginales
souche	1	2	1	2	des résultats
1	4,3	8,6	4,9	9,8	18,4
2	4,6	9,15	5,25	10,5	19,65
3	4,7	9,45	5,4	10,8	20,25
4	5,45	10,9	5,45	10,9	21,8
5	5,65	11,3	5,45	10,9	22,2
6	5,05	10,1	5,95	11,9	22,0
7	5,55	11,1	6,35	12,7	23,8
8	5,55	11,1	5,5	11,0	22,1
9	5,6	11,2	5,1	10,2	21,4
10	6,4	12,8	6,2	12,4	25,2
11	6,95	13,9	6,5	13	26,9
12	6,75	13,5	6,7	13,4	26,9
sommes marginales	133,1		137,5		270,6

1.....densité optique moyenne.

2.....somme des mesures effectuées.

Tableau XVI

Comparaison de la croissance de deux souches de Bradyrhizobium japonicum en milieu TY additionné de différentes concentrations de mannitol : Tableau d'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
souche	1	0,503	0,503	2,58NS
concentration en mannitol	11	11,245	1,02	5,23***
interaction	11	13,477	1,225	6,28***
variation résiduelle	24	4,683	0,195	
TOTAUX	47	29,908		

III / INFLUENCE DU pH DU MILIEU DE CULTURE.

Parmi les Rhizobiums, les tolérances aux différents pH sont larges et varient considérablement d'un groupe d'inoculation à l'autre, et à l'intérieur d'un même groupe. On a noté que les Rhizobiums à croissance lente sont d'une manière générale, tolérants aux pH acides et non tolérants aux pH alcalins (35% survivent à pH 4, 84% à pH 4,5 et seulement 3% à pH 9); alors que R. meliloti et dans une moindre mesure R. trifoli sont tolérants aux pH alcalins (91% des souches survivent à $pH > 9,5$, alors que 9% survivent à pH 4,5)(89, 112, 139).

Au regard de ces travaux et de nos propres observations, et afin de se placer dans les conditions de production les plus favorables, il paraît important de connaître le pH optimal de croissance des souches les plus performantes.

Deux milieux ont été employés pour cette étude, le milieu TY (Figure 12) et le milieu YEM (Figure 13). Les cultures ont été réalisées en fiole et le pH initial ajusté à différentes valeurs. Des numérations des cellules viables ont été réalisées en fin de culture (Tableau XVII).

L'analyse de la variance a été effectuée en prenant comme variation résiduelle, la variation liée aux milieux (Tableaux XVIII & XIX). Les différences observées entre souches, et entre pH de culture, sont significatives au seuil $\alpha = 1\%$. L'interaction souches-pH est hautement significative. Ceci se traduit par le fait que le pH optimal de croissance est différent selon les souches. Il se situe autour de 5,5 pour les souches 3.32 et 3.15b3, autour de 6 pour la souche 3.2 et aux alentours de 6,5 pour la souche 3.4.3.

Par ajustement du pH à l'optimum de croissance, la prolifération cellulaire est au minimum 10 fois plus importante qu'à pH 7, valeur classiquement utilisée pour la culture de Rhizobium. Le pH optimal de culture est donc une donnée déterminante, dont la connaissance permet d'accroître très significativement les rendements cellulaires. Ceci est d'autant plus marqué en milieu TY que l'utilisation des composés azotés induit une alcalinisation du milieu néfaste à la croissance de Bradyrhizobium japonicum, d'où la nécessité de maintenir le pH autour de cet optimum.

Tableau XVII

Etude de la croissance de Bradyrhizobium japonicum, après 6 jours d'agitation à 29°C en milieu TY à différents pH.

résultats des numérations cellulaires exprimés en log ;

7 < log (population initiale) < 8.

SOUCHE	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7
3.32	8,0	10,2	10,4	10,4	9,2	9,1
3.15b3	7,7	10,1	10,3	10,5	9,2	9,1
3.2	7,4	8,9	9,4	10,1	9,2	9,0
3.4.3	7,0	8,8	8,5	8,6	9,0	9,7



Etude de la croissance de Bradyrhizobium japonicum après 6 jours d'agitation à 29°C en milieu YEM à différents pH.

résultats des numérations cellulaires exprimés en log ;

7 < log (population initiale) < 8.

SOUCHE	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7
3.32	8,3	9,1	9,5	9,0	8,7
3.15b3	8,2	9,0	9,3	8,5	9,7
3.2	7,3	8,8	8,1	9,5	9,3
3.4.3	7,9	8,0	8,4	9,0	9,7

Figure 12

Influence du pH initial du milieu de culture, sur les concentrations cellulaires (exprimées en log du nombre de bactéries par ml) obtenues après 6 jours d'agitation à 29°C. Milieu TYm.

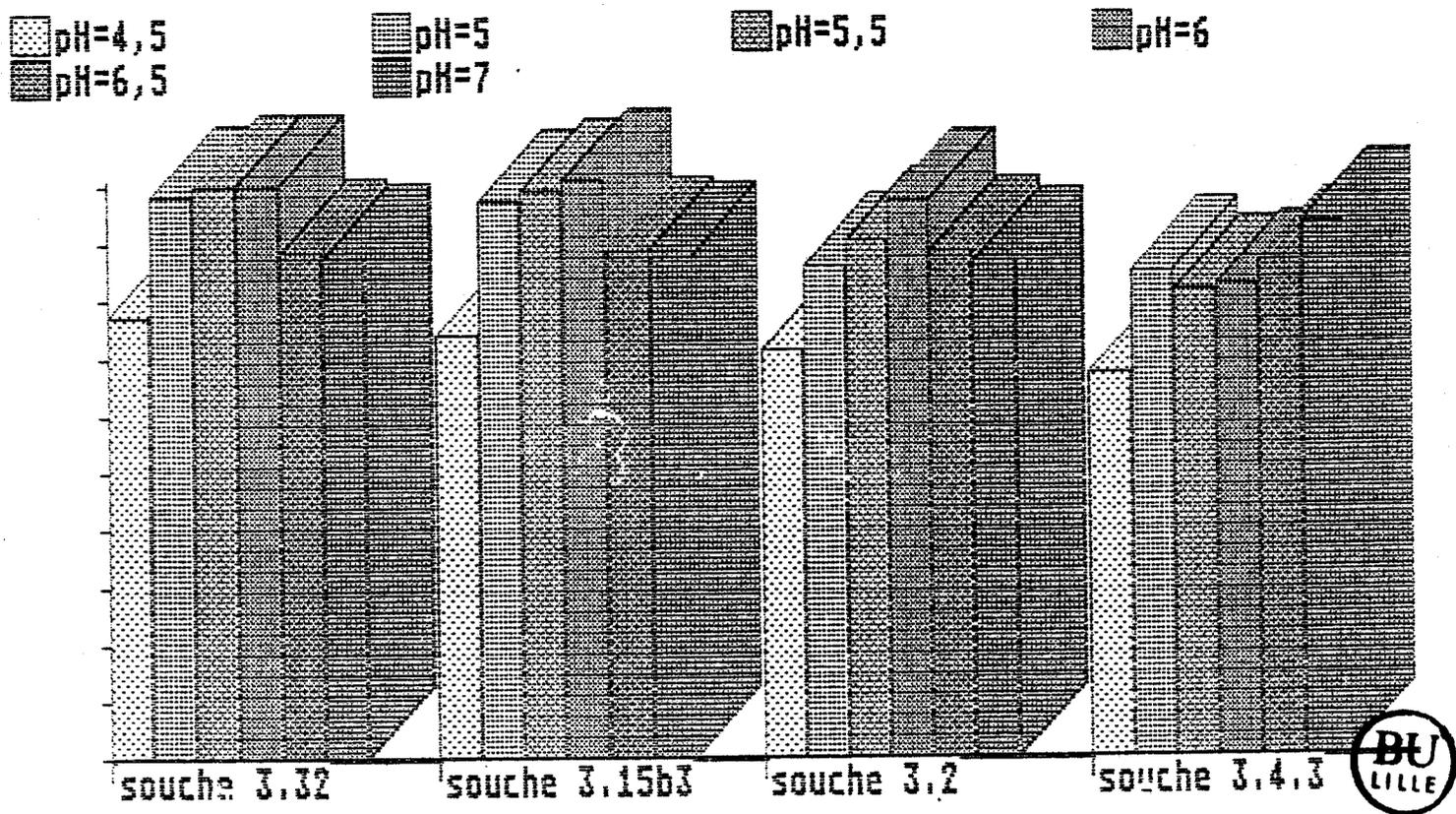


Figure 13

Influence du pH initial du milieu de culture, sur les concentrations cellulaires (exprimées en log du nombre de bactéries par ml) obtenues après 6 jours d'agitation à 29°C. Milieu YEM.

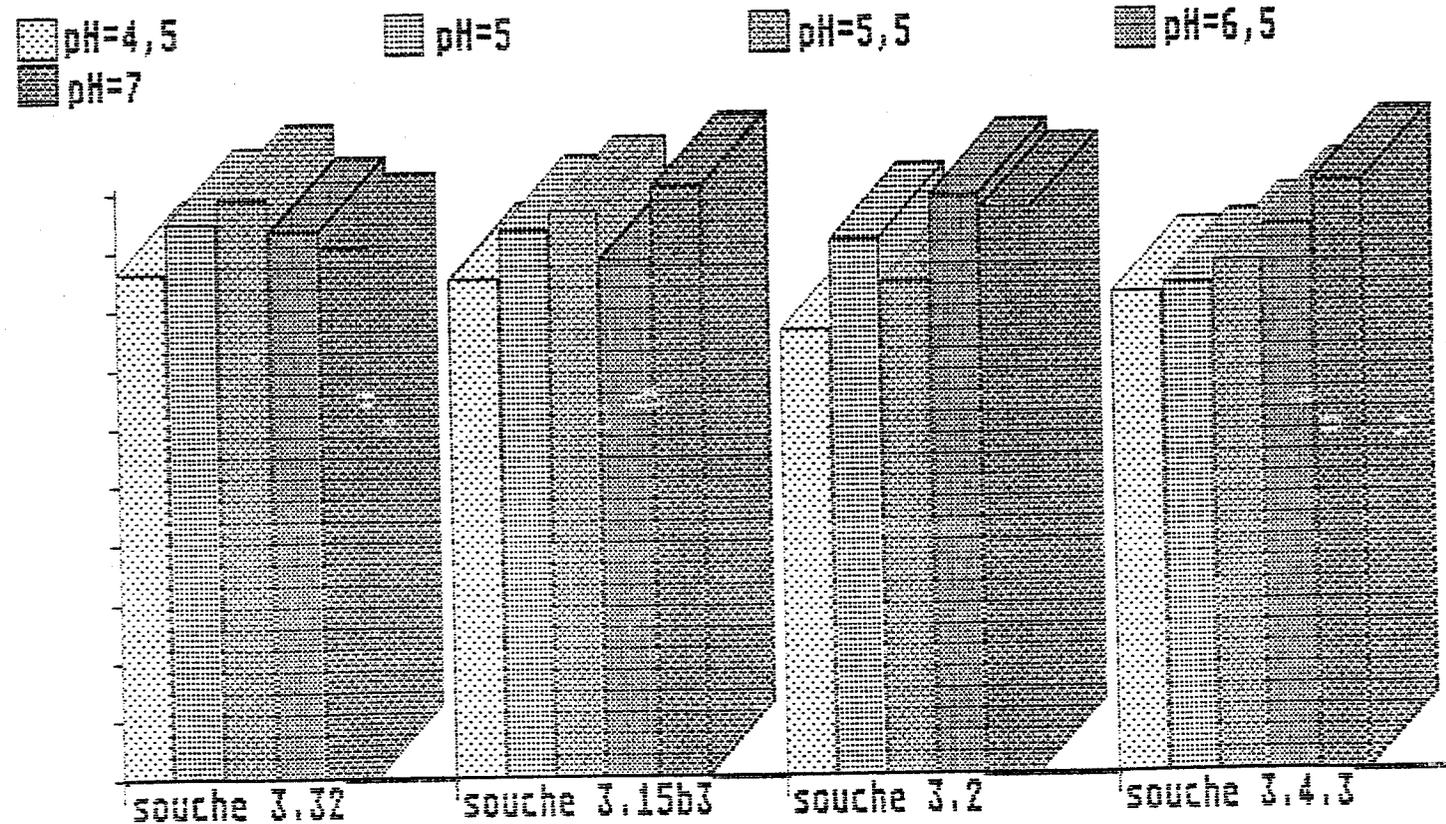


Tableau XVIII

Etude de la croissance de quelques souches de Bradyrhizobium japonicum à différents pH de culture. Calcul des sommes marginales.
sommes des observations de chaque cas.

souche	3.32	3.15b3	3.2	3.4.3	sommes marginales
pH de culture	(9)	(9)	(9)	(9)	
4,5 (8)	16,3	15,9	14,7	14,9	61,1
5,0 (8)	19,3	19,1	17,7	16,8	72,9
5,5 (8)	19,9	19,6	17,5	16,9	73,9
6,0 (4)	10,4	10,5	10,1	8,6	39,6
6,5 (8)	18,2	17,7	18,7	18,0	72,6
7,0 (8)	17,8	18,8	18,3	19,4	74,3
sommes marginales	101,9	101,6	97,0	94,6	395,1

Le nombre entre parenthèses représente le nombre d'observations relatives à chaque facteur étudié.

Tableau XIX

Etude de la croissance de quelques souches de Bradyrhizobium japonicum à différents pH de culture. Tableau d'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
souche	3	6,73	1,346	5,99**
pH	5	3,48	1,160	5,17**
interaction souche - pH	15	16,95	1,130	5,03**
variation résiduelle	20	4,49	0,225	
TOTAUX	43	31,65		

Les travaux réalisés en fermenteur par M. Khalassi (97), permettent d'affiner les résultats. L'oxygène n'y est pas limitant, et le pH est régulé à la valeur choisie. Les rendements cellulaires maximaux, ont été possibles à pH 5,5 et atteignent des valeurs supérieures à 10^{11} bactéries / ml en milieu TY mannité, pour les souches 3.15b3 et 3.32 après 5 jours de culture.

CONCLUSION.

Ces études ont permis d'obtenir un accroissement des rendements cellulaires de 10^9 à plus de 10^{11} bactéries / ml en milieu TY.

L'emploi du milieu TY permet outre une production cellulaire importante, un excellent rendement de récupération de la biomasse.

L'adjonction de mannitol dans le milieu multiplie par 2 à 10 le rendement cellulaire.

L'inhibition de croissance qui résulte de la forte alcalinisation du milieu, peut être évitée en ajustant le pH au pH optimal de développement de la souche, ou mieux en régulant le pH à cette valeur pour les productions de biomasse en fermenteur. Dans ces conditions, le rendement cellulaire est encore accru d'un facteur de 10.

IV / CHOIX D'UN ANTIMOUSSE.

La culture en fermenteurs et dans une moindre mesure, la culture en Erlenmeyer, nécessite l'emploi d'un antimousse. Celui-ci ne doit pas être toxique ou inhibiteur de la croissance de Bradyrhizobium japonicum. 15 antimousses fournis par Bevaloid, ont été testés. (Tableau XX)

Deux tubes de 20 ml de milieu TY additionné d'antimousse sont inoculés avec la souche 3.2. Après quatre jours d'incubation, la quantité de cellules a été estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm des cultures et par observation des bactéries au microscope afin de détecter d'éventuelles déformations cellulaires.

La plupart des antimousses testés sont sans effet notable sur la croissance et l'aspect des cellules de Bradyrhizobium japonicum.

Tableau XX

Etude de la croissance de Bradyrhizobium japonicum, en présence de différentes concentrations d'antimousse dans le milieu. Résultats observés après quatre jours de culture par mesure de la densité optique à 600 nm.

ANTIMOUSSE	CONCENTRATION D'ANTIMOUSSE DANS LE MILIEU					
	0,01 ml/l		0,05 ml/l		0,1 ml/l	
	D.O	indice	D.O	indice	D.O.	indice
témoin 1	2,2	100	3,25	100	3,1	100
témoin 2	2,2	100	2,85	88	3,0	97
témoin 3	2,3	104	3,2	98	3,0	97
B 2500	2,0	91	2,2	68	2,8	90
B 6575	2,2	100	3,1	95	3,1	100
B 6638	1,9	86	1,9	58	2,9	93
A 2510	2,1	95	3,15	97	3,15	100
B 2671	2,2	99	3,15	97	2,9	93
B 6675	2,3	104	4,1	126	3,2	103
B 2509	2,0	91	2,0	62	N D	
GS 32	2,2	100	3,0	94	3,0	97
B 680	2,1	95	2,4	74	3,0	97
B 2557	1,8	82	2,15	66	2,75	90
A 395/9	0,54	25	0,65	20	0,6	19
B 2565	0,12	5	0,13	4	0,1	3
B 519/2	2,3	104	3,36	103	N D	
B 6988	N D		1,9	60	2,76	90
B 519/4	N D		2,9	90	2,76	90

Légende : témoin 1 = témoin sans antimousse
 témoin 2 = antimousse Rhône Poulenc
 témoin 3 = antimousse Prolabo
 D.O : densité optique
 indice : défini par rapport au témoin sans antimousse
 (indice 100)

Tableau XXI

Etude de la croissance de Bradyrhizobium japonicum, en présence de différentes concentrations d'antimousse dans le milieu. Tableau d'analyse de la variance réalisé à partir des indices de croissance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
antimousse	18	38392,3	2258,4	20,6***
variation résiduelle	31	3501,7	109,4	
TOTAUX	49	41894,0		

Six antimousses ont un effet légèrement inhibiteur, ce qui se traduit par un indice de croissance moyen, défini par rapport au témoin sans antimousse (indice 100) inférieur à 90, et pour les antimousses B 680 et B 6988, par l'apparition d'amas cellulaires et de cellules déformées. L'effet inhibiteur par rapport au témoin n'est significatif que pour les indices moyens inférieurs à 82 (tableau XXI).

Les antimousses A 395/9 et B 2565 sont fortement inhibiteurs : la croissance est très faible, et les cellules, peu nombreuses, sont déformées et agglomérées.

L'antimousse B6675, actuellement commercialisé sous la dénomination Gensil 420, semble avoir un effet stimulant bien que la différence par rapport au témoin ne soit pas significative : l'indice de croissance est supérieur à 100, quelle que soit sa concentration dans le milieu, les cellules très nombreuses sont mobiles et non déformées, ce qui dénote un très bon état physiologique. Le Gensil 420 a été retenu dans la suite de nos travaux d'autant plus qu'il a un excellent pouvoir antimousse : l'introduction de 2 ml de cet antimousse dans 14 litres de milieu (0,014%) avant stérilisation suffit à inhiber la formation de mousse pendant toute la durée de la fermentation (soit environ 6 jours). Ceci est très important, car l'introduction d'antimousse en cours de culture augmente les risques de contamination du fermenteur par d'autres germes.

V / MISE AU POINT D'UN MILIEU SELECTIF POUR NUMERATIONS.

Afin de pouvoir détecter de faibles concentrations de Bradyrhizobium japonicum dans les sources non stériles, (inoculats, enrobages), il s'est avéré indispensable de mettre au point un milieu partiellement sélectif, et qui puisse être, de préférence stérilisé par passage à l'autoclave à 120°C pendant 20 min, après addition des agents sélectifs.

Des agents bien connus tels que le rouge Congo, facilitent l'identification des souches de Rhizobium qui n'absorbent pas, ou très peu le colorant. A des concentrations élevées (supérieures à 100 mg/l), il est sélectif contre la plupart des bactéries Gram+ courantes. Il a été utilisé à 25 mg/l pour notre travail.

1 / CONCENTRATIONS MINIMALES DE CHLORAMPHENICOL INHIBITRICES DE LA CROISSANCE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".

Il a déjà été mentionné dans la littérature, que le genre Rhizobium tolère de faibles concentrations en chloramphénicol (75, 141). L'emploi de cet antibiotique serait intéressant car :

- C'est un composé peu coûteux, et stable chimiquement.
- De très nombreuses bactéries sont inhibées par de faibles concentrations dans le milieu (de l'ordre de 1 µg/ml).

Afin de réaliser des milieux "prêts à l'emploi", le pouvoir inhibiteur de différentes concentrations de chloramphénicol a été testé sur les souches 3.1, 3.2, 3.15, 3.15b3, 3.30, 3.32, G49. Le chloramphénicol a été soit stérilisé sur unité de filtration stérile et ajouté au moment de l'emploi, soit stérilisé dans le milieu par autoclavage à 121°C, 20 min. Pour chaque souche, 0,1 ml d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance est étalé sur boîte de Pétri contenant 20 ml du milieu YEM additionné de chloramphénicol à la concentration désirée.

Les résultats viennent de l'observation des boîtes après 9 jours d'incubation à 29°C. Ils sont récapitulés dans le tableau XXII.

Nous avons mis en évidence que toutes les souches testées résistent à des concentrations de 10 µg/ml, et que la stérilisation du chloramphénicol dans le milieu par autoclavage n'altère pas son pouvoir inhibiteur. En règle générale, le milieu décrit dans "Matériels et méthodes IV.2" a été utilisé. Les souches 3.2 et 3.32 résistent naturellement à des concentrations de 25 µg/ml, et dans le cas d'études réalisées avec ces souches, cette concentration a été retenue, pour accroître la sélectivité du milieu.

Par ailleurs, des mutants résistants à une concentration de 100 µg/ml pour la souche 3.2, et 50 µg/ml pour les souches Bioprox et 3.32, ont été obtenus (fréquence de mutation 10^{-12}).

Tableau XXII

Etude de la croissance de Bradyrhizobium japonicum sur milieu YEM gélosé contenant différentes concentrations de chloramphénicol.

CONCENTRATION (µg/ml)		5	10	25	50	75	100
souche							
3.1	1	++	++	+	+-	+-	+-
	2	++	++	+	+	+-	+-
3.2	1	++	++	++	+	+	+-
	2	++	++	++	++	++	+
3.15	1	++	++	+-	-	-	-
	2	++	+	+-	-	-	-
3.15b3	1	++	++	+	-	-	-
	2	++	++	+-	-	-	-
3.30	1	++	++	+	+-	-	-
	2	++	++	+	+-	-	-
3.32	1	++	++	++	-	-	-
	2	++	++	++	-	-	-
Bioprox	1	++	++	+-	-	-	-
	2	++	++	+-	+-	+-	-

légende : 1 chloramphénicol autoclavé dans le milieu
2 chloramphénicol stérilisé par filtration

L'observation de la croissance se fait après 9 jours d'incubation :
 ++ : croissance non inhibée, obtention d'une nappe bactérienne.
 + : croissance partiellement inhibée (temps de croissance de 11 jours)
 +- : croissance résiduelle (quelques colonies dont le diamètre est inférieur à 1 mm)
 - : pas de croissance

2 / AUTRE AGENT SELECTIF.

Le travail sur des échantillons présentant de fortes contaminations fongiques (échantillons placés à des humidités relatives élevées) nécessite l'emploi d'un milieu inhibiteur de tels contaminants. Le benomyl (Benlate) a été employé à une concentration de 10µg/ml. Une fraction de la population des Rhizobiums étant sensible (75, 76, 79Bis, 81Bis), nous avons sélectionné des clones résistants à de telles concentrations.

VI / CONSERVATION DES CONCENTRES CELLULAIRES.

Afin de différer dans le temps, production et traitement de la biomasse, des essais de conservation des concentrés cellulaires ont été réalisés.

- à 4°C, la perte de viabilité est importante : une puissance de 10 par quinze jours.

- à -20°C, les essais de conservation ont été réalisés après reprise du concentré cellulaire dans du Tampon de non prolifération (T.N.P. : K_2HPO_4 : 0,5g; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2g) ou de l'eau, et addition soit de :

- lait écrémé 10 %, saccharose 2 %
- maltodextrine 10 %
- glycérol 40 %

Des numérations de cellules viables ont été effectuées sur une période de 14 mois. Quel que soit l'additif de congélation, la conservation de la biomasse est excellente et la population finale est voisine de la population initiale (tableau XXIII).

Ce mode de conservation des concentrés cellulaires destinés à l'atomisation, a été couramment employé sans altération des taux de survie à l'atomisation.

D'aussi bons taux de survie ont déjà été signalés dans la littérature, avec Rhizobium leguminosarum (121).

Tableau XXIII

Etude de la conservation de concentrés cellulaires de la souche 3.2 en congélation : Résultats des numérations exprimés en log.

Additif de congélation	Durée de conservation en jours				
	0	7	35	200	428
glycérol 40 % T.N.P.	11,5	11,5	11,6	11,4	10,6
glycérol 40 %	11,6	11,5	11,5	11,4	10,7
lait écrémé 10% sacch.2 %,T.N.P.	11,6	11,0	11,3	11,1	10,9
lait écrémé 10% saccharose 2 %	11,5	11,1	11,3	11,2	10,8
maltodextrine 10 %, T.N.P	11,5	11,3	11,5	11,5	11,3
maltodextrine 10 %	11,5	11,1	11,4	11,4	10,9

2ème PARTIE

**ETUDE DES PARAMETRES DE LA
DESHYDRATATION ET DE LA
CONSERVATION DES CELLULES DE
"BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".**

L'importance des paramètres de la déshydratation de Rhizobium meliloti sur la survie des bactéries a été mise en évidence dans des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (116, 117, 118, 135, 137). Les études rapportant le rôle des paramètres de dessiccation sur la survie des bactéries sont très peu nombreuses et se limite souvent à l'étude d'un facteur. Afin de produire des inoculums secs de Bradyrhizobium japonicum pour la culture du soja, deux aspects ont été envisagés ; l'étude des facteurs qui conditionnent la survie de Bradyrhizobium japonicum à la déshydratation par atomisation et de ceux qui interviennent dans la conservation des inoculats ainsi déshydratés a donc été réalisée.

Les essais expérimentaux visent à mettre en oeuvre différents procédés de séchage afin d'obtenir un inoculum d'utilisation facile et conservant ses potentialités vitales sur de longues périodes.

La connaissance des paramètres optimaux de déshydratation et de conservation des cellules de Bradyrhizobium japonicum doit permettre de mettre au point les modalités de pelliculage du Rhizobium sur la graine. Des études complémentaires seront menées afin de rechercher les substances susceptibles de protéger les cellules contre les effets de la déshydratation qui a lieu pendant le processus de pelliculage et lors du stockage des graines préinoculées.

A / ETUDE ET OPTIMISATION DU RENDEMENT DE LA DESHYDRATATION PAR ATOMISATION.

La première étape consiste à améliorer le rendement de l'atomisation. Deux paramètres interviennent à ce niveau, le taux de récupération de matière sèche, et le nombre de bactéries viables dans la poudre déshydratée.

Le premier dépend de facteurs physiques, réglage de l'atomiseur, et caractéristiques du produit (viscosité, nature), alors que le deuxième dépend de facteurs biologiques (souches, âge physiologique des cellules, rôle protecteur du support).

I / INFLUENCE DU PRODUIT SUR LE RENDEMENT EN MATIERE SECHE DE L'ATOMISATION.

1 / INFLUENCE DE LA PRESENCE DU MILIEU DANS LE SUPPORT D'ATOMISATION SUR LE RENDEMENT EN MATIERE SECHE.

Les essais ont été réalisés avec la souche G49. Le support d'atomisation est le lait écrémé. Deux milieux ont été employés : le milieu ISWARAN, et le milieu TYm. Les concentrés cellulaires ont été obtenus après centrifugation de la biomasse et remise en suspension des cellules soit dans leur milieu de culture, soit dans l'eau (cultures issues du milieu TY). Le support est alors ajouté, et les concentrés cellulaires atomisés.

Le rendement en matière sèche est défini comme suit :
$$R = \frac{P_f \times MS_f}{P_i \times MS_i}$$

où P_i = poids du produit à atomiser

... MS_i = pourcentage de matière sèche contenue dans le produit à atomiser

... P_f = poids du produit après atomisation

... MS_f = pourcentage de matière sèche contenue dans la poudre atomisée.

Les essais réalisés ont donné des rendements très différents suivant le milieu utilisé et sa présence dans le support (Tableau XXIV).

L'analyse de la variance à un critère de classification (Tableau XXV), réalisée sur les rendements obtenus avec différents milieux, donne une valeur F hautement significative, ce qui montre que la présence du milieu dans le support d'atomisation est déterminante sur le rendement.

La comparaison des moyennes deux à deux par le test t de Student permet d'établir les conclusions suivantes :

- la synthèse de quantités importantes de polysaccharides, induite par le milieu ISWARAN, qu'il est difficile d'éliminer par centrifugation, diminue le rendement de façon très significative. Le produit atomisé se colmatant dans la tour, le taux de récupération de matière sèche est faible et en moyenne de 21,7%.

Tableau XXIV

Influence de la présence du milieu de culture dans le support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation. Souche Bioprox.

support	1 Iswaran lait 10 %	2 Iswaran lait 10 % sacch. 2 %	3 TY lait 10%	4 TY lait 10 % sacch. 2 %	5 H ₂ O lait 10 % sacch. 2 %
Rendement	18 % 17 % 23 % 29 %	34 %	48 % 47 % 52,3 %	54 % 55 % 51 %	60 % 66 % 61 %
Moyenne	21,7 %	34 %	49,1 %	53,3 %	62,3 %

Sacch. : Saccharose

Tableau XXV

Influence de la présence du milieu de culture dans le support sur le rendement en matière sèche de l'atomisation. Souche Bioprox. Analyse de la variance

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Composition du support	4	3427,92	856,98	56,74***
Variation résiduelle	10	135,94	15,105	
TOTAUX	14	3563,9		

Comparaison des moyennes par le test t de Student.

moyennes 4 et 5 t = 4,07*
 moyennes 3 et 4 t = 2,12 NS
 moyennes 1 et 3 t = 7,77***
 moyennes 1 et 2 t = 2,0 NS
 moyennes 2 et 3 t = 4,6*

ce qui donne :

$$1 = 2 \neq 3 = 4 \neq 5$$

- le milieu TY mannité qui n'induit pas la synthèse de polysaccharides de type "slime" permet un rendement plus élevé situé entre les valeurs 48% & 55% (53,3% en moyenne).

- lorsque le milieu TY est remplacé par de l'eau dans le support, les rendements sont alors supérieurs et en moyenne de 62,3% (différence significative avec le milieu TY.)

- l'addition de saccharose dans le support ne modifie pas les rendements en matière sèche de manière significative.

Un réglage optimal de l'atomiseur, permet d'atteindre un rendement de matière sèche de 70%. Dans nos conditions expérimentales, ce taux peut difficilement être amélioré étant donné que la tour n'est pas équipée de système de balayage, et il n'est pas possible d'éviter un colmatage même faible dans la tour.

2 / INFLUENCE DU SUPPORT D'ATOMISATION SUR LE RENDEMENT EN MATIERE SECHE.

De même que la présence du milieu influence le rendement en matière sèche, on conçoit aisément que le support soit déterminant sur le rendement.

D'une manière générale, on a noté qu'une viscosité élevée (amidon, sorbitol, gomme), la présence de matières grasses (lait entier, huile de silicone), diminuent de manière importante le rendement en matière sèche. Pour l'amidon, le sorbitol, le lait entier, le rendement est inférieur à 10% (Tableau XXVI).

Les meilleurs rendements en matière sèche ont été obtenus avec la maltodextrine, le lait écrémé additionné ou non de sucres. Ces supports serviront dans les expérimentations ultérieures.

Tableau XXVI

Rendements en matière sèche observés avec différents supports.

Souche	CB 1809	3.2	3.32
Support			
Inositol 10 %	48 %	-	-
Sorbitol 10 %	10 %	-	-
Maltodextrine 10 %	62 %	60 %	-
Maltodextrine 10 % + maltose 2 %	-	43,3 %	-
Maltodextrine 10 % + saccharose 2 %	-	23,3 %	-
Lait écrémé 10 % (TY)	47	50	-
Lait écrémé 10 % + Saccharose 2 %	-	72	46
Lait écrémé 10 % + Saccharose 2 % + Huile silicone 0,5 %	-	57	45
Lait écrémé 10 % + Saccharose 2 % + Gomme arabique 1 %	-	47	38
Lait entier	10 %	-	-

II / ETUDE DE LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM" A LA DESHYDRATATION.

1 / INFLUENCE DU SUPPORT DE DESHYDRATATION.

Il est difficile de cerner indépendamment des facteurs biologiques, le rôle protecteur des différents supports. Pour cela, l'étude doit être réalisée sur le même matériel biologique (même souche, même état physiologique), ce qui limite considérablement le nombre d'essais pouvant être réalisés dans chaque expérimentation, la biomasse devant être issue d'une même culture.

Les études réalisées dans ce sens montrent clairement l'importance de l'agent protecteur (Tableau XXVII).

Les essais préliminaires effectués avec la souche CB1809, indiquent des écarts de survie de 1 à 10 entre la maltodextrine et l'inositol employés comme support.

De même une étude comparative entre le rôle protecteur des alginates et le lait écrémé additionné de saccharose, montre des différences entre les taux de survie de la souche G49 dont l'ampleur varie d'un facteur de 1 à 3000.

L'addition de solutés tels que des sucres modifie considérablement la survie de Bradyrhizobium japonicum lors de la déshydratation. Paradoxalement des résultats opposés ont été obtenus suivant le support employé : L'addition de saccharose au lait écrémé améliore d'un facteur de plus de 20 le taux de survie de la souche 3.2 par rapport au lait écrémé employé seul comme support ; ce même sucre diminue d'un facteur 40 le taux de survie de la souche lorsqu'elle est atomisée avec la maltodextrine. Dans une moindre mesure on observe le même phénomène avec le maltose.

2 / INFLUENCE DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES A LA DESHYDRATATION.

2.1 / Influence de la souche.

Lors de la production d'inoculum déshydratés, des taux de survie très différents ont été observés suivant les souches. Une étude comparative entre la survie de la souche 3.2 et de la souche 3.32 montre

Tableau XXVII

Etude de la survie à la deshydratation des souches 3.2, CB 1809 et Bioprox atomisées en présence de différents supports.

Support	concentration bactérienne/gMS avant atomisation	concentration bactérienne/gMS après atomisation	Taux de survie en %

	Souche 3.2		
lait	$7,5 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^8$	0,3 %
lait sacch.	$1,5 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{10}$	8,7 %
lait malt.	$1,4 \cdot 10^{11}$	$5,1 \cdot 10^9$	3,6 %
MDO	$4,1 \cdot 10^{10}$	$1,7 \cdot 10^{10}$	41 %
MDO malt.	$7,3 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^9$	1,6 %
MDO sacch.	$7,4 \cdot 10^{10}$	$7,7 \cdot 10^7$	0,1 %

	Souche CB1809		
maltodextrine	$4,9 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^7$	0,023 %
maltodextrine	$1,2 \cdot 10^{12}$	$3,6 \cdot 10^8$	0,03 %
Inositol	$5,9 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^9$	0,39 %
lait écrémé	$5,8 \cdot 10^{11}$	$8,6 \cdot 10^8$	0,15 %

	Souche BIOPROX		
alginate SG60	$4,85 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^8$	0,06 %
alginate SG500	$1 \cdot 10^{12}$	$1,6 \cdot 10^8$	0,02 %
alginate SG1000	$1,5 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^8$	0,2 %
lait sacch.	$1,6 \cdot 10^{12}$	$6,4 \cdot 10^{11}$	40 %
lait sacch. TY	$2,5 \cdot 10^{11}$	$1,7 \cdot 10^{11}$	68 %



MDO : Maltodextrine

Sacch.: Saccharose

Malt. : Maltose

des taux de survie en moyenne dix fois plus élevés pour la souche 3.2. Les écarts obtenus sont significatifs au seuil $\alpha = 1\%$ (Tableau XXVIII).

2.2 / Influence de l'âge physiologique des cellules.

Le deuxième facteur déterminant de la survie de Bradyrhizobium japonicum au cours de la déshydratation est l'âge physiologique des cellules. La dessiccation provoque une mortalité plus importante sur les cellules en phase exponentielle de croissance que sur les cultures en phase stationnaire de croissance : la période optimale de déshydratation se situe 48 heures après établissement de la phase stationnaire.

On a noté pour quelques souches atomisées avec du lait, suivant les mêmes conditions opératoires, des écarts importants. Par exemple, les taux de survie en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance sont respectivement de 1% et 18,9% avec la souche G49 ; de 0,7% et 3,9% avec la souche 3.32 ; de 2,3% et 40% avec la souche J315.

2.3 / Discussion

La plus grande sensibilité des cellules en phase exponentielle de croissance a déjà été observée avec Rhizobium meliloti (116), ainsi qu'avec quelques autres microorganismes (8) sans qu'il en soit donné d'explication.

La synthèse d'exopolysaccharides ne semble pas expliquer la résistance à la déshydratation des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance. En effet, ces observations sont valables aussi bien avec les cultures réalisées en milieu YEM et ISWARAN (synthèse de polysaccharides) qu'en milieu TYm où les cellules en sont dépourvues (131).

Par contre, des investigations récentes montrent que les cellules de Bradyrhizobium japonicum accumulent de l' α - α tréhalose et dans une moindre mesure du mannitol en quantités importantes (170). Cette accumulation dépend de la composition du milieu, mais surtout du stade de croissance de la souche; elle est maximale entre 6 et 8 jours de culture. L'auteur émet l'hypothèse que cette accumulation de tréhalose

Tableau XXVIII

Comparaison des taux de survie des souches 3.2. et 3.32 atomisées dans des conditions identiques, et tableau d'analyse de la variance.

Support	Souche 3.2 concentration bactérienne / gMS avant désh. après désh.	T	Souche 3.32 concentration bactérienne / gMS avant désh. après désh.	T
Lait écrémé 10% Saccharose 2 % TY	4,3.10 ¹² - 9,3.10 ¹¹	21,6 %	4,7.10 ¹² - 2,6.10 ¹¹	5,5 %
Lait écrémé 10% Saccharose 2 % Huile sil. 0,5% TY	2,1.10 ¹² - 1,2.10 ¹²	57,1 %	1,5.10 ¹³ - 3,4.10 ¹¹	2,3 %
Lait écrémé 10% Saccharose 2 % H ₂ O	2,5.10 ¹² - 7,8.10 ¹¹	31,2 %	4,2.10 ¹² - 9,7.10 ¹⁰	2,3 %
Lait écrémé 10% Saccharose 2 % gomme arabiq.1%	1,5.10 ¹² - 4,3.10 ¹¹	28,6 %	7,4.10 ¹² - 1,1.10 ¹¹	1,5 %
Lait écrémé 10% Saccharose 2 % H ₂ O	1,1.10 ¹¹ - 3,1.10 ¹⁰	28,2 %	2,5.10 ¹² - 6,8.10 ⁹	0,3 %



- désh. = déshydratation
 T = taux de survie en pourcentage
 MS = Matière sèche
 Arabiq. = arabe
 Sil. = silicone

Tableau d'analyse de la variance.

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Souche	1	2396,3	2396,3	24,87**
Variation résiduelle	8	770,7	96,3	
TOTAUX	9	3167,0		

$F_{1-\alpha/2} = 14,7 ; \alpha = 1 \%$

pourrait être en rapport avec la tolérance des espèces de Rhizobium à la dessiccation, toutes les espèces en accumulant en quantités variables. Le tréhalose est accumulé chez de nombreux champignons inférieurs, dans les formes sporulées (Phycomyces, Dictyostellum, levure de boulangerie) qui peuvent se conserver en l'état déshydraté pendant de nombreuses années sans perte de viabilité (176). Il est également accumulé par des cyanobactéries en réaction à leur exposition à des milieux hypertoniques (113).

D'autre part, Crowe et al (34) ont montré en prenant des modèles de la membrane plasmique, que le tréhalose est un agent stabilisateur des membranes lipidiques qui subissent une déshydratation complète. L'étude est réalisée avec des membranes artificielles à base de phosphatidylcholine, dans lesquelles sont incluses des ATPases activées par le Calcium. Il est montré que l'élimination de l'eau des membranes phospholipidiques normalement hydratées, provoque la formation de liaisons de type Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées ; les lipides se "figent" et la température de transition de phase est augmentée. Au cours de cette transition de phase, les protéines intramembranaires sont exclues des cristaux. A la réhydratation, les vésicules membranaires montrent des dommages morphologiques et une redistribution des protéines dont les propriétés de transport sont perdues. Lorsque les mêmes membranes sont additionnées de tréhalose, les lipides ne subissent pas de gélification, et les membranes sont intactes après déshydratation. L'addition de tréhalose à 20%, proportion rencontrée chez les microorganismes anhydrobiotiques, donne aux phospholipides déshydratés des propriétés physiques identiques à celles des phospholipides normalement hydratés. L'auteur montre par des études complémentaires, que le tréhalose agit en établissant des liaisons hydrogène avec les groupements phosphates des têtes polaires lipidiques ; ceci a pour effet d'écarter les chaînes hydrocarbonées et de prévenir les phénomènes de transition de phase, néfastes au maintien de l'intégrité membranaire. Le tréhalose a de fait un comportement identique à celui des molécules d'eau dans le maintien de la structure membranaire en double couche. Cette propriété n'est pas partagée par tous les hydrates de carbone.

Cette particularité du tréhalose pourrait trouver confirmation dans les travaux de Mügnier et Jung (91, 92, 124). Ces auteurs obtiennent une excellente conservation à différentes humidités relatives d'un inoculum déshydraté de Rhizobiums à base de gomme xanthane et de farine de caroubier additionné de tréhalose ou de sorbitol ; les vingt autres solutés donnent de moins bons résultats.

Il serait très intéressant d'approfondir ces investigations au niveau cellulaire. La recherche d'accumulation de saccharides et de polyols, pourrait permettre d'établir des relations avec l'aptitude des souches à survivre lors de la déshydratation. L'étude des fractions membranaires des cellules, et de leur comportement à la déshydratation en présence de tels métabolites, serait intéressante à mener pour comprendre le mécanisme protecteur de certaines substances.



B / ETUDE DE LA CONSERVATION DES CELLULES DESHYDRATEES.

Cette partie de l'étude consiste à déterminer les paramètres optimaux de conservation des cellules déshydratées de Bradyrhizobium japonicum. A cette fin, le rôle du support, de la température, de l'atmosphère et de l'humidité relative de conservation ont été étudiés.

I / ESSAIS PRELIMINAIRES.

Lors des essais préliminaires réalisés sur les cellules de la souche CB 1809 issues d'un même fermenteur (milieu TY), la conservation des cellules atomisées avec trois supports différents a été suivie. Les inoculats déshydratés sont conservés en l'état, sous vide partiel, à 4°C. Pour des populations initiales de même ordre de grandeur, la survie à 100 jours est très différente suivant les supports. Les concentrations bactériennes initiales et finales (exprimées en log) sont respectivement de 9,8 & 5,6 pour l'inositol, de 8,9 & 6,4 pour le lait, de 8,6 & 2 pour la maltodextrine.

En utilisant les mêmes modalités de conservation, on a noté que, pour les inoculums destinés aux parcelles expérimentales et réalisés par atomisation en présence de lait écrémé ou de maltodextrine, la population bactérienne se stabilise au bout d'un an, à une valeur approximative de 5 avec le lait, entre 2 et 4 avec la maltodextrine.

Des numérations de contrôle effectuées sur divers inoculats, ont montré des courbes de perte de viabilité de type allométrique, exponentiel ou linéaire suivant les supports et les modalités de conservation. Le premier type, se traduit par une perte de viabilité importante en début de stockage ; la population se stabilise par la suite. Dans le deuxième cas, la mortalité est moins forte en début de stockage, mais se prolonge sur de plus longues périodes ; la courbe de survie est légèrement décroissante tout au long de la période de stockage. Pour le modèle linéaire, la perte de viabilité par unité de temps est constante.

Pour toutes les expérimentations effectuées, les mêmes conventions seront adoptées ; on notera :

Y = concentration bactérienne exprimée en logarithme décimal du nombre de Bradyrhizobium japonicum par gramme de matière sèche.

X = nombre de jours.

II / INFLUENCE DE L'ATMOSPHERE DE CONSERVATION ET DU MILIEU DE CULTURE SUR LA VIABILITE DES INOCULUMS.

1 / PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Certains auteurs attribuent à la présence de polysaccharides bactériens, un rôle de protection vis à vis des phénomènes de déshydratation rencontrés dans le sol par les Rhizobiums (99, 189). Afin de mettre en évidence leur influence, des cultures de la souche G49 ont été atomisées après concentration et addition de lait écrémé (10%) et de saccharose (2%). Les milieux TY et ISWARAN dont elles sont issues, ont été utilisés afin de déceler éventuellement une incidence de la présence d'exopolysaccharides bactériens synthétisés dans le milieu ISWARAN. Les milieux de cultures sont éliminés par centrifugation. Dans le cas du milieu ISWARAN, 50 ml de polysaccharides bactériens sont maintenus dans la suspension à atomiser (soit 20% du volume).

Les inoculats ainsi produits, sont conservés, sous vide partiel, sous azote ou sous air à 4°C. A intervalles de temps réguliers, des numérations sont effectuées sur 100 mg de poudre, afin d'estimer la perte de viabilité des inoculats pour les différentes modalités de conservation. Les résultats nous ont permis d'établir les équations de régression relatives à chaque cas (Tableaux XXIX à XXXI - Figures 14 à 17).

2 / INCIDENCE DU MILIEU D'ORIGINE DE LA CULTURE.

En comparant deux à deux, par le test t de Student, les coefficients de régression relatifs aux courbes de survie sous une atmosphère donnée, on note pour chacune des modalités de conservation que les coefficients de régression sont égaux deux à deux, au seuil $\alpha = 5\%$ (Tableaux XXX & XXXI).

Figure 14

Courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu TY ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

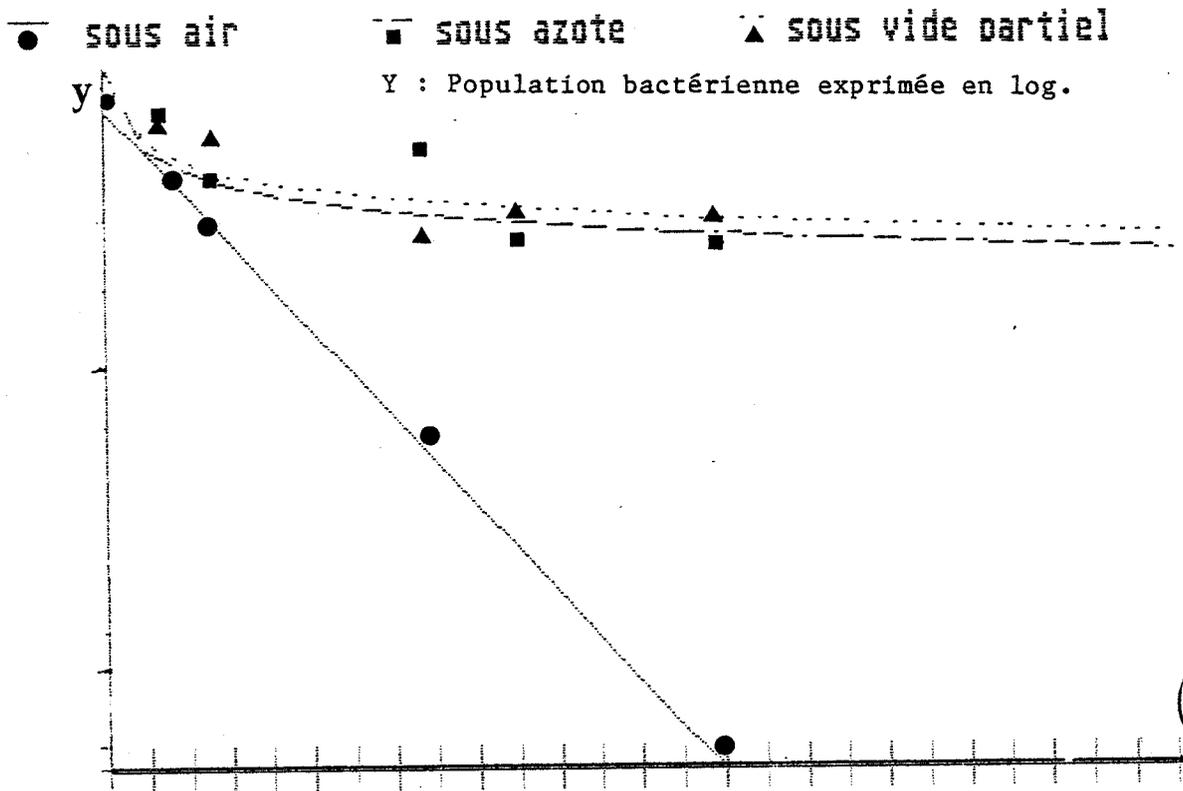


Figure 15

Courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu ISWARAN ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

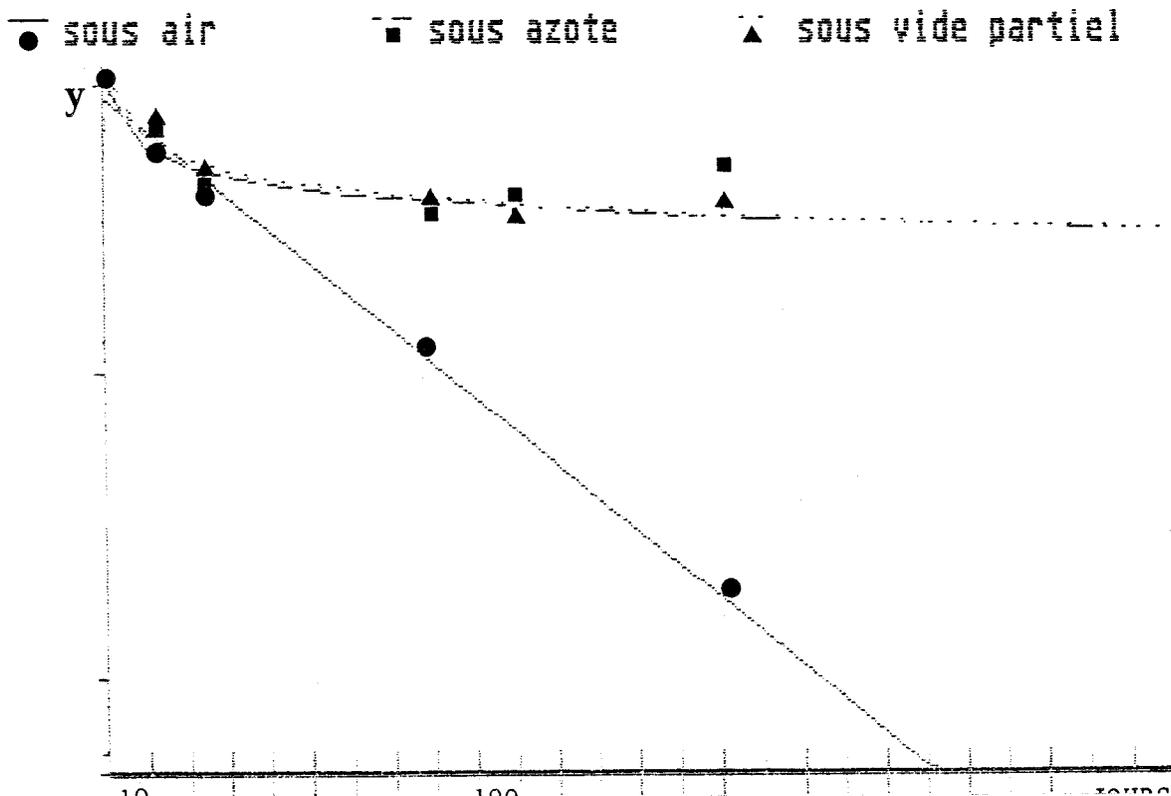


Figure 16

Modélisation des courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu TY ; support d'atomisation : lait (10 %), saccharose (2 %).

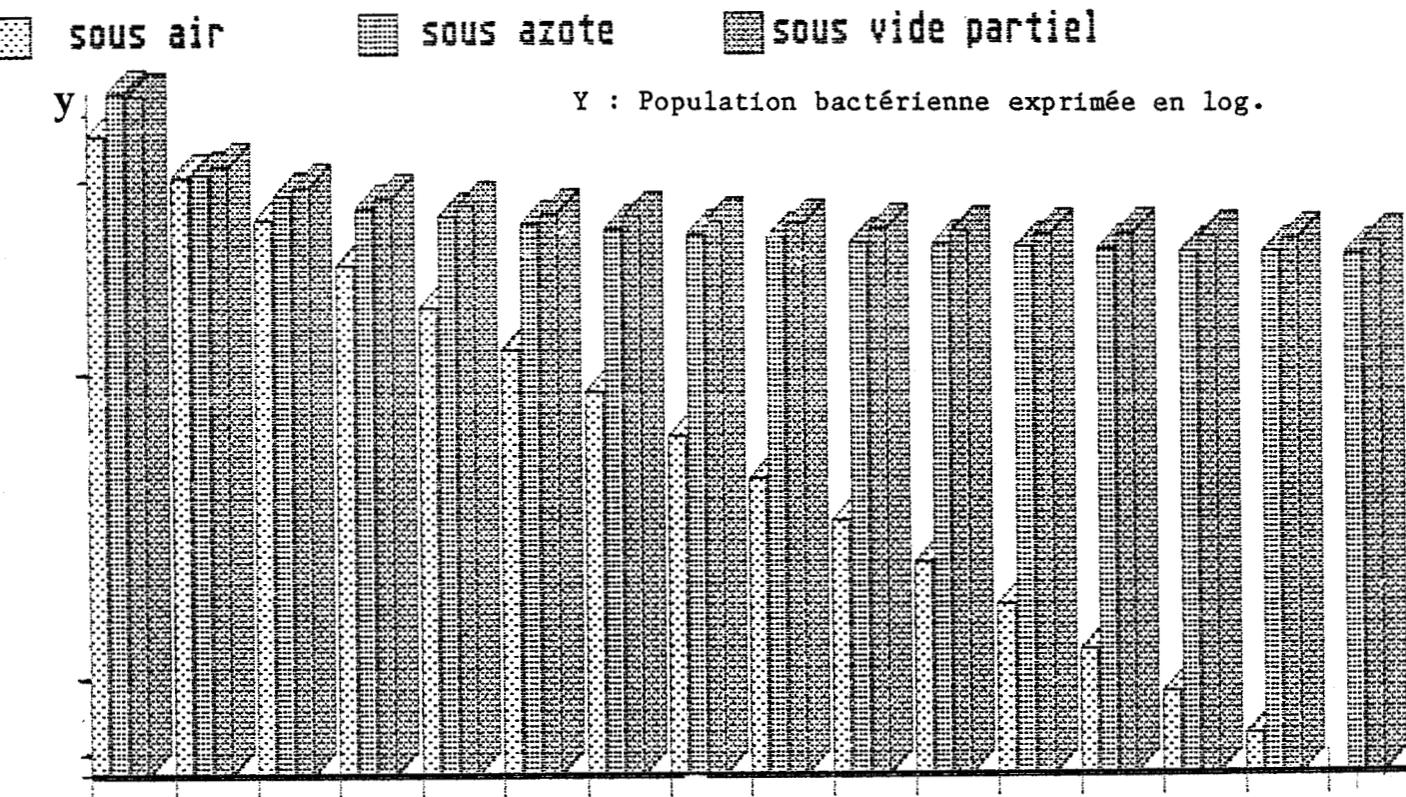


Figure 17

Modélisation des courbes de survie de la souche 3.55 sous différentes atmosphères de conservation (air, vide partiel, azote) à 4°C. Cultures réalisées en milieu ISWARAN ; support d'atomisation: lait (10 %), saccharose (2 %).

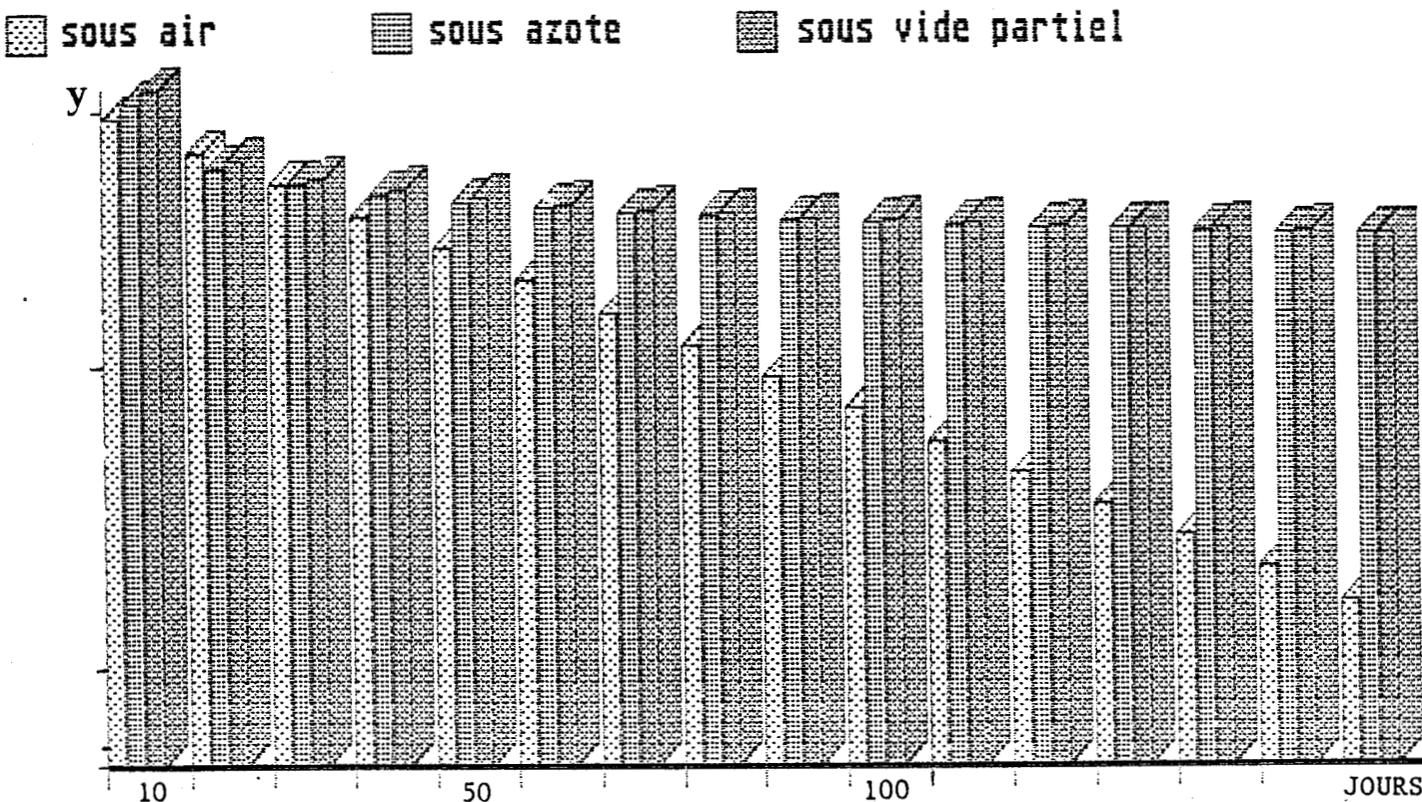


Tableau XXIX

Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote

Culture et atomisation avec le milieu ISWARAN
 Tests de signification des coefficients de régression
 Test d'égalité des coefficients de régression

Milieu ISWARAN - Conservation sous azote

équation de régression : $Y = 8,76 (X)^{-0,0444}$
 coefficient de corrélation : $r = 0,937$
 Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	$6,496 \cdot 10^{-3}$	$6,496 \cdot 10^{-3}$	28,6*
Ecart par rapport à la régression	4	$9,079 \cdot 10^{-4}$	$2,270 \cdot 10^{-4}$	
TOTAUX	5	$7,404 \cdot 10^{-3}$		

Milieu ISWARAN - Conservation sous vide

équation de régression : $Y = 8,95 (X)^{-0,0481}$
 coefficient de corrélation : $r = 0,967$
 Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	$7,61 \cdot 10^{-3}$	$7,61 \cdot 10^{-3}$	58,09**
Ecart par rapport à la régression	4	$5,24 \cdot 10^{-4}$	$1,31 \cdot 10^{-4}$	
TOTAUX	5	$8,13 \cdot 10^{-3}$		

Test de Hartley d'égalité des variances relatives aux 4 régressions des tableaux XXIX et XXX

$H_{obs} = 4,45$ $H_{0,95} = 20,6$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

Test d'égalité des coefficients de régression

$t_{1-\alpha/2} = 2,306$ $t_{obs} = 0,355$ $\alpha = 5 \%$

L'hypothèse d'égalité des coefficients est acceptée au seuil $\alpha = 5 \%$

Tableau XXX

Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote

Culture issue du milieu TY

Tests de signification des coefficients de régression

Test d'égalité des coefficients de régression

Milieu TY - Conservation sous azote

équation de régression : $Y = 8,72 (X)^{-0,0556}$

coefficient de corrélation : $r = 0,919$

Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,01017	0,01017	21,6*
Ecart par rapport à la régression	4	0,00188	0,00047	
TOTAUX	5	0,0120		

Milieu TY - Conservation sous vide

équation de régression : $Y = 8,66 (X)^{-0,0485}$

coefficient de corrélation : $r = 0,877$

Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,0077	0,0077	58,09**
Ecart par rapport à la régression	4	0,00233	$5,82 \cdot 10^{-4}$	
TOTAUX	5	0,0100		

Test d'égalité des coefficients des régressions relatives aux conservations sous vide et sous azote.

$$t_{1-\alpha/2} = 2,306 \quad t_{\text{obs}} = 0,397 \quad \alpha = 5 \%$$

L'hypothèse d'égalité des coefficients est acceptée au seuil $\alpha = 5 \%$

Test d'égalité des coefficients de régression entre les milieux TY et ISWARAN : conservation sous vide.

$$t_{1-\alpha/2} = 2,306 \quad t_{\text{obs}} = 0,0245 \quad \alpha = 5 \%$$

L'hypothèse d'égalité des coefficients est acceptée au seuil $\alpha = 5 \%$

Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les courbes de survie des inoculums produits avec les cellules issues des deux milieux de culture ; la synthèse de polysaccharides bactériens dans le milieu ISWARAN ne protège pas les cellules déshydratées.

D'autres essais réalisés avec la souche G49, montreraient même un effet défavorable, sur la conservation des cellules déshydratées, de leur présence en quantités importantes dans le support d'atomisation (Tableau XXX bis). Dans ces essais la totalité des polysaccharides est gardée dans le support d'atomisation. Les résultats des numérations montrent une mortalité plus importante au cours du temps, dans les inoculums contenant des quantités importantes de polysaccharides. Ces résultats ne sont pas forcément en contradiction avec les observations réalisées dans le sol. En effet dans le sol, la présence de ces polysaccharides très hygroscopiques peut limiter les transferts de l'eau et éviter la dessiccation des cellules (29, 98, 99, 112, 189). Leur présence dans un inoculum fortement déshydraté maintiendrait à l'inverse des quantités d'eau trop élevées pour inhiber le fonctionnement enzymatique des cellules, condition nécessaire au maintien de leur intégrité fonctionnelle (15, 87, 116, 118, 124, 187, 188).

3 / INCIDENCE DE L'ATMOSPHERE DE CONSERVATION.

Suivant l'atmosphère de conservation, les courbes de survie des inoculums de la souche G49 décrits en 1 s'établissent suivant des modèles de régression différents.

- sous azote et sous vide, les modèles de régression se rapprochant le plus de l'observation sont de type allométrique $Y + a \cdot X^b$ (Tableaux XXIX & XXX). Pour chaque milieu, les coefficients de régression relatifs aux deux modalités de conservation ont été comparés deux à deux par le test t de Student. L'hypothèse d'égalité des coefficients est acceptée au seuil $\alpha = 5\%$.

La comparaison de ces deux modes de conservation a également été réalisée avec les souches 3.2 et 3.32 (Tableaux XXXII & XXXIII). La réalisation des tests de Student conclut, dans chacune des expérimentations, à l'égalité des coefficients de régression estimés des courbes de survie.

Tableau XXX bis

Comparaison de l'évolution des concentrations bactériennes au cours du temps, d'inoculums de la souche Bioprox confectionnés avec ou sans polysaccharides bactériens.

milieu de culture	support d'atomisation	% volumétrique de polysaccharides dans le support	concentration bactérienne après 225 à 250 jours		
			initiale	30 jours	jours
ISWARAN	Lait + sacch.	20%	8,8	7,5	6,8
ISWARAN	Lait + sacch.	80%	9,9	6,0	3,2
ISWARAN	Lait + kaoli.	50%	10,8	6,2	3,5
TY	Lait + kaoli.	0%	8,8	6,6	3,8
	+ sacch.				
TY	Lait + sacch.	0%	8,3	7,8	6,5
TY	Lait	0%	10,1	7,0	5,0

sacch. : saccharose

kaoli. : kaolinite

Tableau XXXI

Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche Bioprox. Conservation sous air

Cultures en milieu TYm ou Iswaran

Tests de signification des coefficients de régression

Test d'égalité des coefficients de régression

Milieu ISWARAN

équation de régression : $Y = 8,54 - 0,0429 X$

coefficient de corrélation : $r = 0,986$

Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	5,88	5,88	103,8**
Ecart par rapport à la régression	3	0,16995	0,05665	
TOTAUX	4	6,05		



Milieu TYm

équation de régression : $Y = 8,16 - 0,0548 X$

coefficient de corrélation : $r = 0,996$

Test de signification du coefficient de régression

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	9,604	9,604	396,86***
Ecart par rapport à la régression	3	0,0726	0,00242	
TOTAUX	4	9,677		

Test égalité des variances

$$H_{\text{Obs}} = 2,341 \quad \alpha = 5 \% \quad H_{1-\alpha} = 15,4$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

Test d'égalité des coefficients de régression

$$t_{1-\alpha/2} = 2,447 \quad \alpha = 5 \%$$

$$t_{\text{Obs}} = 0,086$$

L'hypothèse d'égalité des coefficients de régression entre les courbes de survie des inoculats issus des milieux TYm et ISWARAN conservés sous air est acceptée.

Tableau XXXII

Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche 3.32. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote
Inoculum atomisé avec du lait + saccharose

Sous vide

équation de régression : $Y = 10,43 (X)^{-0,0866}$
coefficient de corrélation : $r = 0,94$

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,0231	0,0231	21*
Ecart par rapport à la régression	3	0,0033	0,0011	
TOTAUX	4	0,0264		



Sous azote

équation de régression : $Y = 10,30 (X)^{-0,0907}$
coefficient de corrélation : $r = 0,98$

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,0223	0,0223	43,7*
Ecart par rapport à la régression	2	0,00102	0,00051	
	3	0,0233		

Test de Hartley d'égalité des variances

$H_{obs} = 2,59$ $H_{0,95} = 9,60$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée

Test de Student d'égalité des coefficients de régression

$t_{obs} = 0,184$ NS $\alpha = 5 \%$ $t_{1-\alpha/2} = 2,571$

Tableau XXXIII

Etude des coefficients de régression des courbes de conservation de la souche 3.2. Comparaison entre conservation sous vide et sous azote
Inoculum atomisé avec du lait + saccharose

Sous vide

équation de régression : $Y = 11,89 (X)^{-0,0993}$

coefficient de corrélation : $r = 0,987$

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,0295	0,0295	77,63*
Ecart par rapport à la régression	2	0,00076	0,00038	
TOTAUX	3	0,0303		



Sous azote

équation de régression : $Y = 11,88 (X)^{-0,0730}$

coefficient de corrélation : $r = 0,982$

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression	1	0,0159	0,0159	56,79*
Ecart par rapport à la régression	2	0,00056	0,00028	
	3	0,0165		

Test de Student d'égalité des coefficients de régression

$t_{obs} = 1,77$ NS $\alpha = 5 \%$ $t_{1-\alpha/2} = 2,776$

Ces résultats montrent que conservation sous azote et sous vide sont équivalentes pour le maintien des potentialités vitales des inoculums.

- le cas le plus défavorable à la survie de Bradyrhizobium japonicum est le cas de la conservation sous air. La concentration bactérienne suit une régression linéaire décroissante en fonction du temps ; on ne retrouve plus de bactéries après 150 jours de conservation (Figures 14 à 17, Tableau XXXI).

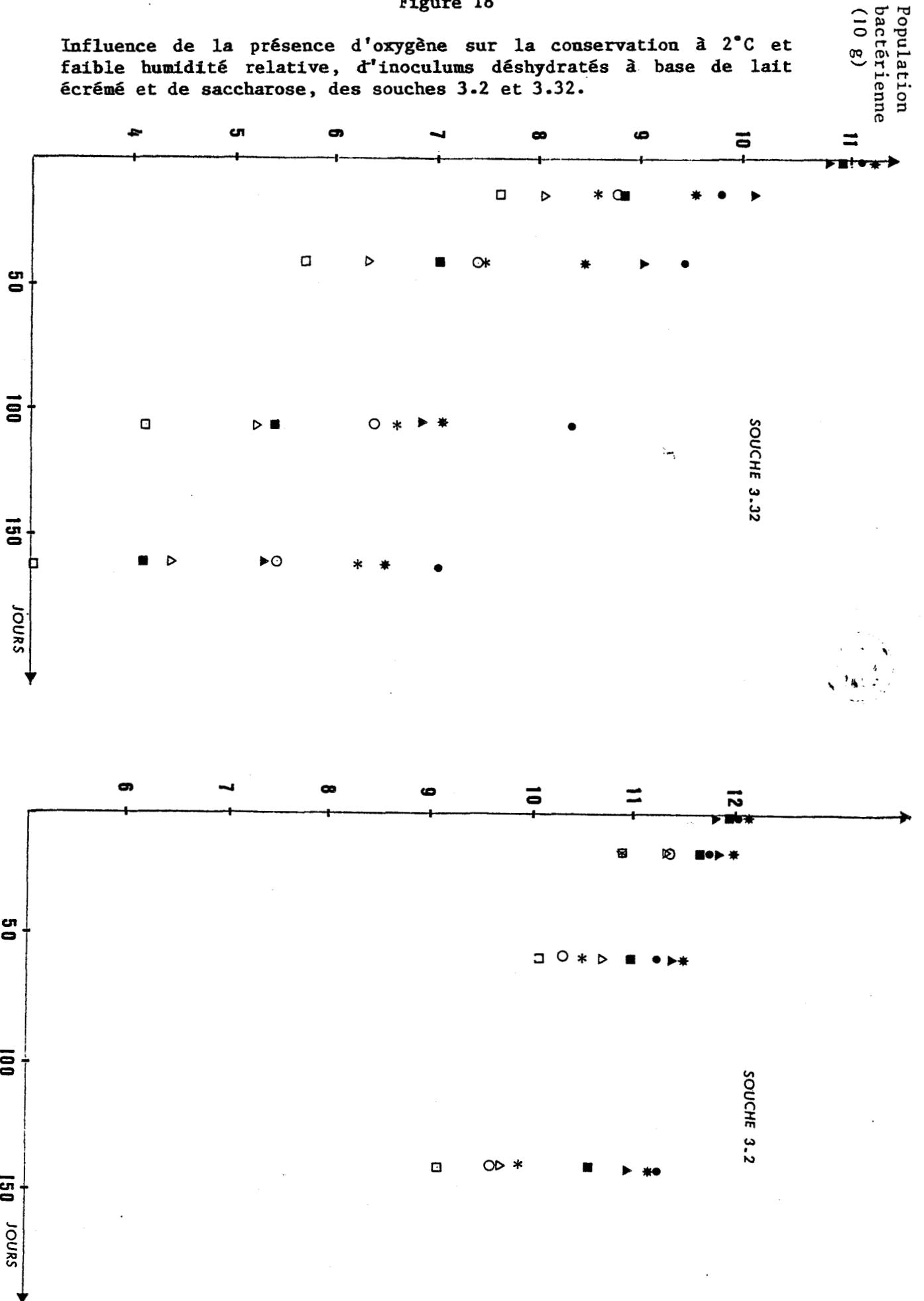
Etant donnée l'influence néfaste de l'oxygène sur la conservation des inoculums déshydratés, d'autres essais ont été réalisés afin d'essayer d'améliorer la conservation des inoculums en présence d'oxygène. L'expérimentation est réalisée avec la souche 3.2 et avec la souche 3.32. Des inoculums à base de lait écrémé et de saccharose ont été produits. Les cellules sont reprises dans l'eau pour l'inoculum témoin et maintenues dans le milieu de culture TYm pour les trois autres. De l'huile de silicone ou de la gomme arabique sont additionnées dans deux concentrés cellulaires. Chacun des inoculums produits est conservé sous azote et sous air, à 4°C à une humidité relative proche de 0 par addition de silicagel.

Les résultats des numérations de cellules viables (Figure 18) montrent que

- la souche 3.32 a une mortalité plus forte que la souche 3.2 quelles que soient les modalités de déshydratation et de conservation.
- La présence du milieu TYm dans le support d'atomisation favorise la survie des cellules déshydratées pour les deux modalités de stockage.
- Dans ces conditions de production et de stockage la longévité des inoculums est largement supérieure à 150 jours en présence d'oxygène, mais la concentration bactérienne ne reste à un niveau acceptable après cette période que dans le cas de la souche 3.2. On ne peut cependant savoir si cette forte augmentation de la période de survie des bactéries est imputable aux supports employés ou à la conservation à faible humidité relative. Ce paramètre sera étudié ultérieurement.

Figure 18

Influence de la présence d'oxygène sur la conservation à 2°C et faible humidité relative, d'inoculums déshydratés à base de lait écrémé et de saccharose, des souches 3.2 et 3.32.



- L' effet de la présence d'oxygène reste marqué, les concentrations bactériennes étant environ 10 fois plus faibles quand les inoculums sont conservés sous air.
- L'emploi d'un additif tel que l'huile de silicone semble protéger les cellules déshydratées, les concentrations cellulaires des inoculums conservés sous air sont en effet les plus fortes pour ce type d'inoculum. La période d'observation n'est cependant pas assez longue pour mettre en évidence les différences significatives.

En tout état de cause, la conservation en présence d'air qui est la solution la plus simple, reste à déconseiller pour de longues périodes de stockage ; il semble difficile de supprimer les effets indésirables de l'oxygène par des techniques simples.

III / ETUDE DE LA VIABILITE DES INOCULUMS EN CONSERVATION A DIFFERENTES HUMIDITES RELATIVES.

1 / INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE DE CONSERVATION.

Des inoculats des souches 3.2 et 3.32 ont été obtenus par atomisation de concentrés cellulaires additionnés de lait et de saccharose. A la sortie de l'atomiseur, les poudres sont à une a_w située entre 0,2 et 0,4. Des fractions de poudre de 100 mg environ sont réparties en tubes (50 x 10mm) et placées dans des enceintes à différentes a_w .

Pour une a_w donnée, les échantillons sont placés soit directement sous azote, soit exposés préalablement à un vide partiel pendant 24 heures puis placés sous azote, afin d'obtenir une mise à l'équilibre rapide de l'échantillon.

Des numérations de cellules viables sont effectuées à intervalles de temps réguliers sur ces échantillons, afin d'étudier l'influence de l'humidité relative de conservation sur la survie de Bradyrhizobium japonicum.

1.1 / Etude de la perte de viabilité d'inoculums de la souche 3.32 conservés à différentes humidités relatives à 20°C.

L' expérimentation a été renouvelée à deux reprises. Un mutant résistant à la streptomycine a été employé afin de faciliter le repérage de la souche 3.32. Les inoculums sont conservés à 20°C.

La première expérimentation a été effectuée sur un inoculum d'une concentration de $3,4 \cdot 10^9$ Bradyrhizobiums par gramme (soit $Y = 9,5$). Les résultats des dénombrements de cellules viables sont récapitulés dans la figure 19.

Les modèles de régression correspondant le mieux à l'observation ont été recherchés. Les courbes les mieux ajustées s'établissent suivant des modèles allométriques: $Y = a \cdot X^b$ (Tableau XXXIV)

Les tests d'égalité des coefficients de régression par le test t de Student donnent les résultats suivants pour la première expérimentation :

- Les régressions relatives aux a_w 0,0 - 0,11 et 0,23 doivent être considérées comme identiques, les différences n'étant pas significatives. De même, les coefficients de régression relatifs aux a_w 0,43 - 0,75 et 0,86 ne sont pas significativement différents. Par contre, entre les a_w 0,23 et 0,43 les valeurs de t_{obs} sont respectivement de 6,292** après vide partiel et de 2,894* pour les échantillons conservés sous azote. Les résultats des numérations sont donc significativement différents entre les échantillons conservés à faible a_w (<0,23) et les échantillons conservés à des a_w plus élevées, les faibles a_w étant les plus favorables à la survie (figures 19 & 20).
- La mise à l'équilibre rapide par l'établissement d'un vide partiel pendant 24 heures avant conservation sous azote, ne modifie pas significativement, les taux de survie de Bradyrhizobium japonicum dans l'inoculum.

aw de conservation	équation de régression	coefficient de corrélation	Résultat de test de signification du coefficient de régression ; F	Intervalle de confiance des coefficients de régression, $\alpha = 5 \%$
Mise à l'équilibre sous azote				
0,0	$Y = 10,5 (X) - 0,20683$	0,933	26,74*	$b \pm 0,1110$
0,11	$Y = 9,8 (X) - 0,1784$	0,979	89,53**	$b \pm 0,0521$
0,23	$Y = 8,6 (X) - 0,1795$	0,952	38,5**	$b \pm 0,0802$
0,43	$Y = 11,6 (X) - 0,5344$	0,956	42,2**	$b \pm 0,2284$
0,75	$Y = 12,4 (X) - 0,5141$	0,956	37,1**	$b \pm 0,2523$
0,86	$Y = 11,3 (X) - 0,5294$	0,958	79,5**	$b \pm 0,0044$
Mise à l'équilibre sous vide partiel				
0,0	$Y = 10,0 (X) - 0,2252$	0,976	79,5**	$b \pm 0,0699$
0,11	$Y = 9,1 (X) - 0,1885$	0,990	200,0***	$b \pm 0,0363$
0,23	$Y = 9,3 (X) - 0,1990$	0,985	126,3***	$b \pm 0,0491$
0,43	$Y = 10,4 (X) - 0,5327$	0,983	113,6***	$b \pm 0,1388$
0,75	$Y = 11,1 (X) - 0,5426$	0,973	72,1**	$b \pm 0,1774$
0,86	$Y = 11,0 (X) - 0,5369$	0,965	54,3**	$b \pm 0,2024$

Test d'égalité des variances par le test de Harthley $H = \frac{SCE \text{ max}}{SCE \text{ min}} = \frac{0,0791}{0,0017} = 46,53$; $H_{0,95} = 51,4$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée au seuil $\alpha = 5 \%$.

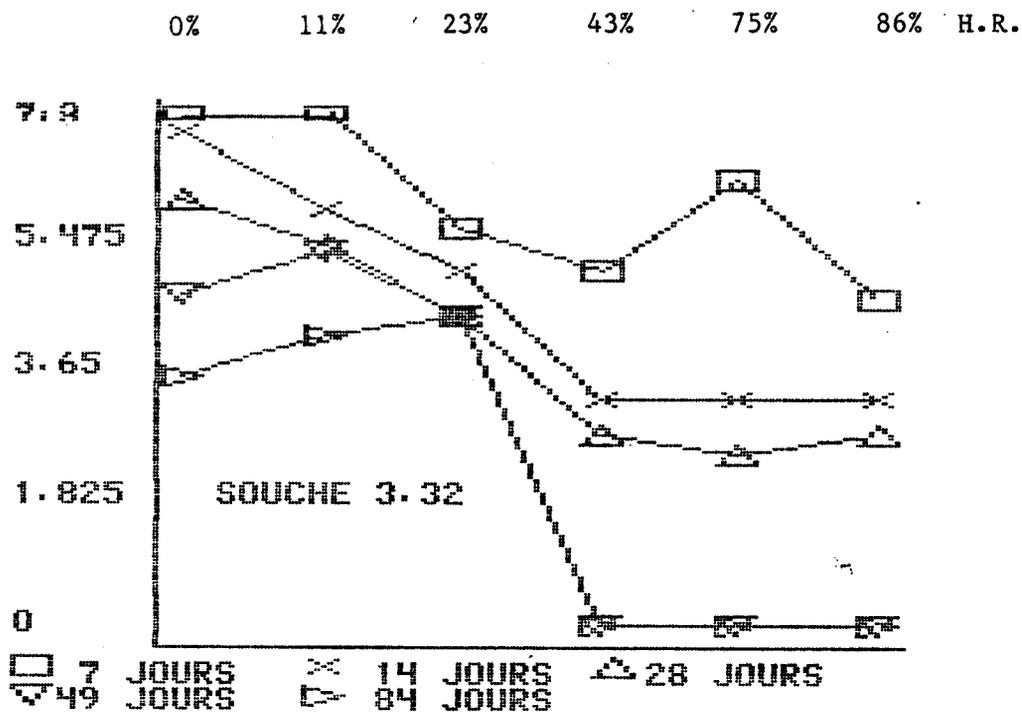
Tableau XXXIV

Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 à différentes humidités relatives de conservation. Population initiale $Y = 9,5$



Figure 19

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 9,5$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.



- Mise à l'équilibre sous azote.

- Mise à l'équilibre sous vide.

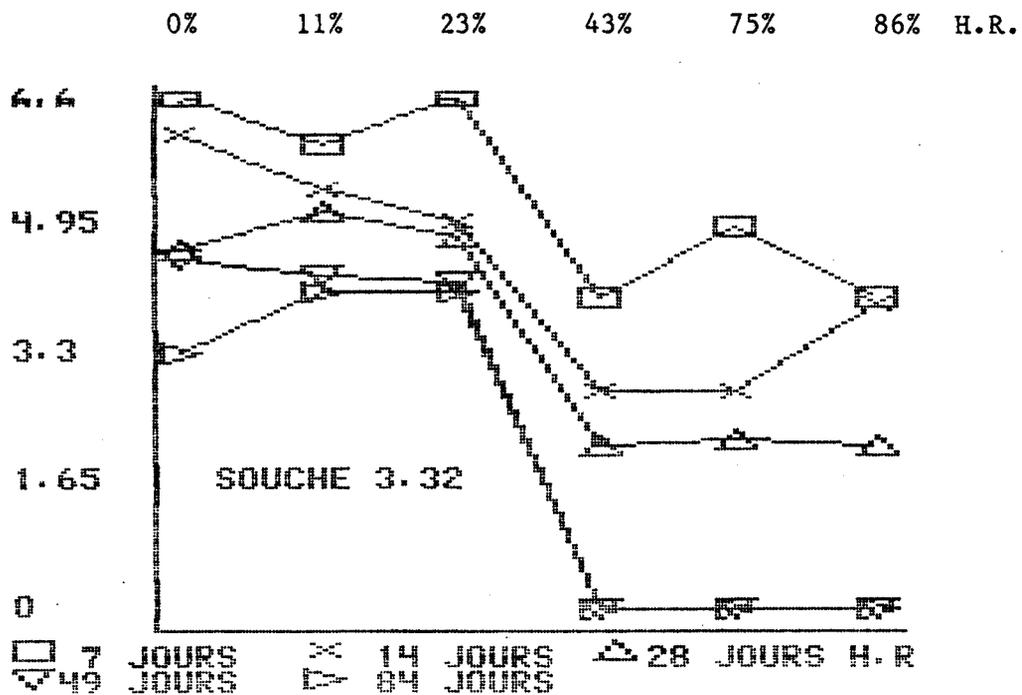
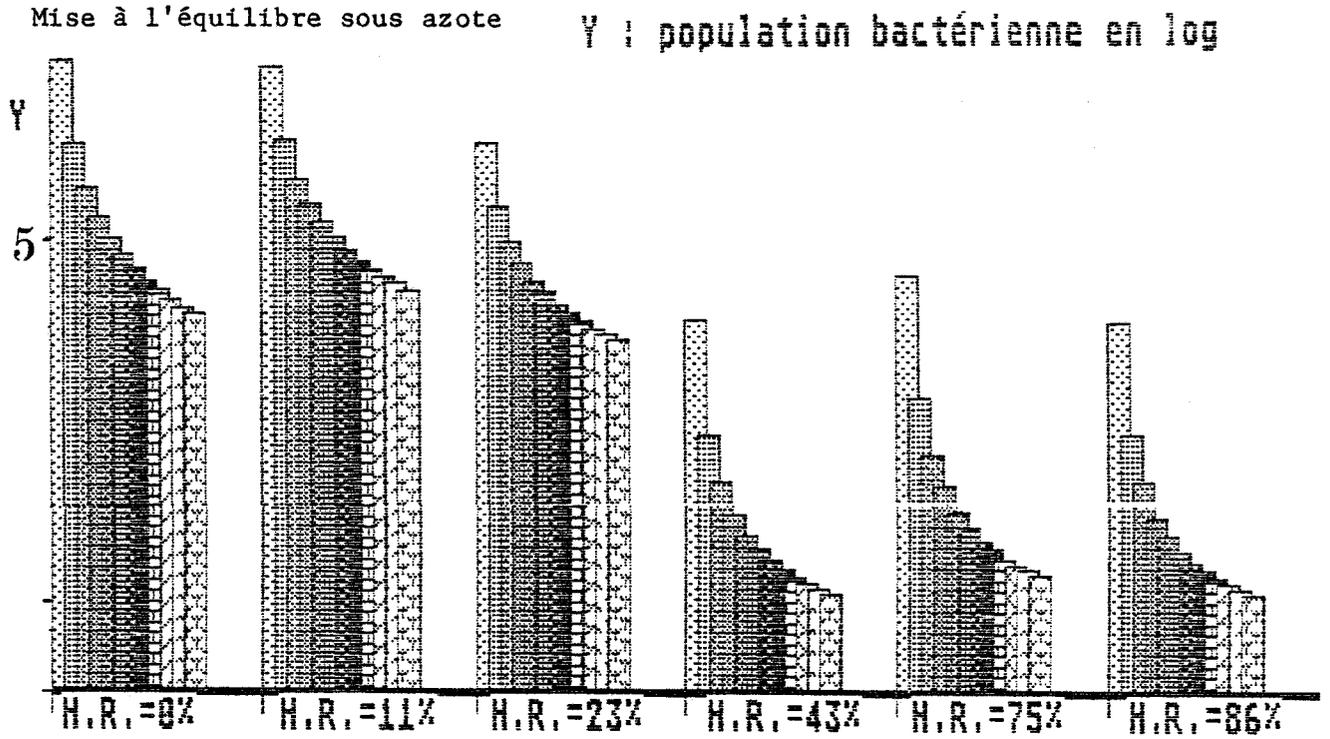
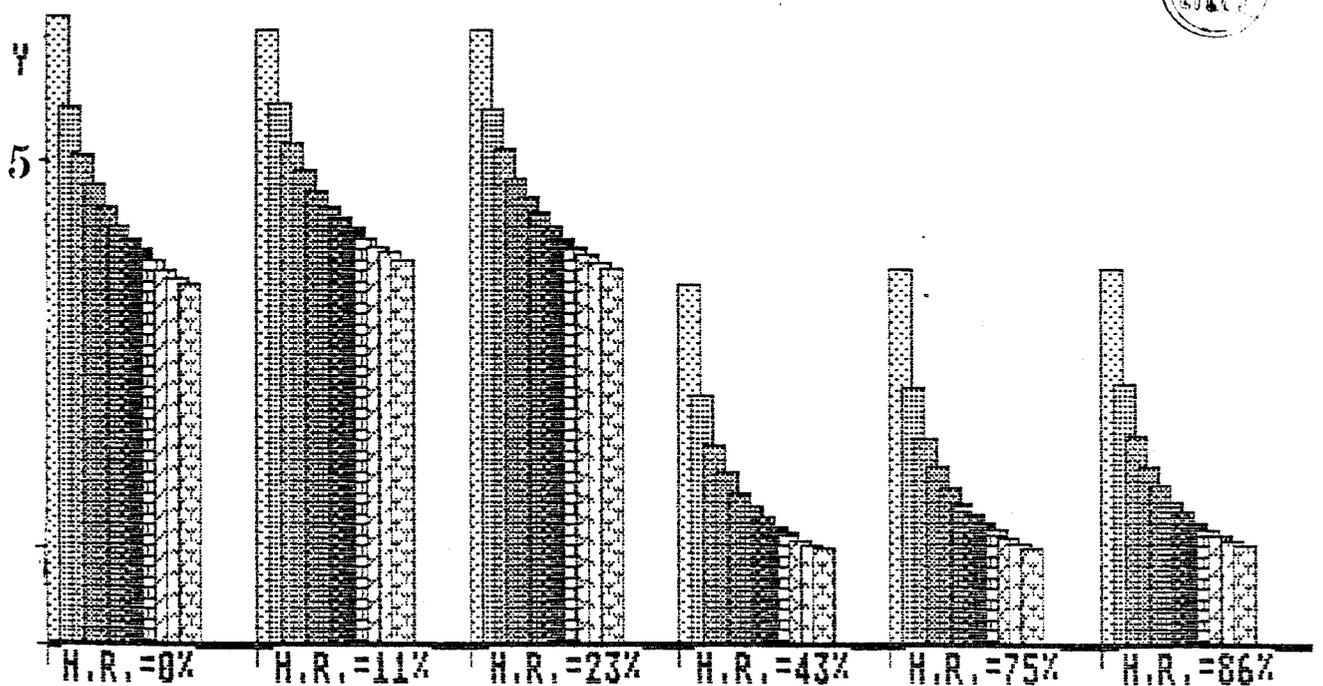


Figure 20

Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 9,5$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.



Mise à l'équilibre sous vide



La deuxième expérimentation (Figure 21) a été réalisée sur un inoculum d'une concentration de $9,6.10^{10}$ Bradyrhizobiums par gramme (soit $Y = 11$).

Les modèles de régression sont allométriques pour les faibles a_w , exponentiels pour les a_w élevées $Y = a \cdot b^X$ et dans un cas (a_w 0,86) on observe une décroissance linéaire $Y = a - b \cdot X$ (Tableau XXXV & Figure 22).

La compararaison des coefficients de régression par le test t de Student permet de tirer les conclusions suivantes :

- les a_w 0,0 - 0,11 et 0,23 sont les plus favorables à la conservation de l'inoculum.

Dans cette expérimentation, il est possible de mettre en évidence des différences significatives entre les a_w 0,11 et 0,23, l' a_w 0,11 étant meilleure. (comparaison des a_w 0,11 et 0,23 après mise à l'équilibre sous vide : $t_{obs.} = 2,661^*$).

Il existe également une différence significative ($t_{obs.} = 2,674^*$) entre les coefficients de régression relatifs aux a_w 0,0 et 0,11 après mise à l'équilibre sous vide partiel, alors que les coefficients de régression estimés relatifs à ces mêmes a_w et stockage sous azote sont égaux au seuil $\alpha = 5\%$ ($t_{obs.} = 1,016NS$). On note également, que les résultats des numérations effectuées sur les échantillons conservés à $a_w = 0,0$ sont différents au seuil $\alpha = 0,1\%$, suivant que la mise à l'équilibre soit effectuée sous azote ou sous vide ($t_{obs.} = 11,3^{***}$). Ces résultats montrent clairement qu'une déshydratation poussée et obtenue rapidement est néfaste à un maintien fonctionnel des cellules sur de longues périodes. Ces résultats ne sont pas nécessairement en contradiction avec les précédents, car une moins bonne adéquation des modèles de régression à l'observation suffit à diminuer la sensibilité des tests.

- Aux a_w élevées, il y a réhydratation des poudres dont la valeur d' a_w se situe entre 0,2 et 0,4 à la sortie de l'atomiseur.

Les comparaisons des deux modalités de conservation ont été effectuées. La mise à l'équilibre rapide se révèle être néfaste à

a_w de conservation	équation de régression	coefficient de corrélation	Résultat de test de signification du coefficient de régression ; F	Intervalle de confiance des coefficients de régression, $\alpha = 5 \%$
Mise à l'équilibre sous azote				
0,0	$Y = 11 (X)^{-0,1045}$	0,948	35,5**	$b \pm 0,0486$
0,11	$Y = 11,3 (X)^{-0,1013}$	0,987	152,6***	$b \pm 0,0228$
0,23	$Y = 9,9 (0,9897)^X$	0,960	47,0**	$b \pm 0,0044$
0,43	$Y = 9,6 (0,9745)^X$	0,976	82,0**	$b \pm 0,0075$
0,75	$Y = 11,1 (0,9730)^X$	0,994	308,1***	$b \pm 0,0050$
0,86	$Y = 10,3 - 0,3887.X$	0,986	108,0**	$b \pm 0,1975$
Mise à l'équilibre sous vide partiel				
0,0	$Y = 11,2 (X)^{-0,1787}$	0,981	103,9**	$b \pm 0,0486$
0,11	$Y = 11,3 (X)^{-0,1420}$	0,984	123,3***	$b \pm 0,0358$
0,23	$Y = 11,9 (X)^{-0,2120}$	0,977	85,0**	$b \pm 0,0636$
0,43	$Y = 9,3 (0,9665)^X$	0,975	78,1**	$b \pm 0,0122$
0,75	$Y = 11,6 (0,9397)^X$	0,998	808,5***	$b \pm 0,0078$
0,86	$Y = 11,8 (0,9177)^X$	0,997	589,6***	$b \pm 0,0142$

Test d'égalité des variances par le test de Hartley : régressions allométriques $H_{obs} = 7,86$; $H_{0,95} = 25,2$
régressions exponentielles $H_{obs} = 27,75$; $H_{0,95} = 29,5$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

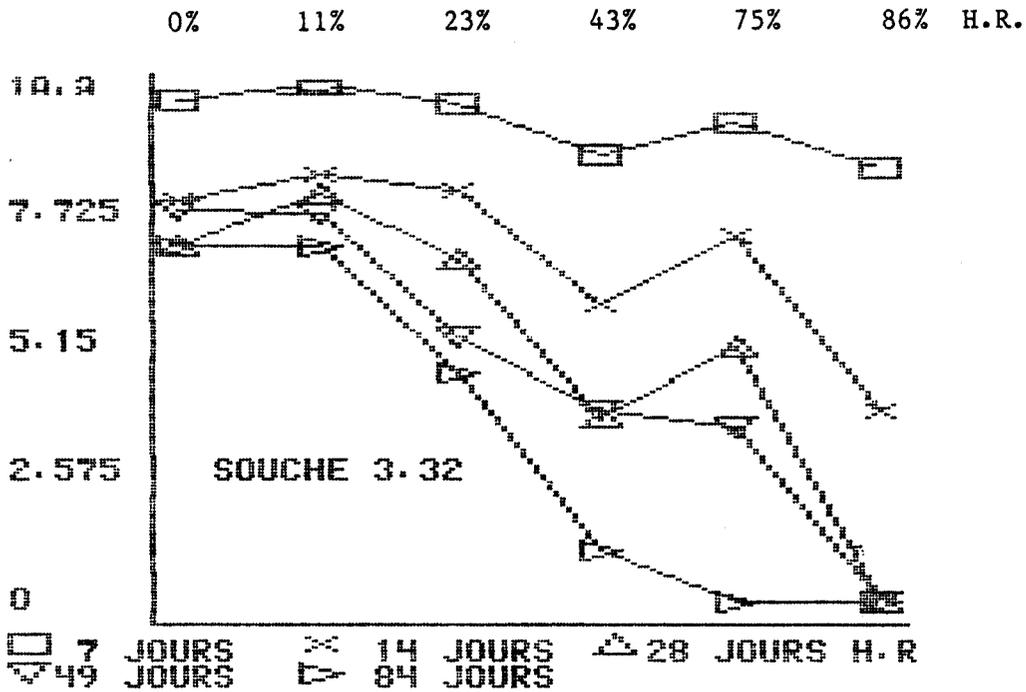
Tableau XXXV

Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 à différentes humidités relatives de conservation. Population initiale $Y = 11,0$



Figure 21

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 11$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.



Mise à l'équilibre sous azote

Mise à l'équilibre sous vide

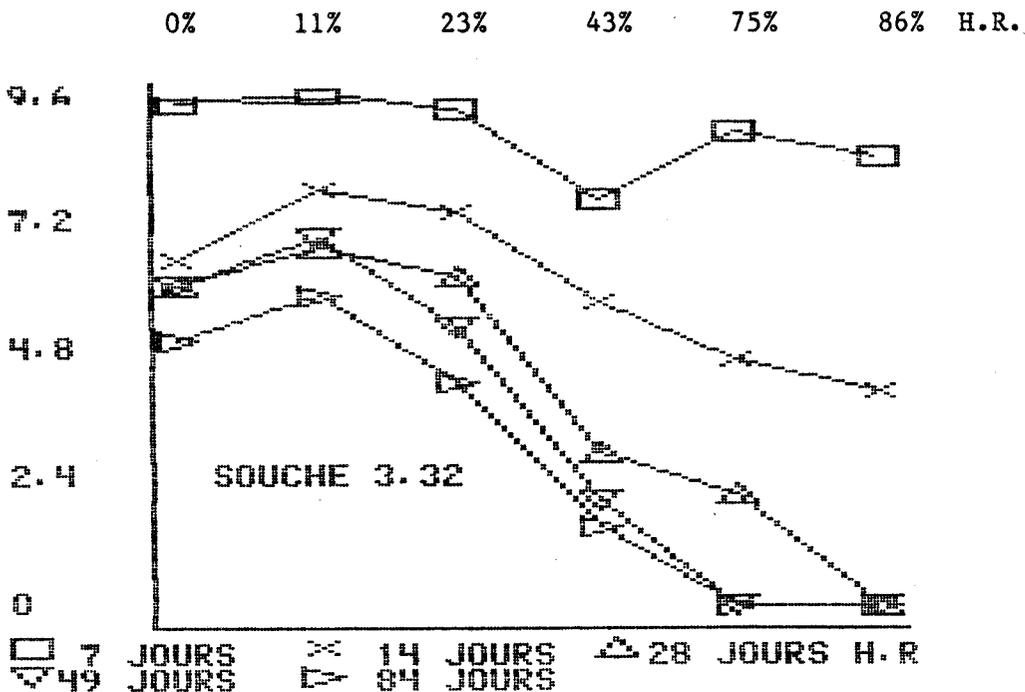
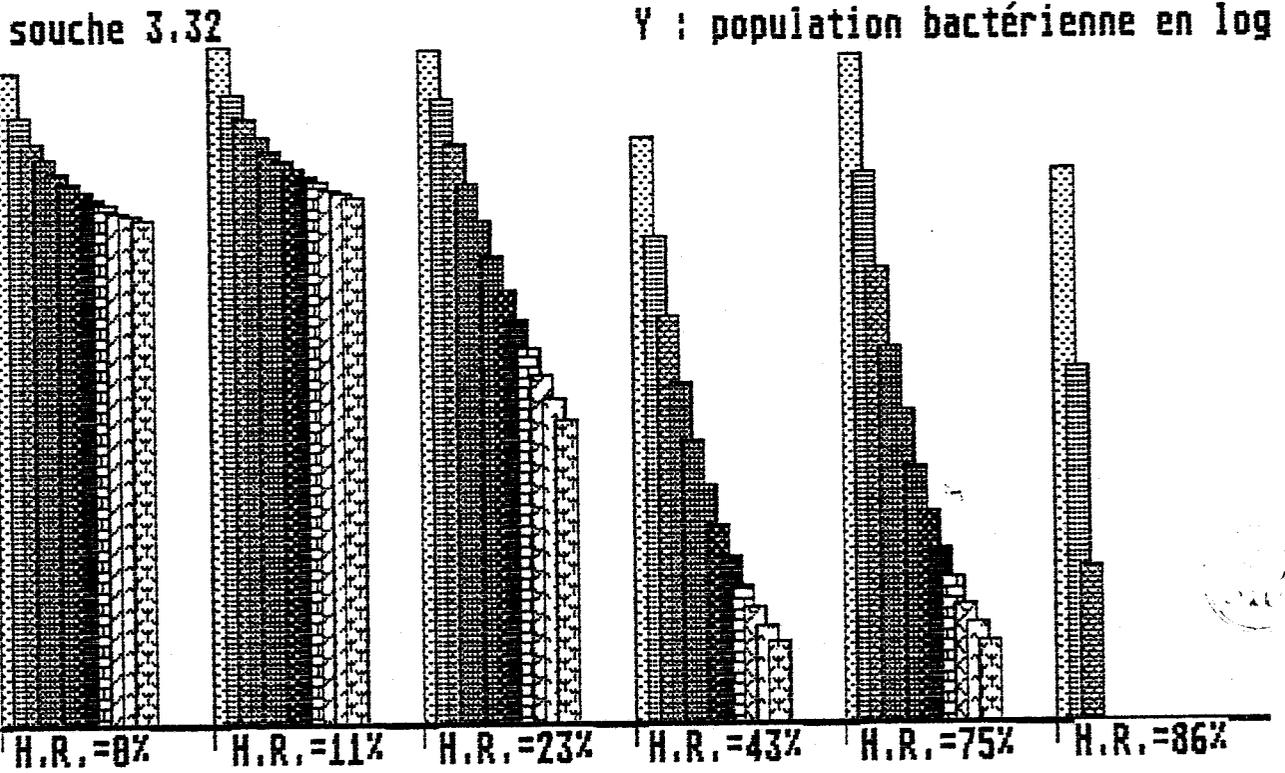


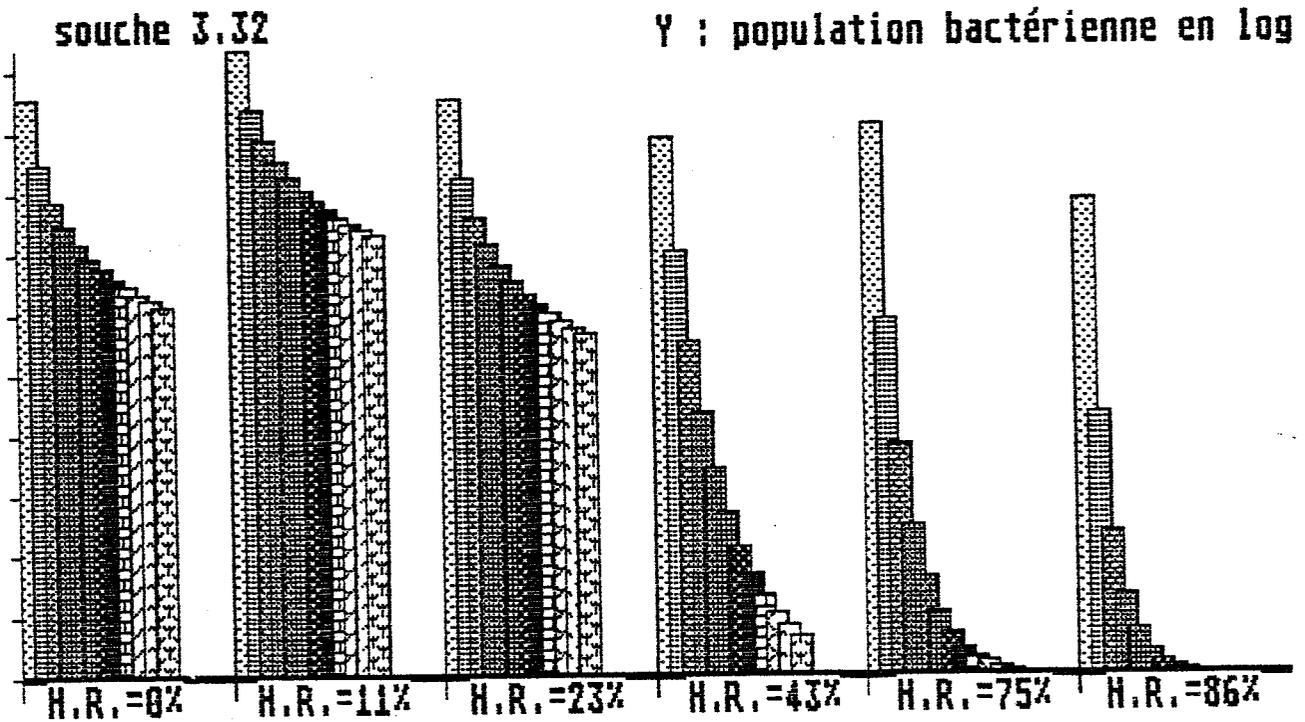
Figure 22

Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.32 de concentration initiale $Y = 11$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.

Mise à l'équilibre sous azoté



Mise à l'équilibre sous vide



la survie des cellules (par exemple: comparaison des coefficients de régression pour la valeur d' a_w 0,75 : $t_{obs.} = 7,266^{***}$).

En outre, la survie des cellules varie significativement pour les différentes valeurs d' a_w :

Après mise à l'équilibre sous vide partiel, les pertes de viabilité sont différentes entre les a_w 0,43 et 0,75 ($t_{obs.} = 4,349^{**}$) et entre les a_w 0,75 et 0,86 ($t_{obs.} = 5,089^{**}$).

Sous azote, les a_w 0,43 et 0,75 sont équivalentes et l' a_w 0,75 permet une meilleure survie que l' a_w 0,86.

Cette étude montre que les faibles a_w sont nécessaires à la survie des cellules de Bradyrhizobium japonicum dans l'inoculum et qu'il est indispensable d'éviter une réhumidification de la poudre obtenue par atomisation, par exposition à des humidités relatives supérieures à 23%. Cependant, à une température de 20°C, la viabilité de l'inoculum baisse rapidement, ce qui compromet la longévité de l'inoculum. Cette mortalité importante est peut être d'autant plus marquée que la souche 3.2 est très sensible à la déshydratation comme cela a été étudié (§II.3). Pour confirmer ou non les résultats obtenus, la même expérimentation est donc recommencée avec la souche 3.2 à deux températures de conservation : 2°C et 20°C.

1.2 / Conservation d'inoculums de la souche 3.2.

Un mutant de la souche 3.2 résistant à la streptomycine a été employé. Après atomisation, les inoculums sont répartis en tube comme précédemment et transférés dans les enceintes à différentes humidités relatives. Les échantillons sont placés sous azote, soit directement soit après établissement d'un vide partiel pendant 24 heures.

1.2.1 / Etude de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 conservé à différentes humidités relatives à 20°C.

L'expérimentation réalisée à 20°C est effectuée sur un inoculum d'une concentration de 5.10^{11} Bradyrhizobium japonicum par gramme (Y = 11,7).

Tableau XXXVI

Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes humidités relatives de conservation, à 20°C. Population initiale Y = 11,7

a_w	équation de régression	coefficient de corrélation	résultat test de signification	intervalle de confiance de b; $\alpha=5\%$	nombre de jours où Y < 9
-------	------------------------	----------------------------	--------------------------------	--	--------------------------

mise à l'équilibre et conservation sous azote.

0,0	$Y = 11,9 * (X)^{-0,0696}$	0,982	108,8***	$b \pm 0,0186$	54
0,11	$Y = 12,1 * (X)^{-0,1057}$	0,973	70,94**	$b \pm 0,0350$	16
0,23	$Y = 12,2 * (X)^{-0,1480}$	0,974	74,40**	$b \pm 0,0477$	8
0,43	$Y = 11,4 - 0,2758 * X$	0,999	1824,5***	$b \pm 0,0208$	9
0,75	$Y = 11,3 - 0,2169 * X$	0,996	366,0***	$b \pm 0,0313$	11
0,86	$Y = 11,3 - 0,3400 * X$	0,997	305,9**	$b \pm 0,0539$	7
Témoin	$Y = 10,9 - 0,1548 * X$	0,992	245,9***	$b \pm 0,0275$	12

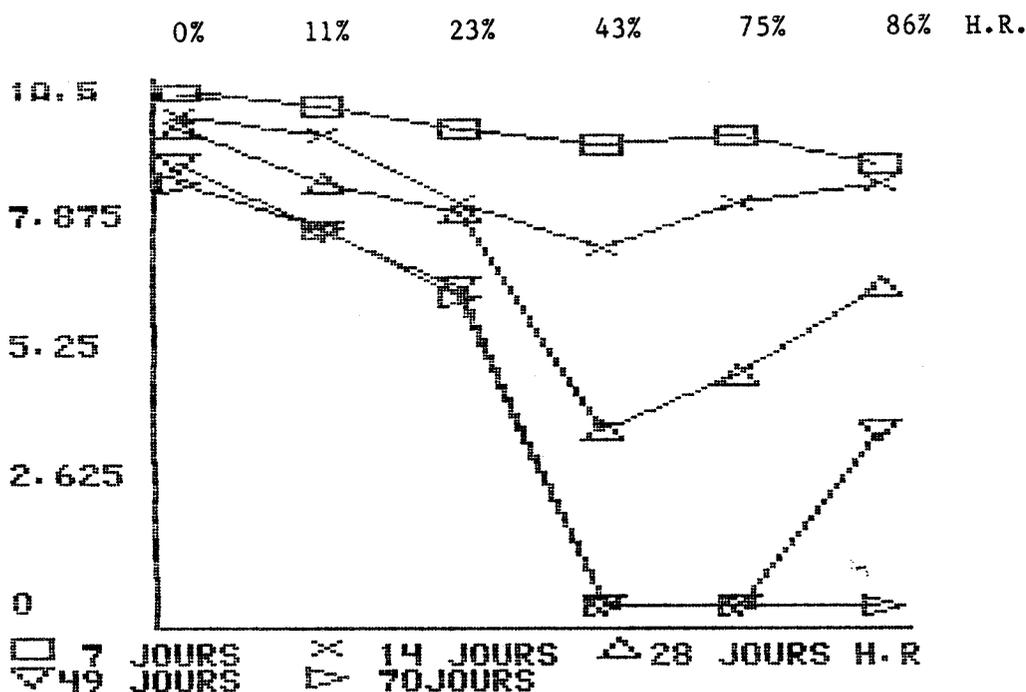
mise à l'équilibre sous vide et conservation sous azote

0,0	$Y = 12,8 * (X)^{-0,1488}$	0,927	24,5*	$b \pm 0,0836$	11
0,11	$Y = 12,2 * (X)^{-0,1148}$	0,968	59,10**	$b \pm 0,0413$	14
0,23	$Y = 10,6 * (0,9894)^X$	0,977	85,07**	$b \pm 0,0033$	15
0,43	$Y = 10,1 * (0,9642)^X$	0,979	91,9**	$b \pm 0,0105$	3
0,75	$Y = 10,8 * (0,9647)^X$	0,991	220,9***	$b \pm 0,0067$	5
0,86	$Y = 10,8 - 0,2315 * X$	0,983	118,2***	$b \pm 0,0683$	8
Témoin	$Y = 11,8 * (0,9695)^X$	0,955	41,5**	$b \pm 0,0133$	9



Figure 23

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.



Mise à l'équilibre sous azote

Mise à l'équilibre sous vide

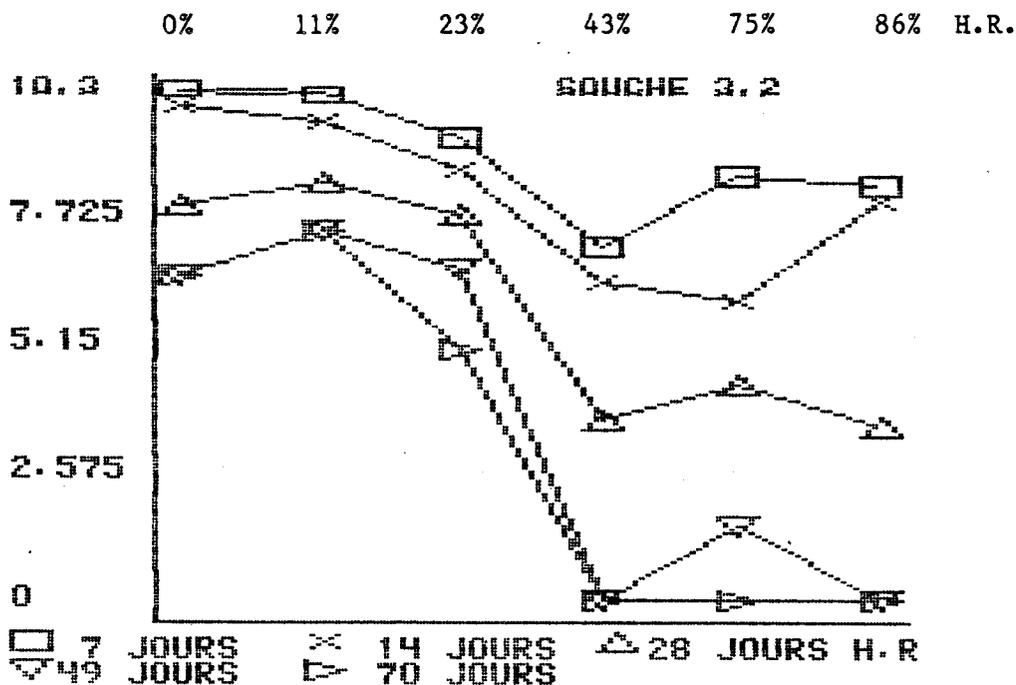
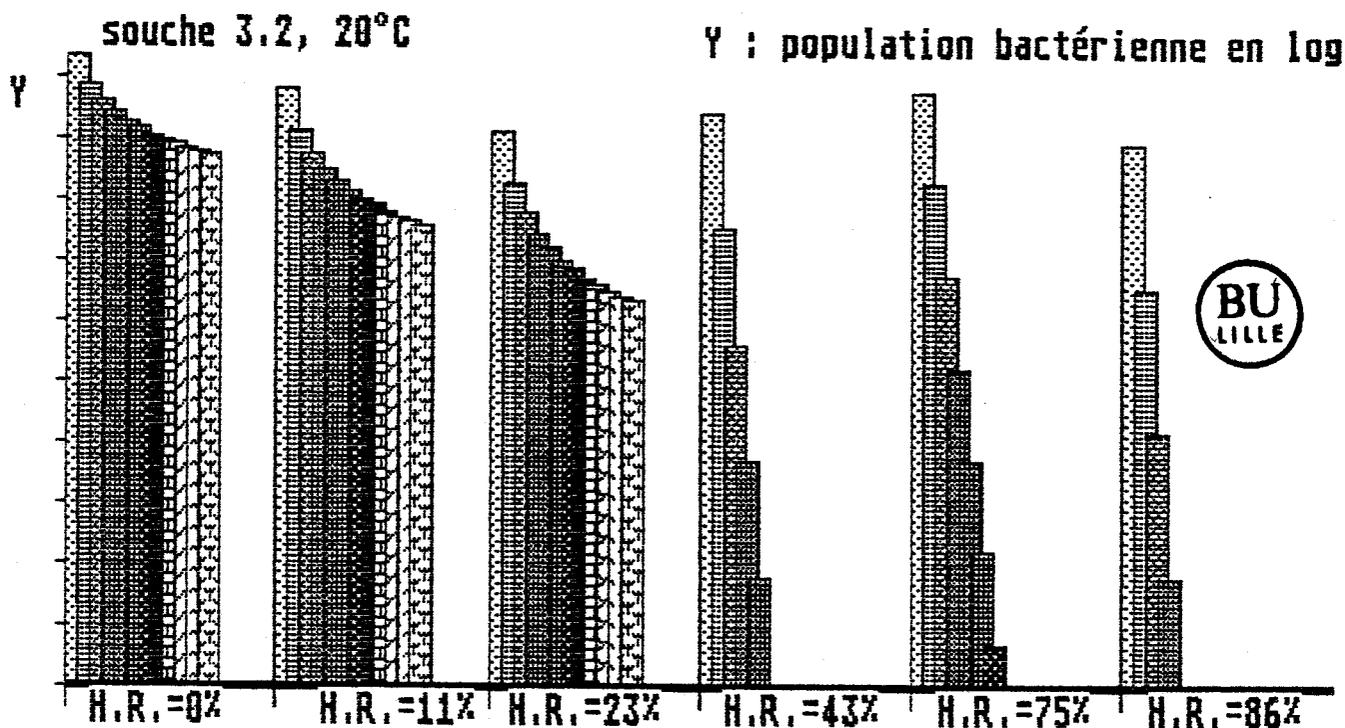


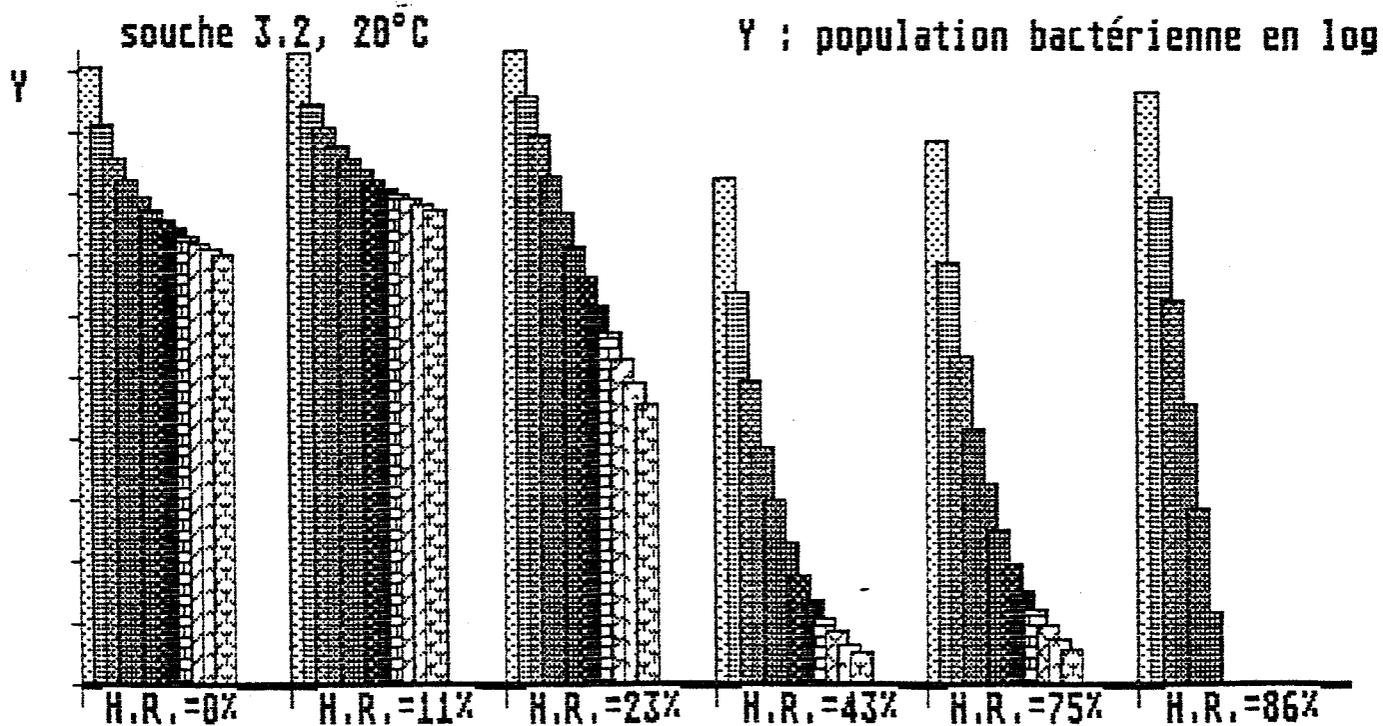
Figure 24

Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 20°C.

Mise à l'équilibre sous azote



Mise à l'équilibre sous vide



Les valeurs des numérations bactériennes apparaissent dans les figures 23. Les modèles de régression les mieux adaptés à l'observation ont été recherchés. Ils sont de type allométrique pour les faibles a_w , exponentiel ou linéaire pour les a_w élevées et pour le témoin (Tableau XXXVI & Figure 24).

Les régressions relatives **aux faibles a_w** qui sont les plus favorables à la conservation, ont été comparées entre elles:

- après mise à l'équilibre sous azote, l' a_w 0,0 permet une conservation meilleure que l' a_w 0,11 ($t_{obs.} = 4,006^{**}$), elle même supérieure à l' a_w 0,2 ($t_{obs.} = 3,145^*$), les coefficients de régression étant significativement différents.
- après mise à l'équilibre sous vide, les coefficients de régression estimés pour les a_w 0,0 et 0,11 sont égaux ($t_{obs.} = 1,602NS$), l' a_w 0,23 est plus défavorable à la conservation de l'inoculum (comparaison des a_w 0,11 et 0,23 : $t_{obs.} = 6,206^{***}$).
- La comparaison des deux modalités de conservation pour les très faibles a_w , donne les résultats suivants. A une a_w de 0,0, la mise à l'équilibre sous azote est plus favorable ($t_{obs.} = 4,067^{**}$) que la mise à l'équilibre sous vide, alors qu'à une a_w de 0,11, les différences entre les deux modalités de conservation n'existent pas ($t_{obs.} = 0,737NS$).

Les résultats aboutissent aux mêmes conclusions que dans le cas de la souche 3.32; une déshydratation poussée est nécessaire à une longue viabilité de l'inoculum, mais la rapidité de cette opération conditionne la survie des cellules de Bradyrhizobium japonicum, une mise à l'équilibre lente étant souhaitable.

Aux a_w élevées, l' a_w 0,75 permet une meilleure conservation que les a_w 0,43 et 0,86, valeur à laquelle se développent de très nombreux contaminants fongiques. La comparaison des résultats obtenus pour les trois valeurs d' a_w après mise à l'équilibre sous azote souligne des différences significatives (a_w 0,43 & 0,75 : $t_{obs.} = 4,517^{**}$; a_w 0,75 & 0,86 : $t_{obs.} = 6,253^{***}$).

Avec la souche 3.2, il est possible de maintenir la population de l'inoculum au dessus de 10^9 bactéries pendant un mois et demi pour une modalité de conservation. Il serait très intéressant d'améliorer la longévité de l'inoculum par stockage à des températures plus basses. Aussi la même expérimentation a été renouvelée en plaçant les échantillons à une température de 2°C.

1.2.2 / Etude de la viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 conservé à différentes humidités relatives à 2°C.

L'expérimentation réalisée à 2°C utilise un inoculum d'une concentration de $6,3 \cdot 10^{10}$ Bradyrhizobium japonicum par gramme ($Y = 10,8$).

Les modèles correspondant le mieux à l'observation sont de type exponentiel. Les coefficients de régression estimés sont hautement significatifs (Tableau XXXVII).

La comparaison des différents coefficients de régression permet de tirer les conclusions suivantes :

- Sous azote les a_w inférieures à 0,23 induisent des mortalités identiques : (comparaison des a_w 0,0 & 0,11 : $t_{obs.} = 2,138NS$; et des a_w 0,11 & 0,23 : $t_{obs.} = 0,0NS$). Pour ces valeurs d' a_w , la population bactérienne peut être maintenue au dessus de 10^9 bactéries / gramme pendant plus de trois mois.
- Après mise à l'équilibre sous vide, les a_w 0,11 et 0,23 sont équivalentes alors qu'il apparait des différences très significatives entre les a_w 0,0 et 0,11 ($t_{obs.} = 27,8***$). De la même manière les deux modalités de conservation sont différentes à a_w 0,0 ($t_{obs.} = 15,57***$). Il est encore montré qu'une déshydratation rapide et complète est néfaste à la survie de Bradyrhizobium japonicum.
- Les a_w élevées sont défavorables à la survie de la souche. Les tests soulignent des différences hautement significatives entre les conservations des cellules aux a_w 0,23 et 0,43 ; sous azote on obtient une valeur $t_{obs.} = 15,8***$. Toutefois à 2°C, la conservation à des humidités relatives supérieures à 0,23, permet un maintien d'une viabilité élevée (10^9 bactéries / gramme) pendant un peu plus d'un mois.

Tableau XXXVII

Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes humidités relatives de conservation, à 2°C. Population initiale Y = 10,8

a _w	équation de régression	coefficient de corrélation	résultat test de signification	intervalle de confiance de b; α=5%	nombre de jours où Y < 9
mise à l'équilibre et conservation sous azote					
0,0	Y = 10,5 * (0,99896) ^X	0,965	81,46***	b ± 0,00027	163
0,11	Y = 10,8 * (0,99876) ^X	0,983	176,87***	b ± 0,00022	146
0,23	Y = 10,8 * (0,99867) ^X	0,964	65,20***	b ± 0,00041	137
0,43	Y = 10,9 * (0,99444) ^X	0,988	212,5***	b ± 0,00100	35
0,75	Y = 10,7 * (0,99678) ^X	0,984	121,2***	b ± 0,00077	54
0,86	Y = 10,6 * (0,99481) ^X	0,983	114,83*	b ± 0,00123	32
Témoin	Y = 10,9 * (0,99736) ^X	0,987	224,9***	b ± 0,00046	75
mise à l'équilibre sous vide et conservation sous azote					
0,0	Y = 10,9 * (0,99763) ^X	0,998	1386,7***	b ± 0,00014	80
0,11	Y = 10,7 * (0,99928) ^X	0,977	126,1***	b ± 0,00014	240
0,23	Y = 10,8 * (0,99881) ^X	0,991	334,2***	b ± 0,00014	154
0,43	Y = 11,0 * (0,99442) ^X	0,989	223,0***	b ± 0,00098	35
0,75	Y = 10,5 * (0,99677) ^X	0,973	70,8**	b ± 0,00098	49
0,86	Y = 10,6 * (0,99495) ^X	0,980	95,1**	b ± 0,00123	32
Témoin	Y = 10,9 * (0,99664) ^X	0,998	1202,4***	b ± 0,00026	56

* test de Hartley d'égalité des variances.

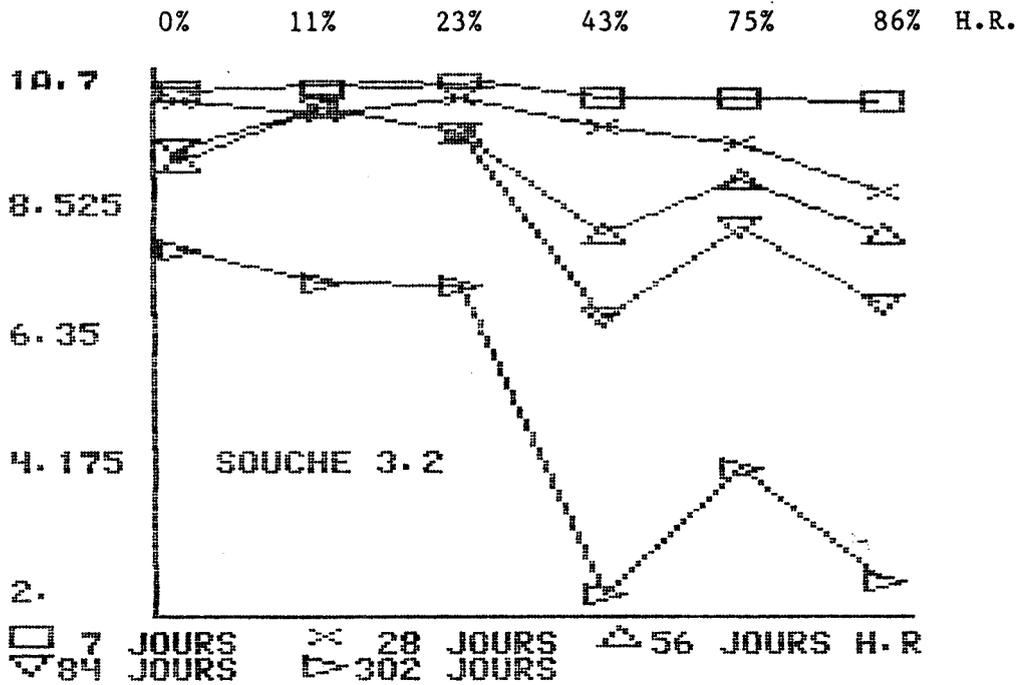
12 populations, 6 degrés de liberté.

$$\text{Hobs} = \frac{\text{SCE } y \cdot x \text{ max}}{\text{SCE } y \cdot x \text{ min}} = 7,13 ; H_{0,95} = 20,7$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

Figure 25

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 10,8$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 2°C.



Mise à l'équilibre sous azote

Mise à l'équilibre sous vide

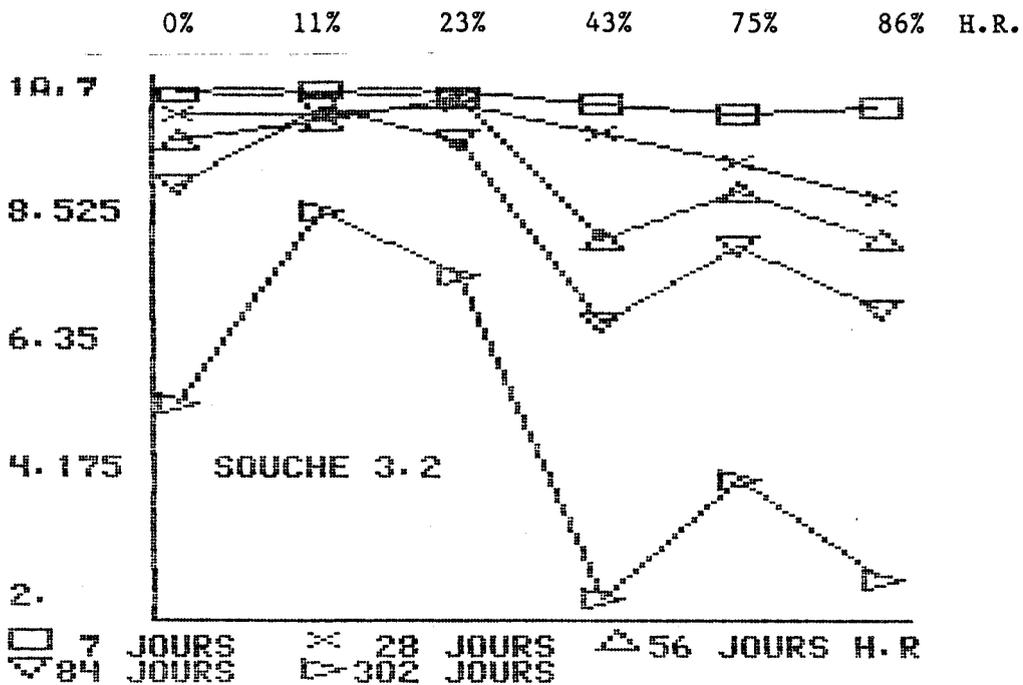
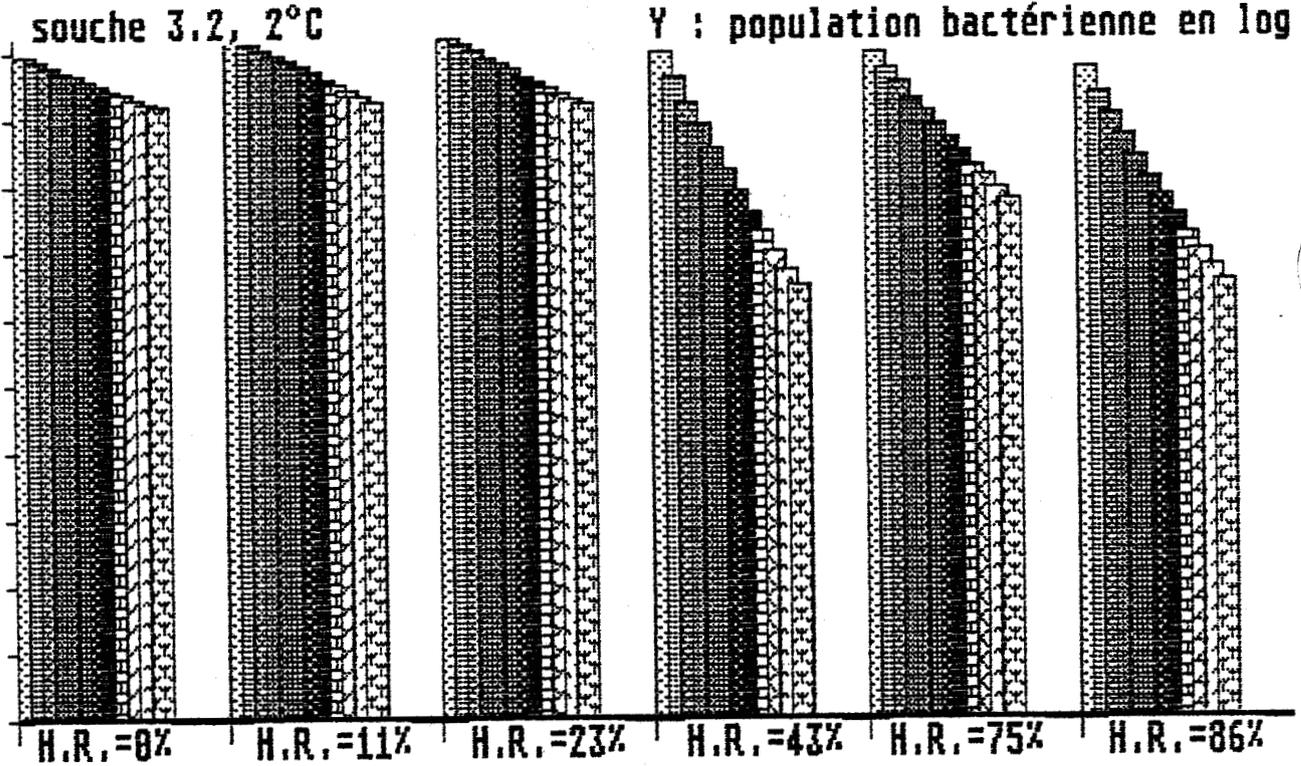


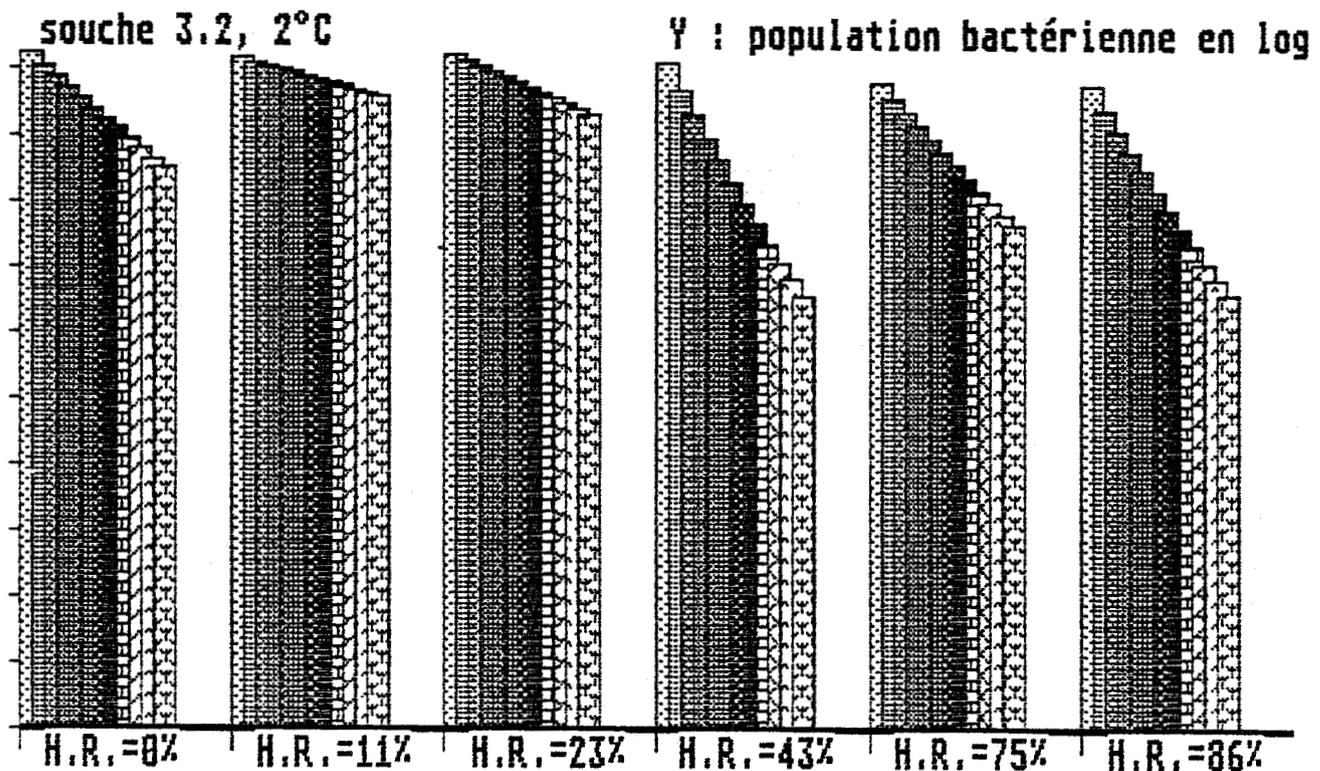
Figure 26

Modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 10,8$, pour différentes humidités relatives de conservation, à 2°C.

Mise à l'équilibre sous azote



Mise à l'équilibre sous vide



- Des trois valeurs d' a_w , la valeur de 0,75 est la plus favorable à la survie de la souche. Par exemple, la comparaison des coefficients de régression obtenus pour les différentes valeurs d' a_w après mise à l'équilibre sous azote donne les valeurs suivantes : $t_{obs.} = 3,971^{**}$ pour les a_w 0,43 & 0,75 ; $t_{obs.} = 3,498^{**}$ pour les a_w 0,75 & 0,86. D'autre part, il n'y a pas d'incidence de la modalité de mise à l'équilibre sur la conservation des cellules pour cette gamme d'humidités relatives.

En conclusion, ces travaux ont montré qu'une déshydratation poussée est nécessaire à une longue viabilité de l'inoculum, mais la rapidité de cette opération conditionne la survie des cellules de Bradyrhizobium japonicum, une mise à l'équilibre lente étant souhaitable. On note cependant un comportement différent des deux souches au regard des faibles a_w ; la souche 3.32 survit mieux à une a_w de 0,11, alors que la souche 3.2 a une mortalité plus faible à une a_w de 0,03. La souche 3.32 est plus sensible que la souche 3.2 à un état de déshydratation extrême.

1.3 / Discussion.

L'observation des courbes de conservation Y en fonction de l' a_w (Figures 19 à 26) montre des courbes décroissantes dans une première phase jusqu'à l' a_w 0,43. L' a_w 0,75 permet en général une longévité supérieure à l' a_w 0,43, alors qu'à une a_w de 0,86, la longévité de l'inoculum est plus aléatoire.

La concentration bactérienne Y exprimée en logarithme n'est donc pas une fonction décroissante monotone de l' a_w . Ces changements en apparence anormaux de la survie des cellules, peuvent souvent être expliqués par les propriétés particulières de l'eau et l'état de l'eau dans le produit.

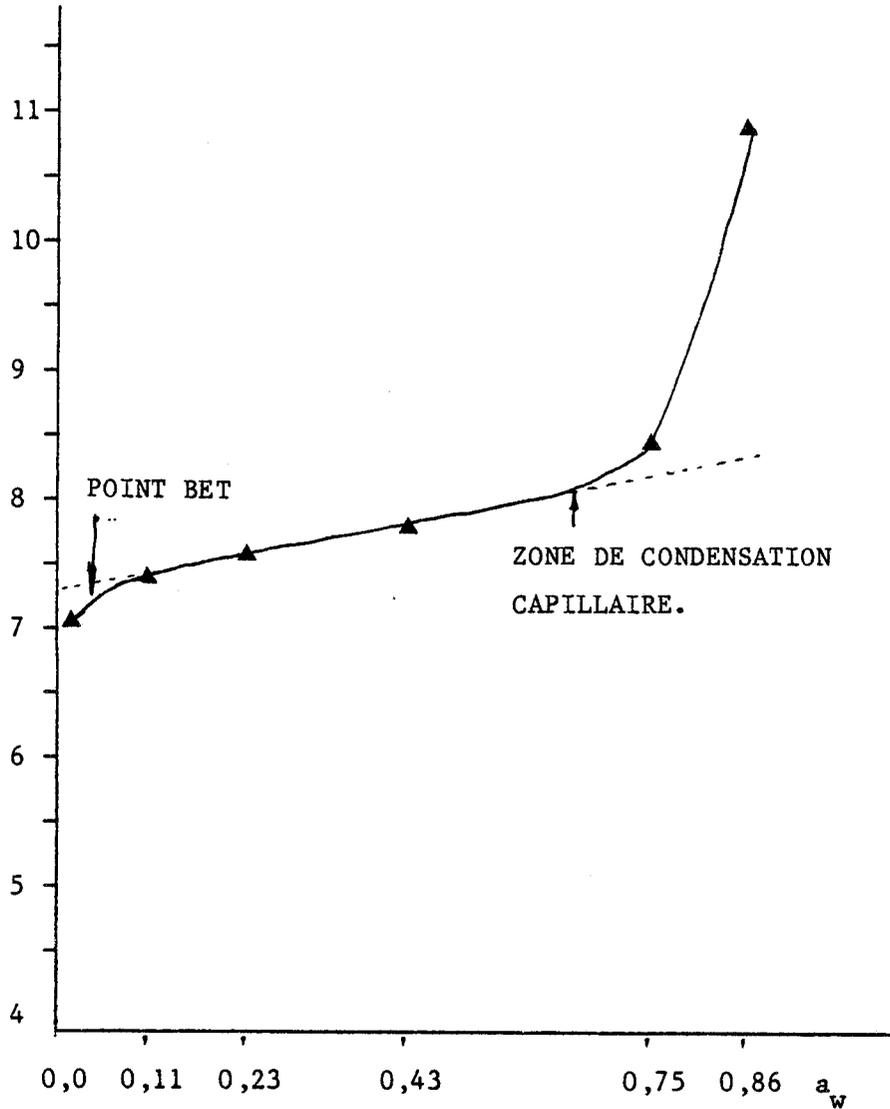
Une des techniques qui permet de mettre en évidence l'état de l'eau dans un produit, consiste à établir ses isothermes de sorption. Les produits alimentaires ont en général des courbes sigmoïdes (Figure 27) qui possèdent deux points d'inflexion (13, 15, 31, 166, 184).

- le premier point d'inflexion : point BET d'après la théorie de Brunauer (23).

Figure 27

Isotherme d'adsorption d'un inoculum déshydraté à base de lait écrémé additionné de saccharose.

quantité d'eau
dans l'inoculum
(g d'eau/100g d'inoculum)



- le deuxième point d'inflexion : zone de "condensation capillaire".

D'après la théorie de Brunauer, Emmet & Teller (23) rapportée par Bouldoires (15), elles s'interprètent de la façon suivante :

- en deçà du point BET, l'eau contenue dans les échantillons est de l'eau fortement liée par liaisons hydrogène avec des groupes polaires spécifiques (-OH ; -NH₂ ; -CO) ou des liaisons peptidiques, et assurant entre autre, la conformation des macromolécules organiques (protéines, phospholipides, ...).

- Le premier changement de pente au point BET correspond à une couverture monomoléculaire d'eau, tous les sites polaires hydrophiles formant des liaisons hydrogène avec l'eau.

- entre les deux points d'inflexion, la courbe est linéaire ; une partie de l'eau est faiblement liée. Pauling émet l'hypothèse d'un empilement successif de molécules d'eau sur cette première couche (15, 142). L'eau interagit avec le produit principalement par des forces électrostatiques (groupements ioniques type -COO⁻ et -NH₃⁺ ; groupements polaires type -SH).

- le second changement de pente, correspond à la zone dite de "condensation capillaire" où apparaît l'eau congelable, libre d'interactions avec le substrat. Seule l'eau libre est utilisable par les microorganismes, et mobilisable pour la solvatisation des ions.

Les travaux réalisés en levurerie industrielle sur les applications de la RMN aux études de déshydratation de la levure (130) montrent un équilibre entre les trois états. Aux faibles teneurs en eau, l'élimination de l'eau faiblement liée induirait un passage d'une fraction de l'eau fortement liée à un état d'eau faiblement liée (19, 20, 130).

Les isothermes d'adsorption d'un inoculum de la souche 3.2 atomisée avec du lait additionné de saccharose montrent deux points d'inflexion le premier se situe à une valeur inférieure à 0,11, le deuxième entre 0,43 et 0,75.

Les données théoriques et expérimentales concernant l'état de l'eau et les réactions connues responsables de la dégradation des produits alimentaires déshydratés, nous amènent à formuler les hypothèses suivantes quant aux relations qui pourraient exister entre les courbes de survie obtenues avec Bradyrhizobium japonicum et les différentes valeurs d' a_w :

- En dessous du point BET, il y aurait passage d'une partie de l'eau de constitution à un état faiblement lié, ce qui causerait des dommages sévères sur une fraction des cellules, dommages d'autant plus sévères que la vitesse de déshydratation est élevée (27, 118). Ceci pourrait expliquer la viabilité moindre des inoculums, observée après déshydratation rapide sous a_w 0,0.
- Le point BET situé entre les a_w 0,0 et 0,11 correspondrait à l'état de déshydratation optimal garantissant l'intégrité fonctionnelle des cellules sans qu'il y ait une quantité d'eau suffisante pour permettre le fonctionnement enzymatique. Cette valeur d' a_w permettrait donc le taux de survie le plus élevé.
- Dans les produits alimentaires déshydratés certaines réactions se manifestent aux humidités relatives intermédiaires. L'eau faiblement liée lève l'inhibition de certains enzymes qui conduit à des altérations cellulaires (27, 87, 116, 187) , de même les réactions de Maillard sont possibles et aboutissent à une dégradation de l'A.D.N. ; des fréquences de mutation spontanées élevées ont été reportées (116, 186, 188). Entre les deux valeurs seuils de l' a_w , l'eau est très réactive, la mortalité est une fonction croissante de l' a_w . Elle serait la plus forte au deuxième point d'inflexion (situé entre 0,43 et 0,75) qui pourrait correspondre au point de mobilisation du saccharose (0,53), les produits cristallisés absorbant des quantités d'eau très importantes dès lors qu'ils commencent à se solubiliser.
- La présence d'eau libre congelable au delà du deuxième point d'inflexion, permettrait à certaines cellules de retrouver leur intégrité physique ce qui expliquerait, la longévité accrue, bien que relativement faible de l'inoculum. Aux a_w supérieures à 0,86, la conservation devient mauvaise, car à ce faible niveau de

déshydratation, de très nombreux contaminants fongiques se développent.

Nos résultats ainsi que ceux antérieurs de Mary concernant la déshydratation de cellules libres de Rhizobium meliloti (116, 118) cadrent assez bien avec cette hypothèse. En effet, il observe un effet néfaste des déshydratations rapides, l'exposition des cellules à a_w 0,0 aboutissant à une mauvaise conservation de Rhizobium. Les a_w 0,23 et 0,43 permettent de maintenir les cellules en vie plus longtemps, alors que l' a_w 0,66 voit un déclin très rapide de la viabilité cellulaire et une forte augmentation de fréquence d'apparition de mutants spontanés. Lors d'une étude sur le statut de l'eau dans les cellules de Rhizobium, Bushby & Marshall (27) montrent que la zone de "condensation capillaire" se situe entre les valeurs d' a_w 0,6 et 0,7 pour des cellules de Rhizobium déshydratées sans support. Dans ce cas, l' a_w 0,66 pourrait être proche de la valeur correspondant à la zone de condensation capillaire. Les a_w supérieures permettent des taux de survie plus élevés.

Il serait très intéressant de pouvoir mettre en évidence l'état de l'eau dans les inoculums secs ainsi que dans les cellules déshydratés sans aucun support par des techniques de RMN et de deutériation de l'eau (15, 19, 20, 27), afin d'étayer ou d'infirmer cette hypothèse. De même l'étude des fractions membranaires suggérée en §A.II.3 devrait éventuellement permettre de mettre en évidence le rôle protecteur du saccharose et de déterminer le soluté le plus compatible avec le maintien de l'intégrité cellulaire.

2 / COMPARAISON DE LA VIABILITE D'UN INOCULUM DE LA SOUCHE 3.2 A FAIBLE A_w ET DIFFERENTES TEMPERATURES DE CONSERVATION.

L'inoculum utilisé dans l'étude précédente d'une concentration bactérienne de 5.10^{11} bactéries / gramme a servi dans cette expérimentation. L'effet de trois températures de conservation (-20°C , 2°C et 20°C), sur la survie de Bradyrhizobium japonicum a été étudié. Les échantillons sont conditionnés sous azote à a_w 0,0 et 0,11.

Les modèles obtenus sont de type exponentiel, et les coefficients de régression estimés hautement significatifs. La comparaison des coefficients de régression donne les résultats suivants (Tableau XXXVIII & Figure 28) :

- A a_w 0,0 comme à a_w 0,1, la longévité de l'inoculum est supérieure à -20°C qu'à 2°C , elle-même supérieure à celle observée à 20°C .
- La température de conservation détermine pour une large part la longévité de l'inoculum. Ainsi l'estimation de la période (nombre de jours) pendant laquelle il est possible de maintenir une population $Y > 9$ varie respectivement pour les a_w 0,0 & 0,11, et pour chaque température de 386 et 508 jours à -20°C , 146 et 240 jours à 2°C , 61 et 52 jours à 20°C . Ces observations rejoignent les conclusions des études menées sur l'incidence des températures sur la survie de Rhizobium dans divers inoculats (1, 102, 125, 165).

Ces études ont permis de mettre en évidence, les paramètres dont l'influence est déterminante sur la longévité de l'inoculum.

- De même que les souches ont des taux de survie très différents lors de la déshydratation, les souches n'ont pas la même aptitude à survivre dans un état déshydraté. La souche 3.32 présente une mortalité beaucoup plus forte que la souche 3.2 pour des modalités de conservation identiques. Elle est en outre, beaucoup plus sensible à la présence d'oxygène.

- Les faibles humidités relatives de conservation sont nécessaires. Il serait en outre souhaitable de conserver les inoculums à basse température, et dans des emballages hermétiques qui permettraient un stockage des cellules à l'abri de l'oxygène et de l'humidité.

3 / INFLUENCE DU SUPPORT ET DE L'ADDITION DE SOLUTES, SUR LA CONSERVATION D'INOCULUMS DE LA SOUCHE 3.2, A 2°C ET HUMIDITE RELATIVE PROCHE DE 0.

Afin d'individualiser, l'influence du support sur la conservation des cellules déshydratées, les paramètres de conservation sont identiques pour tous les inoculats :

- température : 2°C

Tableau XXXVIII

Etude et modélisation de la perte de viabilité d'un inoculum de la souche 3.2 à différentes températures de conservation et faible humidité relative. Population initiale $Y = 10,8$.

a_w tempé- rature	équation de régression	coefficient de corrélation	résultat test signification	intervalle de confiance de b; $\alpha=5\%$	nombre de jours où $Y < 9$
0,0 -20°C	$Y = 10,7 * (0,99956)^X$	0,977	128,6***	$b \pm 0,00004$	386
0,0 + 2°C	$Y = 10,5 * (0,99896)^X$	0,983	81,46***	$b \pm 0,00009$	146
0,0 +20°C	$Y = 10,7 * (0,99676)^X$	0,997	1210,1***	$b \pm 0,00009$	52
0,11 -20°C	$Y = 10,7 * (0,99965)^X$	0,987	234,3***	$b \pm 0,00002$	508
0,11 + 2°C	$Y = 10,7 * (0,99928)^X$	0,977	176,9***	$b \pm 0,00006$	240
0,11 +20°C	$Y = 10,6 * (0,99692)^X$	0,995	598,85*	$b \pm 0,00012$	61

* test de Hartley d'égalité des variances.

6 populations, 6 degrés de liberté.

$$H_{obs} = \frac{SCE_{y.x \max}}{SCE_{y.x \min}} = 9,4 ; H_{0,95} = 13,7$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

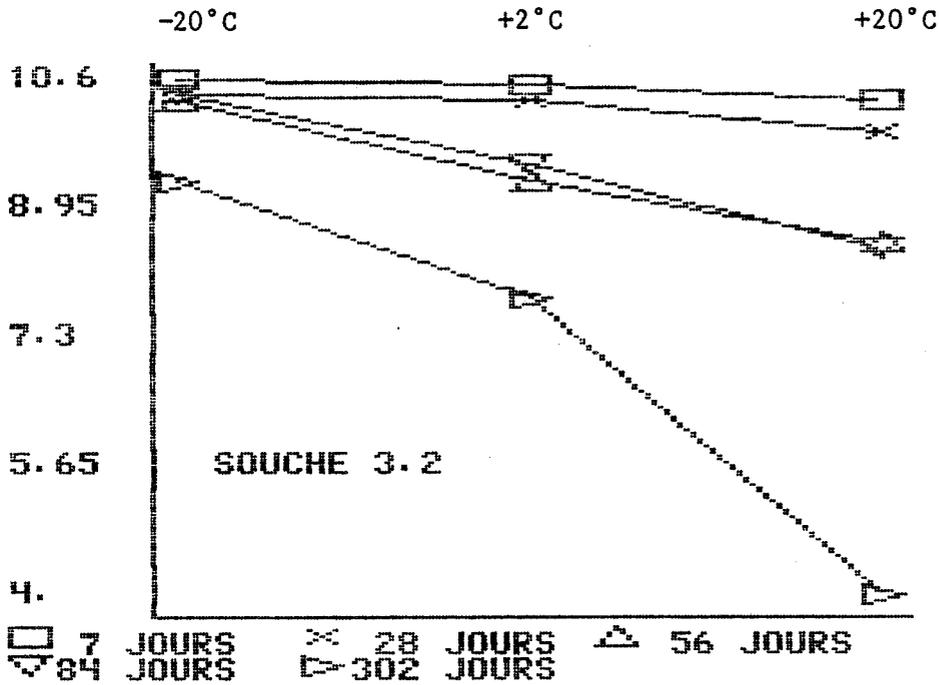
* Comparaisons des coefficients de régression par le test t de Student.

a_w 0,0 ; -20°C & a_w 0,0 ; +2°C	$t_{obs.} = 7,538***$
a_w 0,0 ; +2°C & a_w 0,0 ; +20°C	$t_{obs.} = 22,853***$
a_w 0,11; -20°C & a_w 0,11; +2°C	$t_{obs.} = 14,208***$
a_w 0,11; +2°C & a_w 0,11; +20°C	$t_{obs.} = 17,859***$

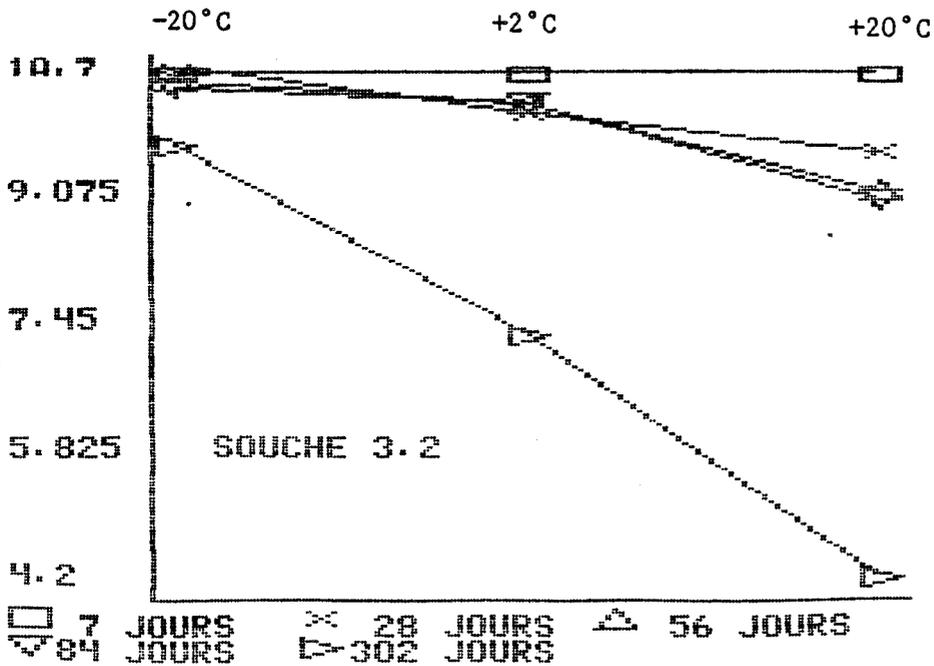
Figure 28

Etude de la survie d'un inoculum de la souche 3.2 de concentration initiale $Y = 11,7$, à faible humidité relative pour différentes températures de conservation.

* conservation à une a_w égale à 0,03



* conservation à une a_w égale à 0,11



- conservation sous azote
- humidité relative proche de 0 obtenue par addition de silicagel dans l'enceinte de conservation de l'inoculum.

La maltodextrine et le lait écrémé sont utilisés comme supports d'atomisation à une concentration de 10%; ils sont employés soit seuls, soit additionnés de maltose ou de saccharose à 2%.

3.1 / Résultats.

Les courbes de survie représentant les résultats des numérations sont regroupées dans la figure 29. Les modèles de régression sont de type exponentiel (Tableau XXXIX, figure 30). La comparaison des coefficients de régression par l'analyse de la variance et la recherche de la plus petite amplitude significative par la méthode de Newman et Keuls (37, 129) permettent d'établir les conclusions suivantes.

La présence de saccharose ou de maltose qui influence fortement le taux de survie au moment de la déshydratation, conditionne également la conservation des cellules déshydratées, les coefficients de régression étant significativement différents. On observe ainsi, que le saccharose et dans une moindre mesure le maltose, favorisent la conservation des cellules déshydratées en présence de lait, alors qu'ils défavorisent à l'inverse celle des cellules déshydratées avec la maltodextrine.

L'interprétation de ces résultats paradoxaux est délicate. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la quantité totale d'eau retenue dans les échantillons, déterminée par étuvage (à 110°C, 24 heures) et la survie de Bradyrhizobium japonicum puisque pour les deux supports étudiés, l'addition de saccharose et à un moindre degré de maltose augmente la teneur en eau résiduelle des échantillons (Voir figure 31). Mügnier et Jung (124) suggèrent un rôle déterminant du nombre de carbones, du groupe fonctionnel et du point de mobilisation de la molécule. Cependant, les numérations de cellules viables réalisées sur les inoculums montrent que l'influence des solutés sur la survie est inversée suivant qu'ils sont ajoutés au lait ou à la maltodextrine. Ces observations nous amènent à rechercher d'autres hypothèses susceptibles

Tableau XXXIX

Modélisation des courbes de survie de Bradyrhizobium japonicum dans des inoculums additionnés de deux sucres différents.

N° Ech.	équation de régression estimée	coefficient de corrélation	résultat du test de signification	intervalle de confiance de b; α=5%
1	$Y = 7,9 * (0,99799)^X$	0,970	80,61***	$b \pm 0,00057$
2	$Y = 9,6 * (0,99895)^X$	0,959	57,16**	$b \pm 0,00035$
3	$Y = 10,1 * (0,99974)^X$	0,826	10,76*	$b \pm 0,00020$
4	$Y = 10,1 * (0,90757)^X$	0,993	334,40***	$b \pm 0,00034$
5	$Y = 9,3 * (0,99644)^X$	0,996	688,65***	$b \pm 0,00035$
6	$Y = 7,7 * (0,99601)^X$	0,989	228,25***	$b \pm 0,00068$



Les numéros des échantillons correspondent aux supports suivants :

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 1.....lait écrémé | 4.....maltodextrine |
| 2.....lait écrémé + maltose | 5.....maltodextrine + maltose |
| 3.....lait écrémé + saccharose | 6.....maltodextrine + saccharose |

* Comparaison des coefficients de régression par l'analyse de la variance : test de parallélisme.

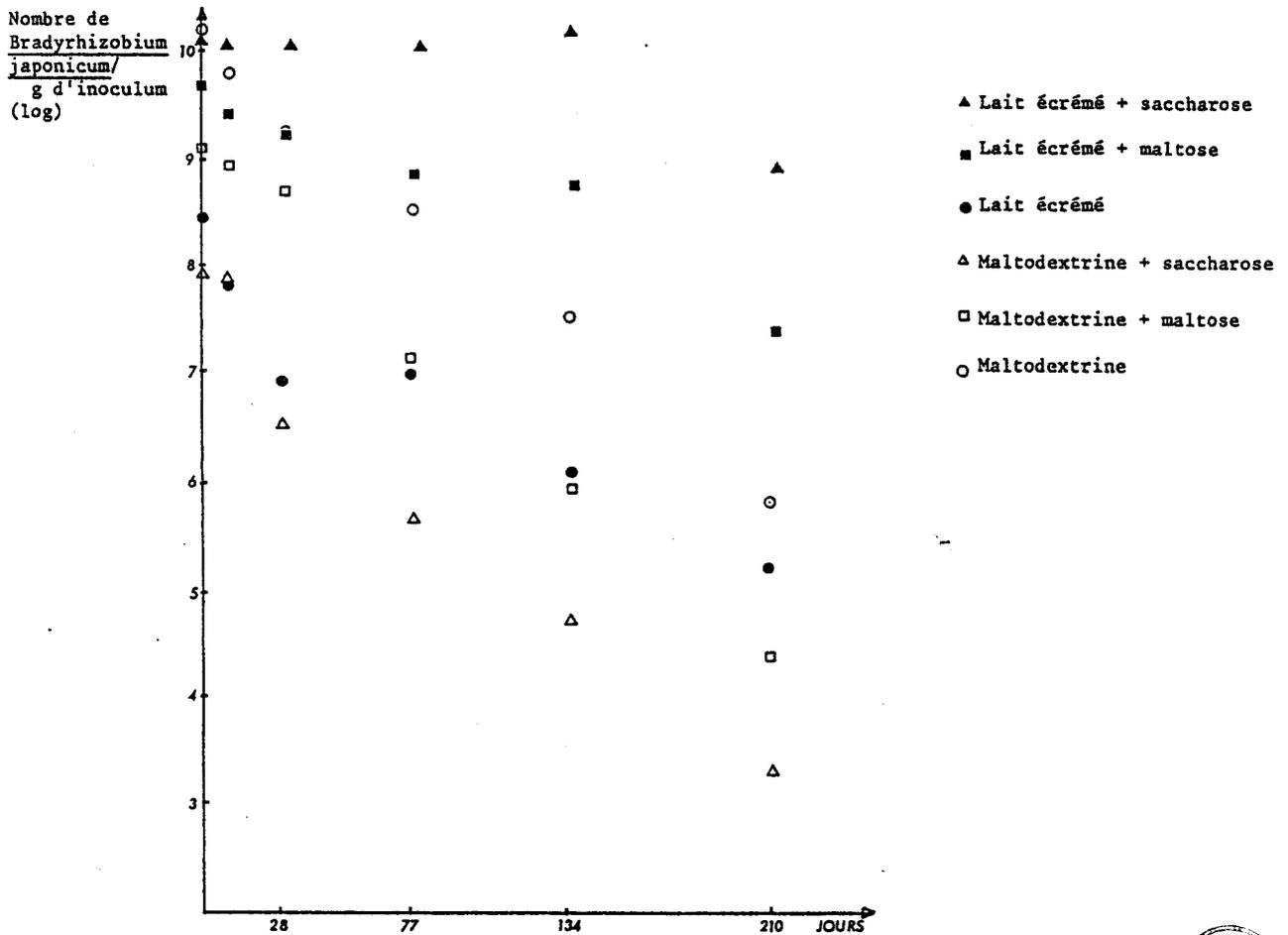
source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
régression linéaire moyenne	1	0,19322	0,19322	
non parallélisme	5	0,26063	0,05213	263,2***
écarts par rapport aux régressions	30	0,00593	0,00020	
TOTAUX	36	0,26656		

Le test de non parallélisme des droites de régression donne une valeur F hautement significative, ce qui signifie que les coefficients de régression estimés ne sont pas identiques.

Figures 29 et 30

Etude de la survie de la souche 3.2 à faible humidité relative et 2°C dans des inoculum à base de maltodextrine ou de lait écrémé, additionnés ou non de saccharose ou de maltose.

* Résultats des numérations



* Modélisation des courbes de survie.



lait
 MDO + maltose
 lait + maltose
 MDO + saccharose
 lait + saccharose
 MDO

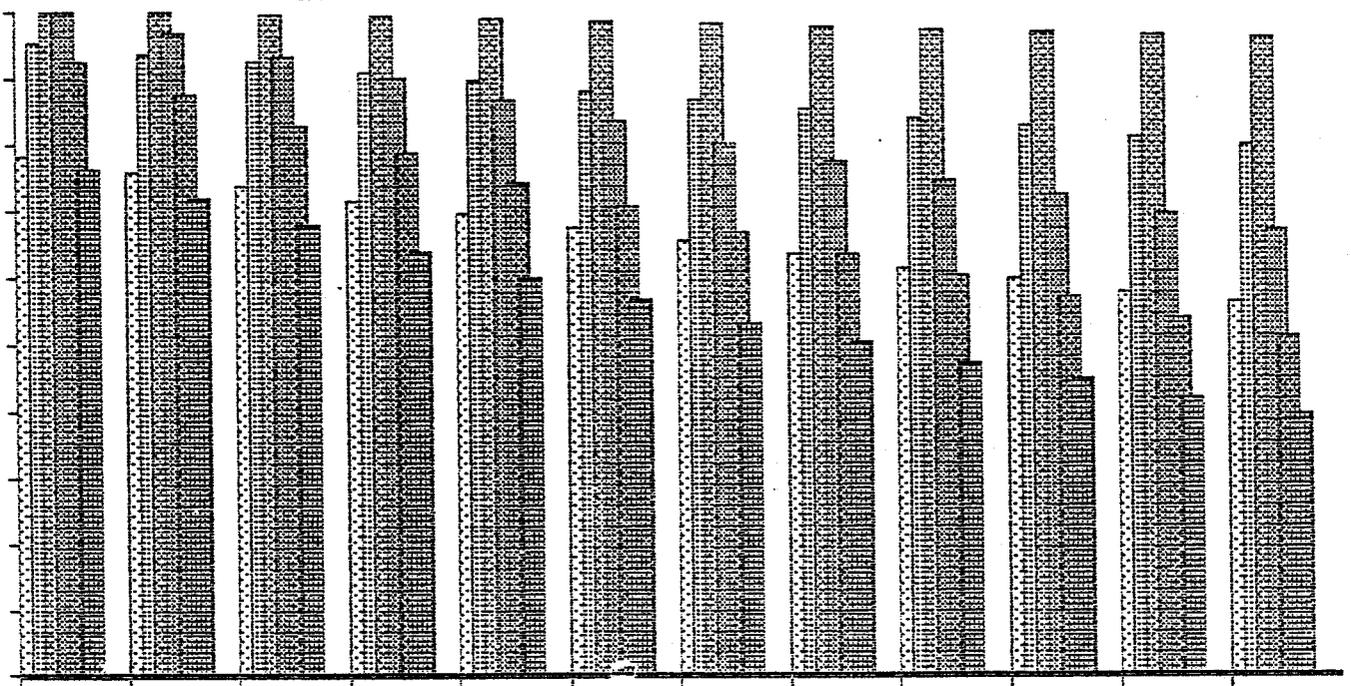


Tableau XL

Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des inoculums additionnés de deux sucres différents.

* Calcul de la plus petite amplitude significative.

La plus petite amplitude significative est, pour un niveau de signification α , un nombre de moyennes donné, un nombre de degrés de liberté donné (relatif au carré moyen résiduel) et un nombre n d'observations intervenant dans chaque moyenne : $q_{1-\alpha} \cdot \sqrt{CMr/n}$

soit pour $\alpha = 1\%$ et pour

2 populations.....	0,0207
3 populations.....	0,0237
4 populations.....	0,0255
5 populations.....	0,0269
6 populations.....	0,0279

* Comparaison des régressions



nb populations comparées.	comparaison	résultat
6	$\bar{Y}'_6 + 0,0279 = 0,7876 < \bar{Y}'_1$	$\bar{Y}'_6 < \bar{Y}'_1$
5	$\bar{Y}'_1 + 0,0269 = 0,8619 < \bar{Y}'_4$	$\bar{Y}'_1 < \bar{Y}'_4$
2	$\bar{Y}'_1 + 0,0207 = 0,8557 > \bar{Y}'_5$	$\bar{Y}'_1 = \bar{Y}'_5$
4	$\bar{Y}'_5 + 0,0255 = 0,8804 < \bar{Y}'_4$	$\bar{Y}'_5 < \bar{Y}'_4$
3	$\bar{Y}'_4 + 0,0237 = 0,9480 < \bar{Y}'_3$	$\bar{Y}'_4 < \bar{Y}'_3$
2	$\bar{Y}'_4 + 0,0207 = 0,9450 < \bar{Y}'_2$	$\bar{Y}'_4 < \bar{Y}'_2$
2	$\bar{Y}'_2 + 0,0207 = 0,9681 < \bar{Y}'_3$	$\bar{Y}'_2 < \bar{Y}'_3$

Les moyennes \bar{Y}'_i sont respectivement $\sum (\log Y_i) / n$
 La comparaison des moyennes commence par la valeur la plus faible.

\bar{Y}'_6	\bar{Y}'_1	\bar{Y}'_5	\bar{Y}'_4	\bar{Y}'_2	\bar{Y}'_3
0,7597	<u>0,8350</u>	<u>0,8549</u>	0,9243	0,9474	0,9952

Par la comparaison des moyennes au moyen de la méthode de Newman et Keuls (37, 94, 129), seules les courbes de survie relatives au lait et à la maltodextrine additionnée de maltose sont identiques sur la période considérée.

d'expliquer l'incidence des solutés sur la survie des inoculums à très faible humidité relative.

Une explication probable de ces phénomènes peut venir de l'analyse des courbes d'adsorption des inoculats et des propriétés de l'eau dans les échantillons déshydratés (Figure 31) :

La réalisation des isothermes d'adsorption, a permis de déterminer les teneurs en eau obtenues à une a_w de 0,03, correspondant à l'état d'hydratation des inoculums tels qu'ils ont été conservés. Les échantillons se situent à un état de déshydratation situé en dessous du point BET, puisque le point d'inflexion se situe entre l' a_w de l'enceinte et la valeur 0,11.

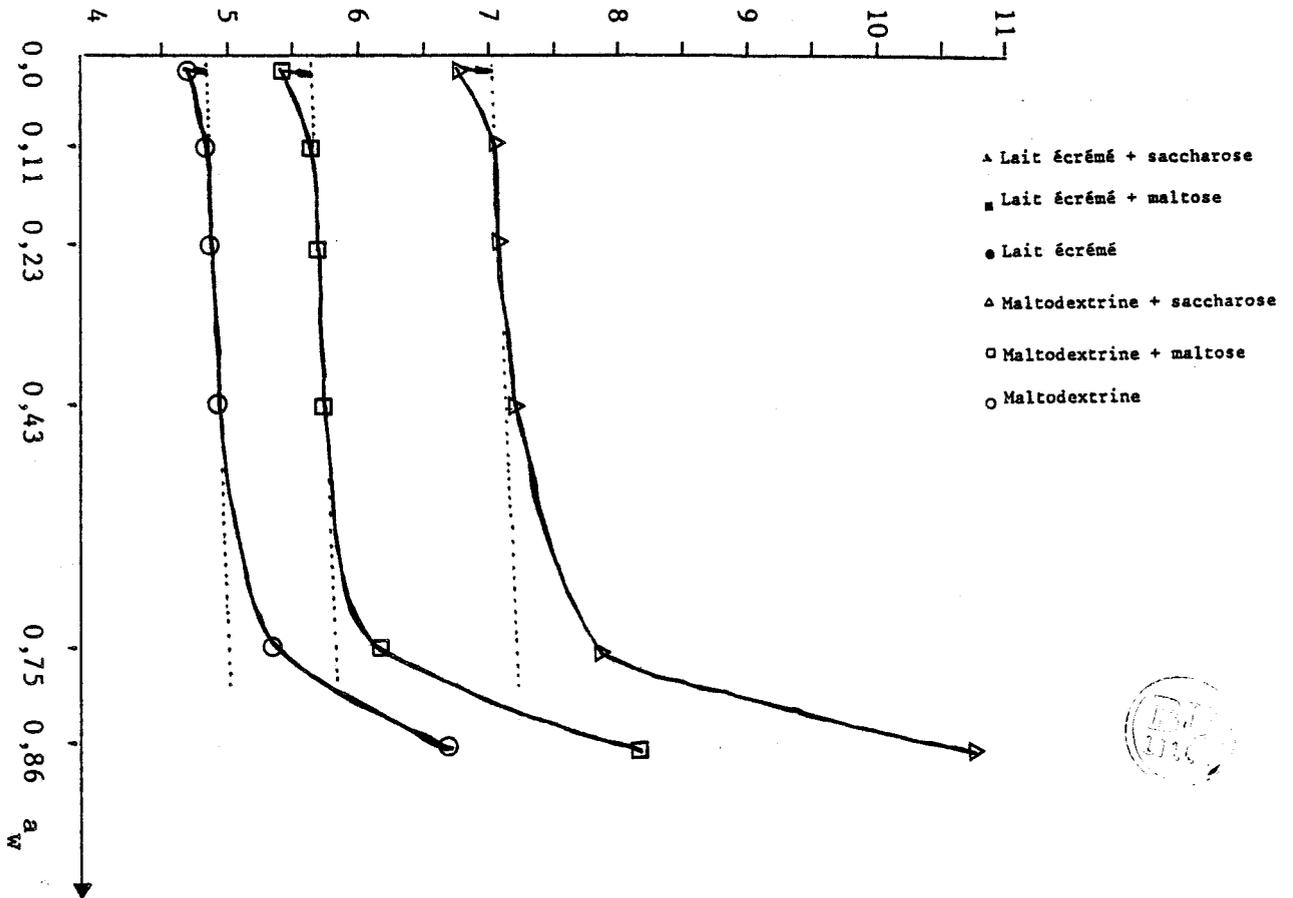
La même hypothèse que précédemment sera admise et notamment qu'à un niveau de déshydratation élevé, situé en dessous du point BET, il y a passage d'une fraction de l'eau fortement liée à un état faiblement lié. Les isothermes d'adsorption entre les deux points d'inflexion sont à peu près linéaires. Si, en prolongeant cette portion de droite, qui correspond à l'adsorption d'eau faiblement liée, jusqu'à la valeur d' a_w 0, une quantité d'eau importante par rapport au point théorique de cette droite est perdue dans nos conditions de conservation, on admettra qu'une quantité voisine d'eau fortement liée est éliminée du produit. Dans le cas de matériel vivant, à une perte d'eau de constitution élevée, correspondent des altérations cellulaires importantes entraînant éventuellement la mort des cellules.

Avec la maltodextrine, les quantités d'eau éliminées par rapport à ce point théorique ainsi défini, sont dans un ordre croissant obtenues pour la maltodextrine seule, la maltodextrine + maltose, la maltodextrine + saccharose; Dans le cas du lait écrémé, elles sont obtenues avec le lait + saccharose, le lait + maltose et le lait. Dans le cadre de notre étude, cette hypothèse, pourrait expliquer valablement l'incidence de telles substances sur la survie de Bradyrhizobium japonicum. Cette hypothèse n'exclut pas le rôle de la nature des groupes fonctionnels et de la structure de ces oses (34, 124), car ces paramètres sont déterminants des propriétés thermodynamiques du produit.

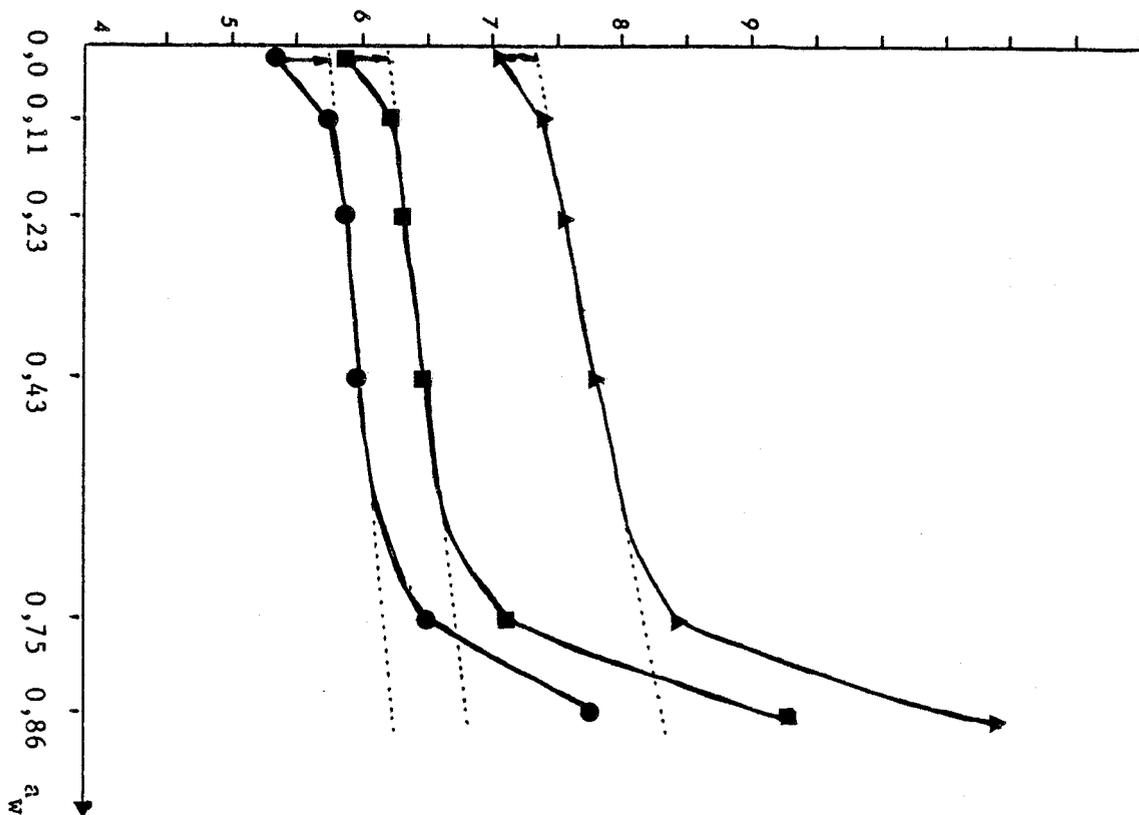
Figure 31

Isothermes d'adsorption des inoculats à base de maltodextrine et de lait ; Q : quantité d'eau retenue dans les inoculats (g d'eau/100g d'inoculum).

* isothermes d'adsorption des inoculats à base de maltodextrine.



* isothermes d'adsorption des inoculats à base de lait.



Des études physiques de RMN et l'emploi d'eau deutériée pour mettre en évidence les passages d'eau d'un état à l'autre seraient intéressantes à mener pour confirmer ou non la relation entre survie et caractéristiques thermodynamiques du produit.

CONCLUSION.

L'étude des paramètres de déshydratation nous a permis de mettre en évidence une sensibilité variable des souches, ainsi que l'influence déterminante de l'âge physiologique des cellules sur le taux de survie lors de la dessiccation. La synthèse en quantités importantes d'exopolysaccharides bactériens n'est par contre pas responsable de la tolérance élevée des cellules en fin de phase exponentielle. Dans les conditions optimales, il est possible d'obtenir des poudres déshydratées contenant plus de 10^{11} bactéries par gramme.

Les facteurs aboutissant à la détérioration de l'inoculum en conservation sont nombreux. La survie des cellules est altérée par la présence d'oxygène, et par des modifications de l'environnement physique (température et humidité relative). La conservation à basse température est à préférer, les températures élevées accélérant le processus de détérioration de l'inoculum. L'influence de l'humidité relative sur la conservation des cellules déshydratées est déterminante mais les relations entre cette dernière et la survie des cellules est complexe. L' a_w imposée par l'enceinte interviendrait principalement en modifiant la disponibilité de l'eau dans l'inoculum. Une déshydratation extrême est favorable à la survie de Bradyrhizobium japonicum bien qu'une mise à l'équilibre rapide soit nocive. Par contre, l'eau faiblement liée est très réactive et une augmentation de l' a_w au delà de 0,11 provoque une mortalité croissante. Les valeurs d' a_w supérieures à 0,75 où l'eau libre est présente sont en général plus favorables qu'une valeur de 0,43. La protection des Rhizobiums par différentes substances serait liée aux interactions support-cellules dépendant de la nature du produit et aux modifications de la disponibilité de l'eau au voisinage des cellules imposées par leur présence. Dans nos expérimentations, les inoculums à base de lait écrémé additionné de saccharose permettent la survie la plus importante, et pour une conservation à 2°C et à une humidité relative inférieure à 23% la population excède 10^9 bactéries pendant plus de 4 mois en moyenne pour la souche 3.2.

3ème PARTIE

ESSAIS DE BACTERISATION

PAR

ENROBAGE DE GRAINES

Cette partie du travail a pour but de procéder à une préinoculation des semences de soja par bactérisation et enrobage des graines.

Les expérimentations visent donc à sélectionner et étudier :

- un ou plusieurs agents adhésifs favorisant la survie de la bactérie sur la graine.
- les paramètres de conservation permettant une survie optimale.
- les modalités de bactérisation : l'influence de l'inoculum employé lors de l'application des Rhizobiums est étudiée (tourbe, concentré cellulaire).

I / "SCREENING" DES AGENTS COLLANTS.

1 / PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Des produits de différentes natures ont été utilisés :

- eau (témoin)
- saccharose
- substances huileuses (Tween, Rhodorsil, Gensil 420)
- gommes (gomme de guar, gomme arabique)
- alginates (Satialgine S 550, d'une viscosité de 400-750 cPo et Satialgine S 1100, d'une viscosité de 1000-1200 cPo)
- hydroxypropylméthylcellulose (H.P.M.C)(Pharmacoat 606)

Les dérivés de la cellulose, les alginates, sont employés classiquement pour les enrobages industriels (pharmacie notamment). Les huiles de silicone ainsi que le Tween 80 entrent fréquemment dans la formulation des enrobages en tant que plastifiants. Les gommes sont d'excellents hydrorétenteurs et cette propriété pourrait être intéressante pour prévenir les Rhizobiums d'une déshydratation rapide néfaste à leur survie.

Les échantillons sont préparés suivant le protocole décrit dans Matériels et Méthodes. Les quantités des différents constituants sont 200g de graines, 2 à 5 ml d'agent collant et 2 g d'inoculum tourbe (Bioprox). Les graines enrobées sont conservées sous air, en chambre

froide à 6°C. Des numérations des cellules viables sont effectuées à intervalles de temps réguliers avec milieu sélectif.

Deux expérimentations ont été menées indépendamment, l'une avec l'inoculum tourbe, l'autre avec le même inoculum additionné de carbonate de calcium. Ce dernier est souvent employé pour neutraliser les tourbes destinées à la confection d'inoculums. Il pourrait en outre servir à la réticulation d'un enrobage à base d'alginate appliqué sur l'inoculum tourbe ; la réticulation en gel est obtenue par échange des ions Ca⁺⁺ et H⁺, au sein d'une solution d'alginate alcalin.

Mugnier et Jung (124), soulignent en effet l'intérêt des alginates, pour la protection des Rhizobiums et d'autres bactéries, lors de la déshydratation ; ils permettent de même, de diminuer la mortalité induite par une réhydratation rapide. Aussi, à titre comparatif, des enrobages à base d'alginate ont été confectionnés.

2 / RESULTATS.

2.1 / Enrobages réalisés avec la tourbe seule.

2.1.1 / Modélisation des courbes de survie.

Les résultats des numérations des cellules viables sont récapitulés dans le tableau XLI. La première observation, est que cette façon simple de procéder permet de maintenir dans certains cas une population bactérienne égale ou supérieure aux normes (10^5 Rhizobiums/graine), pendant plus de 7 mois. Le but poursuivi dans cette étude, est de sélectionner par l'analyse des résultats des numérations, les substances permettant une longévité maximale des cellules de Bradyrhizobium japonicum.

Les modèles de régression relatifs aux courbes de perte de viabilité ont été recherchés. Ils sont de type exponentiel :

$\log Y = a + b * X$ ou $Y = A * B^X$ avec $A = 10^a$ et $B = 10^b$ (Tableau XLII).

Après vérification de l'égalité des variances, les coefficients de régression obtenus sont soumis au test de parallélisme par l'analyse de

Tableau XLI

"Screening" des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe seule. Etude de la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine, conservation à + 6°C

Numéro et nature l'enrobage.	Durée de stockage en jours.								
	1	8	15	22	29	43	69	210	
1 eau	6,3 (6,0)	6,1 (6,0)	5,9 (6,0)	5,9 (5,9)	5,8 (5,8)	5,6 (5,6)	5,5 (5,6)	4,9 (4,8)	
2 Tween 80	4,8 (4,4)	4,5 (4,2)	3,9 (4,0)	3,6 (3,8)	3,4 (3,6)	3,3 (3,3)	2,5 (2,8)	1,1 (1,1)	
3 huile silicone Rhodorsil	6,8 (6,6)	6,7 (6,5)	6,4 (6,5)	6,2 (6,4)	6,2 (6,4)	6,2 (6,3)	6,2 (6,2)	5,5 (5,5)	
4 huile silicone Bevaloid 6675	5,9 (5,6)	5,6 (5,5)	5,3 (5,3)	5,1 (5,2)	4,8 (5,1)	4,8 (4,8)	4,3 (4,4)	2,7 (2,7)	
5 saccharose 25%	6,6 (6,3)	6,3 (6,2)	6,1 (6,2)	6,0 (6,1)	6,0 (6,1)	6,0 (6,0)	5,8 (5,9)	5,2 (5,1)	
6 gomme de guar Viscogum 1 %	6,5 (6,2)	6,4 (6,2)	6,2 (6,1)	5,9 (6,1)	6,0 (6,0)	5,8 (6,0)	5,7 (5,8)	5,1 (5,0)	
7 H.P.M.C. 10 % Pharmacoat 606	6,7 (6,8)	6,7 (6,7)	6,6 (6,7)	6,5 (6,6)	6,5 (6,6)	6,8 (6,5)	6,6 (6,4)	5,5 (5,6)	
8 alginate 1 % Satialgine 550	6,2 (5,9)	6,0 (5,8)	5,7 (5,8)	5,7 (5,8)	5,8 (5,7)	5,4 (5,6)	5,4 (5,4)	4,7 (4,6)	
9 alginate 1 % Satialginell100	6,5 (6,3)	6,2 (6,2)	6,1 (6,2)	6,1 (6,1)	5,9 (6,1)	6,0 (6,0)	5,8 (5,8)	5,0 (5,0)	
10 gomme arabique 30 %	7,0 (7,0)	7,0 (6,9)	6,8 (6,9)	7,0 (6,8)	6,7 (6,8)	6,8 (6,7)	6,3 (6,5)	5,6 (5,6)	

Les valeurs calculées par les modèles de régression estimés sont notés entre parenthèses.

Les résultats des numérations sont exprimés en logarithme décimal.

Tableau XLII

"Screening" des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe seule. Modélisation, recherche des modèles de régression.

N°Ech.	équation de régression	coefficient corrélation	résultat test signification	intervalle confiance de b; $\alpha=5%$	nombre de jours où Y<5
1	$Y = 6,1 * (0,9989)^X$	0,952	58,60***	$b \pm 0,0003$	181
2	$Y = 4,4 * (0,9932)^X$	0,989	279,10***	$b \pm 0,0010$	0
3	$Y = 6,6 * (0,9991)^X$	0,926	36,24**	$b \pm 0,0004$	309
4	$Y = 5,6 * (0,9965)^X$	0,991	334,80***	$b \pm 0,0005$	33
5	$Y = 6,3 * (0,9990)^X$	0,936	42,25**	$b \pm 0,0004$	231
6	$Y = 6,2 * (0,9990)^X$	0,940	45,25**	$b \pm 0,0004$	215
7	$Y = 6,8 * (0,9991)^X$	0,928	37,48**	$b \pm 0,0004$	342
8	$Y = 5,9 * (0,9989)^X$	0,939	44,56**	$b \pm 0,0004$	151
9	$Y = 6,3 * (0,9989)^X$	0,943	98,90***	$b \pm 0,0003$	210
10	$Y = 7,0 * (0,9990)^X$	0,973	105,71***	$b \pm 0,0003$	337

Les numéros d'échantillons correspondent aux enrobages suivants :

- 1.....témoïn eau
- 2.....tween
- 3.....huile silicone Rhodorsil
- 4.....huile silicone Bevaloid 6675
- 5.....saccharose 25 %
- 6.....gomme de guar, Viscogum 2 %
- 7.....H.P.M.C. pharmacoat 606 10 %
- 8.....alginate, Satialgine S 550
- 9.....alginate, Satialgine S 1100
- 10.....gomme arabique 30 %

Tableau XLIII

screening des agents collants, analyse de la variance.

* test de Hartley d'égalité des variances.

10 populations, 6 degrés de liberté.

$$\text{Hobs} = \frac{\text{SCE } y \cdot x \text{ max}}{\text{SCE } y \cdot x \text{ min}} = 14,5 ; H_{0,95} = 18,6$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

* test de parallélisme : tableau d'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
régression linéaire moyenne	1	0,211	0,211	
non parallélisme	9	0,202	0,022	100***
écarts % aux régression	60	0,01343	0,00022	
TOTAUX	70			

Le test de non parallélisme des droites de régression donne une valeur F hautement significative, ce qui signifie que les coefficients de régression estimés ne sont pas dans leur ensemble identiques.

la variance (Tableau XLIII). La valeur F relative au non parallélisme des droites de régression est hautement significative. Ceci nous amène à rechercher les régressions les meilleures.

2.1.2 / Influence et comparaison de 10 substances collantes appliquées à la bactérisation et à l'enrobage de semences de soja : méthode de Newman et Keuls (37, 94, 129).

Les régressions estimées sont comparées entre elles par la méthode de Newman et Keuls, après calcul des plus petites amplitudes significatives. Les moyennes des valeurs observées servent de base de comparaison, puisque le point moyen passe par la courbe de régression estimée.

Il s'agit des points $\bar{X}_{i.} = \sum_j X_{ij}/n$, $\bar{Y}'_{i.} = \sum_j (\log Y_{ij})/n$.

i : numéro de l'échantillon.

La comparaison des groupes d'observations commence par la moyenne la plus faible, $\bar{Y}'_{2.}$. L'amplitude relative à 10 populations est ajoutée (Tableau XLIV). Si cela conduit à une valeur inférieure à $\bar{Y}'_{i.}$, il en ira de même en ajoutant les amplitudes relatives à un nombre de populations inférieur qui ont des valeurs plus faibles ; on aboutira à la conclusion $\bar{Y}'_{2.} < \bar{Y}'_{i.}$ et à toutes les valeurs supérieures à $\bar{Y}'_{i.}$. Toutes les comparaisons effectuées sont récapitulées dans le tableau XLIV. Les valeurs qui doivent être considérées comme égales sont soulignées ci-dessous.

Les valeurs moyennes $\bar{Y}'_{i.}$ observées se classent comme suit.

$\bar{Y}'_{10.}$	$\bar{Y}'_7.$	$\bar{Y}'_3.$	$\bar{Y}'_5.$	$\bar{Y}'_9.$	$\bar{Y}'_6.$	$\bar{Y}'_1.$	$\bar{Y}'_8.$	$\bar{Y}'_4.$	$\bar{Y}'_2.$
<u>0,821</u>	<u>0,811</u>	0,797	<u>0,779</u>	<u>0,773</u>	<u>0,772</u>	<u>0,759</u>	0,746	0,672	0,496

La gomme arabique, l'huile de silicone Rhodorsil, et le Pharmacoat permettent une survie significativement meilleure que le témoin enrobé avec de l'eau. Le saccharose, l'alginate S1100, la gomme de guar et

Tableau XLIV

Comparaison des enrobages réalisés avec 10 substances collantes : méthode de Newman et Keuls.(37,94, 129)

* Calcul de la plus petite amplitude significative.

La plus petite amplitude significative est, pour un niveau de signification α , un nombre de moyennes donné, un nombre de degrés de liberté donné (relatif au carré moyen résiduel : CMr) et un nombre n d'observations intervenant dans chaque moyenne : $q_{1-\alpha} \cdot \sqrt{CMr/n}$

soit pour $\alpha = 5 \%$ et pour

2 populations.....	0,015
3 populations.....	0,019
4 populations.....	0,020
5 populations.....	0,021
6 populations.....	0,022
7 populations.....	0,023
8 populations.....	0,023
9 populations.....	0,024
10 populations.....	0,024

* Comparaison des régressions

nb populations comparées.	comparaison	résultat
10	$\bar{Y}'_2 + 0,024 = 0,520 < \bar{Y}'_4$	$\bar{Y}'_2 < \bar{Y}'_4$
9	$\bar{Y}'_4 + 0,024 = 0,696 < \bar{Y}'_8$	$\bar{Y}'_4 < \bar{Y}'_8$
8	$\bar{Y}'_8 + 0,023 = 0,769 < \bar{Y}'_6$	$\bar{Y}'_8 < \bar{Y}'_6$
2	$\bar{Y}'_8 + 0,015 = 0,761 > \bar{Y}'_1$	$\bar{Y}'_8 = \bar{Y}'_1$
7	$\bar{Y}'_1 + 0,023 = 0,782 < \bar{Y}'_3$	$\bar{Y}'_1 < \bar{Y}'_3$
4	$\bar{Y}'_1 + 0,020 = 0,779 = \bar{Y}'_5$	$\bar{Y}'_1 = \bar{Y}'_5$
4	$\bar{Y}'_5 + 0,020 = 0,799 < \bar{Y}'_7$	$\bar{Y}'_5 < \bar{Y}'_7$
2	$\bar{Y}'_5 + 0,015 = 0,793 < \bar{Y}'_3$	$\bar{Y}'_5 < \bar{Y}'_3$
3	$\bar{Y}'_3 + 0,019 = 0,816 < \bar{Y}'_{10}$	$\bar{Y}'_3 < \bar{Y}'_{10}$
2	$\bar{Y}'_3 + 0,014 = 0,811 = \bar{Y}'_7$	$\bar{Y}'_3 = \bar{Y}'_7$
2	$\bar{Y}'_7 + 0,014 = 0,825 > \bar{Y}'_{10}$	$\bar{Y}'_7 = \bar{Y}'_{10}$



l'alginat S500 sont équivalents au témoin, l'huile de silicone B6675 et le tween 80 sont défavorables à la survie de Rhizobium.

2.2 / Enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carbonate de calcium.

Le protocole expérimental adopté est le même que précédemment. Le carbonate de calcium est ajouté à raison de 0,4 g pour 200 g de graines. La survie des bactéries sur la graine est contrôlée avec la même périodicité que précédemment, les résultats des numérations sont rassemblés dans le tableau XLV.

Les modèles de régression les mieux ajustés à l'observation, sont de type exponentiel ou allométrique ; aussi les méthodes de comparaison de valeurs moyennes ne seront pas employées (tableau XLVI).

L'incidence du CaCO_3 sur la survie de Rhizobium est vraisemblablement très faible. Elle intervient principalement au moment du pelliculage car sa présence diminue la quantité de tourbe fixée sur les graines avec les faibles volumes d'adhésif employés.

Les adhésifs, pour lesquels on avait précédemment mis en évidence une incidence favorable sur la survie de Bradyrhizobium japonicum à savoir la gomme arabique, le pharmacoat, l'huile de silicone Rhodorsil permettent dans cette expérimentation des taux de survie importants par rapport au témoin. La gomme de Guar et le saccharose présentent également des propriétés intéressantes, quelques uns de ces adhésifs seront employés pour une étude plus approfondie des paramètres de conservation. De la même manière que précédemment, il est possible de maintenir un nombre de bactéries sur les semences, supérieur aux normes pendant plus de 7 mois pour les substances les plus favorables.

Tableau XLV

Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carbonate de calcium.

Etude de la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine, conservation à +6°C

N° et nature de l'enrobage.	Durée de stockage en jours.								
	1	8	15	22	29	43	69	210	
11 eau	5,3 (5,0)	5,1 (5,0)	4,9 (4,9)	4,7 (4,9)	4,6 (4,8)	4,6 (4,7)	4,5 (4,5)	3,7 (3,7)	
12 Tween 80	5,3 (5,4)	5,2 (5,1)	4,7 (4,8)	4,8 (4,5)	4,3 (4,3)	3,9 (3,8)	2,7 (3,1)	0,1 (1,0)	
13 huile silicone Rhodorsil	6,2 (6,0)	6,0 (5,9)	5,9 (5,9)	5,8 (5,9)	5,8 (5,8)	5,7 (5,8)	5,5 (5,6)	5,0 (4,9)	
14 huile silicone Bevaloid 6675	5,5 (5,9)	5,1 (4,8)	4,6 (4,5)	4,4 (4,4)	4,6 (4,3)	4,3 (4,1)	3,7 (3,9)	3,3 (3,5)	
15 saccharose 25%	6,8 (7,0)	6,2 (6,1)	5,9 (5,9)	5,8 (5,7)	5,8 (5,6)	5,4 (5,5)	5,3 (5,3)	4,9 (5,0)	
16 gomme de guar Viscogum 1 %	6,6 (6,7)	6,0 (6,0)	5,9 (5,8)	5,6 (5,7)	5,4 (5,6)	5,7 (5,5)	5,3 (5,3)	5,0 (5,0)	
17 H.P.M.C. 10 % Pharmacoat 606	5,2 (5,4)	5,0 (4,9)	4,9 (4,8)	4,9 (4,7)	4,7 (4,7)	4,6 (4,6)	4,5 (4,5)	4,2 (4,3)	
18 alginate 1 % Satialgine 550	5,9 (6,2)	5,3 (5,1)	4,9 (4,8)	4,7 (4,6)	4,7 (4,5)	4,2 (4,3)	4,2 (4,1)	3,5 (3,7)	
19 alginate 1 % Satialgine 100	6,3 (6,6)	5,6 (5,5)	5,4 (5,2)	5,3 (5,0)	5,1 (4,9)	4,7 (4,8)	4,4 (4,6)	4,0 (4,1)	
20 gomme arabique 30 %	7,0 (7,0)	6,7 (6,6)	6,6 (6,5)	6,3 (6,4)	6,3 (6,3)	6,4 (6,2)	6,2 (6,1)	5,7 (5,9)	



Les valeurs calculées par les modèles de régression estimés sont notés entre parenthèses.

Les résultats des numérations sont exprimés en logarithme décimal.

Tableau XLVI

Screening des agents collants : enrobages réalisés avec la tourbe additionnée de carbonate de calcium. Modélisation, recherche des modèles de régression.

N°Ech.	équation de régression	coefficient de corrélation	résultat test de signification	intervalle de confiance de b; $\alpha=5\%$	nombre de jours où $Y < 5$
11	$Y = 5,0 * (0,9985)^X$	0,953	59,46***	$b \pm 0,0005$	0
12	$Y = 5,4 * (0,9919)^X$	0,995	559,7***	$b \pm 0,0008$	9
13	$Y = 6,0 * (0,9991)^X$	0,958	67,56***	$b \pm 0,0003$	203
14	$Y = 5,9 * X^{-0,0965}$	0,935	41,92**	$b \pm 0,0149$	6
15	$Y = 6,9 * X^{-0,0623}$	0,983	174,5***	$b \pm 0,0047$	177
16	$Y = 6,6 * X^{-0,0517}$	0,964	79,50***	$b \pm 0,0058$	215
17	$Y = 5,4 * X^{-0,0401}$	0,943	48,02***	$b \pm 0,0058$	7
18	$Y = 6,2 * X^{-0,0970}$	0,966	83,72***	$b \pm 0,0106$	10
19	$Y = 6,6 * X^{-0,0874}$	0,964	79,82***	$b \pm 0,0098$	24
20	$Y = 7,1 * X^{-0,0361}$	0,941	46,73***	$b \pm 0,0053$	nd*



Les numéros d'échantillons correspondent aux enrobages suivants :

- 11.....témoin eau
- 12.....tween
- 13.....huile silicone Rhodorsil
- 14.....huile silicone Bevaloid 6675
- 15.....saccharose 25 %
- 16.....gomme de guar, Viscogum 2 %
- 17.....H.P.M.C. pharmacoat 606 10 %
- 18.....alginate, Satialgine S 550
- 19.....alginate, Satialgine S 1100
- 20.....gomme arabique 30 %

II / INFLUENCE DU SEL DE CALCIUM EMPLOYE POUR LA RETICULATION DES GELS D'ALGINATE SUR LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM".

Afin de déceler une influence éventuelle du sel de calcium employé pour la réticulation des gels d'alginate, différents sels de calcium ont été testés à cet effet.

1 / PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

L'enrobage des graines est effectué comme dans les cas précédents. L'adhésif employé est le Gensil 420 à raison de 2 ml par lot de 200g de graines. 0,5 g des sels de calcium sont ajoutés à 4g de l'inoculum tourbe. Après obtention d'un enrobage uniforme avec la tourbe, 5 ml d'alginate sont ajoutés dans les graines sous agitation. La réticulation en gel est instantanée. Deux alginates de viscosité différente ont été employés dans cette étude : Satialgine 550 et Satialgine 1100. Les échantillons obtenus sont conservés sous air, à 2°C et à 20°C, et la survie de Bradyrhizobium japonicum est étudiée sur plus de 6 mois.

2 / RESULTATS.

L'ensemble des valeurs des numérations effectuées pour le suivi de ces deux expérimentations est rapporté dans le tableau XLVII. De même que pour toutes les expérimentations réalisées jusqu'à présent, les températures basses permettent une longévité supérieure des Rhizobiums. A l'exception du chlorure de calcium, qui induit une mortalité immédiate et totale en moins d'une semaine, les courbes de survie de Bradyrhizobium japonicum, suivent des régressions exponentielles à 6°C, et linéaires décroissantes à 20°C (tableaux XLVIII & L).

Pour les deux températures de conservation, après vérification de l'égalité des variances, les coefficients de régression sont comparés entre eux par l'analyse de la variance (tableaux XLIX & LI). Le test de non parallélisme des droites de régression estimées, donne une valeur F non significative pour $\alpha = 5 \%$. Les coefficients de régression estimés doivent donc être considérés comme égaux. A l'exception du chlorure de calcium, les quatre autres sels utilisés ont une incidence identique sur

Tableau XLVII

Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium.
Conservation à +6°C et à 20°C; résultats des numérations exprimés en log.

numéro, nature de l'enrobage	Durée de stockage en jours											
	0	15		29		50		70		200		
		2°C	20°C									
21..S 1100, CaCO ₃	6,3	5,5	4,5	5,0	3,3	5,5	2,1	3,9	0	2,8	0	
22..S 1100, CaSO ₄ , 2H ₂ O	6,6	6,1	4,8	5,5	3,6	5,4	2,6	4,3	1,2	3,3	0	
23..S 1100, Ca(PO ₄) ₃ OH	6,6	5,9	4,9	5,5	4,5	6,0	2,7	4,2	1,9	3,1	0	
24..S 1100, CaCl ₂	<2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25..S 1100, Ca lactate	6,4	5,7	4,5	4,9	2,7	5,0	2,0	3,6	1,2	3,4	0	
26...S 550, CaCO ₃	6,1	5,4	4,2	5,1	2,4	4,7	0,8	3,9	0	2,8	0	
27...S 550, CaSO ₄ , 2H ₂ O	6,6	6,0	4,9	5,4	3,9	5,6	2,8	4,5	2,1	3,6	0	
28...S 550, Ca(PO ₄) ₃ OH	6,6	5,7	4,6	5,4	3,6	5,2	2,9	4,9	1,8	3,0	0	
29...S 550, CaCl ₂	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30...S 550, Ca lactate	6,4	5,8	4,1	5,7	3,1	4,7	1,9	3,4	1,2	2,9	0	

Tableau XLVIII

Modélisation des courbes de survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à +6°C.

N°Ech.	Équation de régression estimée	coefficient de corrélation	résultat du test de signification	intervalle de confiance de b; α=5%
21	$Y = 5,9 * (0,99610)^X$	0,966	69,79**	$b \pm 0,00047$
22	$Y = 6,2 * (0,99661)^X$	0,963	63,11**	$b \pm 0,00042$
23	$Y = 6,2 * (0,99641)^X$	0,965	68,68**	$b \pm 0,00044$
25	$Y = 5,7 * (0,99706)^X$	0,853	13,32*	$b \pm 0,00081$
26	$Y = 5,7 * (0,99629)^X$	0,974	92,21**	$b \pm 0,00039$
27	$Y = 6,2 * (0,99710)^X$	0,953	48,92**	$b \pm 0,00042$
28	$Y = 6,2 * (0,99639)^X$	0,989	230,46***	$b \pm 0,00024$
30	$Y = 5,9 * (0,99595)^X$	0,912	24,86*	$b \pm 0,00082$
témoin	$Y = 6,8 * (0,99628)^X$	0,999	4949,3***	$b \pm 0,00005$

Les numéros d'échantillons correspondent aux enrobages suivants :

- 21.....S 1100, CaCO₃
- 22.....S 1100, CaSO₄, 2H₂O
- 23.....S 1100, Ca(P₄O₄)₃OH
- 24.....S 1100, CaCl₂: après 24 H, Y=1; 1 sem., Y=0
- 25.....S 1100, Ca lactate
- 26.....S 550, CaCO₃
- 27.....S 550, CaSO₄, 2H₂O
- 28.....S 550, Ca(P₄O₄)₃OH
- 29.....S 550, CaCl₂: après 24 H, Y=3; 1 sem., Y=0
- 30.....S 550, Ca lactate

Tableau XLIX

Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 6°C. Tableau d'analyse de la variance

* test de Hartley d'égalité des variances.

8 populations, 5 degrés de liberté.

$$H_{obs} = \frac{SCE_{y.x \max}}{SCE_{y.x \min}} = 11,7 ; H_{0,95} = 22,9$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

* comparaison des coefficients de régression par l'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
régression moyenne	1	0,53406	0,53406	277,1***
non parallélisme	7	0,00650	0,00093	0,4816NS
écarts par rapport à régression moyenne	32	0,06169	0,00193	
TOTAUX	40	0,60229		

La valeur F du test de non parallélisme n'est pas significative, les coefficients de régression doivent être considérés comme égaux.

Tableau L

Modélisation des courbes de survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 20°C.

N°Ech.	équation de régression estimée	coefficient de corrélation	résultat du test de signification	intervalle de confiance de b; &=5%
21	$Y = 6,1 - 0,08607 * X$	0,992	183,75**	$b \pm 0,00635$
22	$Y = 6,2 - 0,07393 * X$	0,984	88,91**	$b \pm 0,00784$
23	$Y = 6,2 - 0,06592 * X$	0,980	73,30**	$b \pm 0,00770$
25	$Y = 5,8 - 0,07260 * X$	0,963	38,56*	$b \pm 0,01169$
26	$Y = 6,0 - 0,10827 * X$	0,990	95,99**	$b \pm 0,01105$
27	$Y = 6,1 - 0,06277 * X$	0,972	50,75*	$b \pm 0,00881$
28	$Y = 6,0 - 0,01060 * X$	0,961	36,14*	$b \pm 0,01059$
30	$Y = 5,6 - 0,01429 * X$	0,945	24,88*	$b \pm 0,01429$

Les numéros d'échantillons correspondent aux enrobages suivants :

- 21.....S 1100, CaCO₃
- 22.....S 1100, CaSO₄, 2H₂O
- 23.....S 1100, Ca(PO₄)₃OH
- 24.....S 1100, CaCl₂ : après 24 H, Y=1; 1 sem., Y=0
- 25.....S 1100, Ca lactate
- 26.....S 550, CaCO₃
- 27.....S 550, CaSO₄, 2H₂O
- 28.....S 550, Ca(PO₄)₃OH
- 29.....S 550, CaCl₂ : après 24 H, Y=3; 1 sem., Y=0
- 30.....S 550, Ca lactate

Tableau LI

Survie de Bradyrhizobium japonicum dans des enrobages à base d'alginate confectionnés avec différents sels de calcium. Conservation à + 20°C. Analyse de la variance.

* test de Hartley d'égalité des variances.

8 populations, 3 degrés de liberté.

$$H_{obs} = \frac{SCE_{y.x \text{ max}}}{SCE_{y.x \text{ min}}} = 5,79 ; H_{0,95} = 83,5$$

L'hypothèse d'égalité des variances est acceptée.

* comparaison des coefficients de régression par l'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
régression moyenne	1	119,978	119,978	436,7***
non parallélisme	7	1,0241	0,1463	0,5325NS
écarts par rapport à régression moyenne	24	6,5938	0,2747	
TOTAUX	32	129,5		

La valeur F du test de non parallélisme n'est pas significative, les coefficients de régression doivent être considérés comme égaux.

la survie de Bradyrhizobium japonicum dans les enrobages à base d'alginate.

III / INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE DE CONSERVATION SUR LA SURVIE DE "BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM", DANS DES ENROBAGES DE DIFFERENTES NATURES.

1 / PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Trois des adhésifs précédemment sélectionnés comme excellents agents protecteurs ont été utilisés dans cette étude: la gomme arabique, la gomme de guar, l'huile de silicone Rhodorsil. Chaque adhésif est additionné de saccharose à 25 %. Pour chacun des 3 lots de graines obtenus, on étudie l'influence des modalités d'application des Rhizobiums, et l'influence de différentes humidités relatives de conservation. Chaque observation est constituée des numérations effectuées sur des échantillons issus de chacun de ces trois lots.

Trois modalités d'application de l'inoculum sont testées. Le pelliculage des microorganismes est réalisé soit :

- par adjonction de Rhizobiums cultivés sur tourbe (souche G49).
- par adjonction de Rhizobiums cultivés sur tourbe (souche G49) et confection d'un deuxième enrobage à base d'alginate (réticulation obtenue par CaPO_4)
- par application de concentrés cellulaires de cette même souche, et réalisation d'un enrobage à base d'alginate.

Les différents lots de graines enrobées ainsi obtenus, sont répartis par échantillons de 20 graines dans des tubes (50 x 20 mm), puis placés à l'intérieur d'enceintes à différentes a_w , et stockés à 20°C.

Des numérations de cellules viables sont effectuées à intervalle de temps réguliers afin de suivre la viabilité des Rhizobiums, et de mettre en évidence l'incidence des différents facteurs :

- a_w

- temps
- modalité d'enrobage.

2 / RESULTATS

Les quantités moyennes de bactéries viables par graine, obtenues par numération, sont récapitulées dans le tableau LII. Afin d'individualiser le rôle des différents facteurs, les résultats sont soumis à l'analyse de la variance à trois critères de classification (Tableau LIII).

Les tests F de signification des différents facteurs ont des valeurs hautement significatives. Ceci s'interprète facilement, car

- la viabilité de l'inoculum baisse en fonction du temps,
- la viabilité des cellules est déterminée par l'humidité relative de conservation, les humidités relatives inférieures à 43% étant les plus favorables. Les humidités relatives supérieures à 0,75 permettent des taux de survie nettement inférieurs.
- Cette expérimentation permet de mettre en évidence qu'un deuxième enrobage à base d'alginate n'améliore pas la longévité des bactéries, et que les Rhizobiums appliqués avec un support tel que la tourbe permettent d'obtenir un enrobage dans lequel la viabilité des cellules est très bonne.

De même, les tests relatifs aux interactions des différents facteurs sont significatifs, ce qui nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- La mortalité en fonction du temps est d'autant plus importante que l' a_w est élevée.
- L'application d'inoculum tourbe permet de diminuer sensiblement les effets létaux des humidités relatives de conservation élevées.
- De même, elle permet une longévité des cellules supérieure à celle obtenue en appliquant des concentrés cellulaires.

Tableau LIII

Influence de l'humidité relative de conservation, du mode d'application, et du temps sur la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine : conservation à 20°C. résultats des numérations exprimés en log du nombre de bactéries / graine

humidité relative de conservation	temps de conservation en semaines	Numéro de l'échantillon								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
population initiale	0	7,0	7,0	6,9	6,9	6,7	6,9	6,7	7,2	6,9
H.R. = 3%	2	6,2	6,9	6,8	6,5	6,5	6,7	5,8	5,4	6,0
	4	6,2	6,7	6,8	6,3	6,2	6,3	5,6	5,2	5,7
	8	5,6	6,1	6,0	5,8	5,5	5,9	3,9	3,7	2,9
H.R. = 11%	2	6,4	7,0	6,7	6,6	6,7	6,7	5,7	5,5	5,9
	4	6,3	7,0	6,7	6,5	6,2	6,8	5,5	5,6	6,0
	8	5,6	6,4	6,0	5,9	5,5	5,7	4,0	3,7	3,6
H.R. = 23%	2	6,5	7,1	6,9	6,5	6,4	6,6	5,7	5,4	6,1
	4	6,2	6,8	6,5	6,5	6,4	6,6	5,2	5,0	5,5
	8	5,3	6,1	6,1	5,8	5,4	6,2	3,7	3,6	3,1
H.R. = 43%	2	6,6	7,2	6,8	6,7	6,5	6,7	5,7	4,7	5,6
	4	6,4	6,8	6,7	6,5	5,9	6,7	4,7	3,3	5,2
	8	5,5	6,2	6,2	5,4	5,3	5,9	1,8	2,9	2,6
H.R. = 75%	2	6,7	6,8	6,7	6,6	6,4	6,4	5,5	4,2	5,6
	4	6,1	6,7	6,2	5,9	6,0	6,0	4,0	3,2	4,7
	8	3,7	5,4	4,5	3,9	4,5	3,7	0	0	0
H.R. = 86%	2	6,5	6,7	6,1	6,5	6,1	6,1	4,9	4,2	4,9
	4	5,5	6,6	5,7	5,9	5,8	5,6	4,1	3,3	3,5
	8	3,2*	4,6*	4,8*	1,0*	2,6*	1,0*	0*	0*	0*
échantillons conservés à 6°C, en l'état.	2	7,1	7,0	7,1	6,7	6,6	6,8	6,1	5,9	6,3
	4	7,1	7,1	7,1	7,0	6,6	6,8	5,9	5,9	5,9
	8	6,5	6,5	6,5	6,0	6,0	6,1	3,1	3,6	4,0
	28	6,2	6,5	6,1	5,6	5,7	5,6	2,9	2,3	2,9



les numéros des échantillons correspondent aux enrobages suivants :

gomme arabique 30% saccharose 25%
 + inoculum tourbe Bioprox 4g... 1
 + tourbe et alginate..... 4
 + conc. cellulaire et alginate. 7

Viscogum 2%, saccharose 25%
 + inoculum tourbe Bioprox 4g... 2
 + tourbe et alginate..... 5
 + conc. cellulaire et alginate. 8

* Numérations effectuées en présence de 10 ug/ml de Benlate (Benomyl)

Rhodorsil, saccharose 25%
 + inoculum tourbe Bioprox 4g... 2
 + tourbe et alginate..... 5
 + conc. cellulaire et alginate. 8

Tableau LIII

Influence de l'humidité relative de conservation, du mode d'application, et du temps sur la survie de Bradyrhizobium japonicum sur la graine : tableau d'analyse de la variance.

source de variation		degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
a _w	a	5	47,124	9,425	70,37***
temps	b	3	229,574	76,525	571,4***
enrobage	c	2	99,000	49,500	369,6***
interaction a _w temps	ab	15	50,129	3,342	24,95***
interaction a _w enrobage	ac	10	9,225	0,923	6,890***
interaction temps enrobage	bc	6	53,173	8,862	66,17***
interaction a _w temps enrobage	abc	30	10,443	0,3481	2,599***
résiduelle		144	19,287	0,134	
TOTAUX		215	517,954		



- L'interaction significative des trois facteurs montre, que l'effet conjugué de l'humidité relative et du temps diffère suivant les modalités d'application : les enrobages réalisés à base de tourbe seule supportent le mieux les effets délétères du temps et de l'humidité.

Cette expérimentation permet de montrer que contrairement à l'emploi de concentrés cellulaires qui ne permettent pas une longévité suffisante des bactéries, les inoculums sur tourbe se prêtent très bien au pelliculage. Ils permettent au moins aux humidités relatives inférieures à 75 %, de maintenir la concentration en Rhizobium largement au dessus des normes pendant au moins 2 mois à 20°C.

Pour des températures de stockage inférieures, l'expérimentation nous a montré qu'à 6°C, la viabilité de Bradyrhizobium japonicum dans les enrobages réalisés avec la tourbe est encore largement au dessus de 10^5 bactéries par graine au bout de 7 mois. (Tableau LII)

IV / ESSAIS COMPLEMENTAIRES.

1 / AUTRES SUBSTANCES PROTECTRICES.

Pour compléter l'étude des divers adhésifs des substances protéiques ont été testées et notamment pour se rapprocher des essais de la deuxième partie, le lait écrémé a été employé. Des substances glucidiques, le Methocel (méthylcellulose), l'explotab (glycolate sodique d'amidon), ont été choisis d'après leurs caractéristiques thermodynamiques (31, 166) et ils sont d'un emploi fréquent en enrobages industriels.

Des lots de 300 g de graines ont été enrobés avec 4 g d'inoculum tourbe et 5 ml des produits choisis. Les lots sont ensuite fractionnés afin de les stocker à température ambiante (20°C) et à 6°C. Un autre échantillon est conservé à humidité relative proche de 0% et 20°C. La gomme arabique additionnée de saccharose a servi de témoin. Les résultats des numérations de cellules viables sont récapitulés dans le tableau LIV.

Tableau LIV

"Screening" des agents collants, essais complémentaires : enrobages réalisés avec inoculum sur tourbe. Etude de la survie de la souche G49 de Bradyrhizobium japonicum sur la graine, conservation à + 6°C et 20°C.

nature de l'enrobage.	Durée de stockage en jours.					
	modalité de conservation	1	14	27	50	190
caséine 10%, 6ml	4°C	6,4	5,9	5,9	5,6	5,3
	20°C	6,4	5,5	5,2	4,8	2,8
	20°C, H.R=0	6,4	5,2	4,8	4,3	2,2
lait écrémé 10%, 6 ml	4°C	6,9	7,0	6,9	6,9	6,2
	20°C	6,9	5,9	5,2	5,1	2,7
	20°C, H.R=0	6,9	5,8	5,5	5,4	4,1
gélatine A 10%, 6 ml	4°C	6,8	6,3	6,3	6,8	6,1
	20°C	6,8	5,9	5,6	5,1	3,5
	20°C, H.R=0	6,8	5,7	5,3	5,2	3,5
Methocel 10%, 6 ml	4°C	7,2	7,0	6,7	6,5	5,9
	20°C	7,2	5,7	5,1	4,8	2,6
	20°C, H.R=0	7,2	5,6	5,0	5,2	2,8
Explotab 5%, 6ml	4°C	6,5	6,6	6,3	6,1	5,4
	20°C	6,5	5,4	4,7	4,4	3,0
	20°C, H.R=0	6,5	5,4	5,1	4,9	3,2
gomme arabique 30%	4°C	7,0	7,0	7,1	6,6	5,9
saccharose 25%, 4ml	20°C	7,0	6,0	5,0	4,9	2,8
	20°C, H.R=0	7,0	6,2	5,8	5,3	2,9
gomme arabique 30%	4°C	7,1	7,2	6,8	6,9	6,3
saccharose 25%, 4ml	20°C	7,1	5,8	5,0	4,9	2,5
Benlate : 1mg						
gomme arabique 30%	4°C	7,1	6,8	6,7	6,9	6,5
saccharose 25%, 4ml	20°C	7,1	6,0	5,0	4,7	1,5
Benlate : 5mg						
gomme arabique 30%	4°C	7,2	7,0	6,8	7,1	6,4
saccharose 25%, 4ml	20°C	7,2	6,0	5,0	4,9	1,9
Benlate : 10mg						



Les résultats des numérations sont exprimés en logarithme décimal.

La conservation à 6°C permet de maintenir une population très élevée pendant 6 mois. A 20°C, la conservation à une a_w proche de 0, ou dans l'état initial de déshydratation donne des résultats voisins. Les cinq adhésifs testés permettent une très bonne conservation. La viabilité est très élevée (aux alentours de 10^5) pendant 2 mois ; après 6 mois de stockage, il subsiste environ 1000 bactéries par graine, quantité cependant insuffisante pour des applications agronomiques. Le lait écrémé et la gélatine sont particulièrement appropriés à cet usage; la gélatine présente la particularité intéressante de fixer des quantités importantes d'inoculum sur la graine.

Ces études ont permis de mettre en évidence les facteurs principaux qui conditionnent la survie de Bradyrhizobium japonicum. Les températures de conservation élevées ont une influence néfaste et accélèrent le processus de détérioration de l'enrobage. Cependant à 20°C, de nombreuses substances protectrices permettent de maintenir la population bactérienne au dessus des normes agronomiquement acceptables pendant plus de 2 mois. De plus, un léger séchage après confection de l'enrobage est suffisant pour placer les bactéries dans des conditions tout à fait acceptables pour leur survie ; cependant il serait préférable de contrôler que l'humidité relative de stockage n'excède pas 43%. En effet, Davidson (42) a montré qu'à une humidité relative de 50%, la survie sur la graine des Rhizobiums est mauvaise pour divers adhésifs testés, et après 3 semaines de conservation, il subsiste au maximum 14% de l'inoculum initial à 15°C et 1% à 30°C.

2 / AJOUT D'UN ANTIFONGIQUE.

Des publications récentes (79 bis et 81 bis) ont montré une prédation ou une compétition importantes par les microorganismes telluriques sur les Rhizobiums. Des tentatives d'amélioration de l'implantation de Bradyrhizobium japonicum dans les sols ont pu aboutir par l'emploi d'antifongiques appropriés, qui permettent de maintenir des concentrations bactériennes élevées, au moins jusqu'à l'émergence des racines.

Pour garantir les chances de succès de la bactérisation des graines, une telle démarche présente un intérêt pratique. Du bénomyl (Benlate) a ainsi été ajouté dans les enrobages réalisés à partir de gomme arabique 30% et de saccharose 25%. Afin de tester sa toxicité vis à vis des Rhizobiums, la survie des bactéries dans les enrobages est suivie pendant 7 mois à 6°C et à 20°C. Dans nos conditions expérimentales, la présence de bénomyl, n'altère pas significativement la survie de Rhizobium dans les enrobages qu'il soit employé à une concentration de 1, 5 ou 10mg par lot de graines (300 g). Des mutants des souches 3.2 et G49 résistant, en milieu liquide à une concentration de 20 ug par ml ont été isolés afin, si le besoin s'en fait sentir, d'augmenter les concentrations de Benlate dans les enrobages.

CONCLUSION

L'ensemble de ce travail nous a amené à envisager différents problèmes, intimement liés à la réussite de l'inoculation du soja.

Lors de l'étude des performances symbiotiques d'une trentaine de souches, nous avons mis en évidence l'existence de deux types symbiotiques phénotypiquement différents. Il serait intéressant de rapprocher ces observations avec les travaux de Stanley et al (166 Bis) qui soulignent l'existence de deux types symbiotiques de Bradyrhizobium japonicum présentant une organisation génétique ainsi que de nombreuses caractéristiques physiologiques et métaboliques différentes.

L'analyse de certains caractères pourrait utilement aider à comprendre les mécanismes de compétition entre souches. On connaît bien à l'heure actuelle le processus d'infection des poils racinaires par les Rhizobiums et la notion de compétence des cellules. De nombreux changements qui affectent directement leur infectivité, interviennent lors du vieillissement des cellules, notamment au niveau de la composition et des récepteurs membranaires (78). Streeter (170) a ainsi établi qu'il existe une corrélation négative entre l'accumulation de tréhalose, variable en fonction du temps et des souches, et l'infectivité des Rhizobiums ; il suggère que cet aspect pourrait être en relation avec la tolérance des souches à la dessiccation.

De fait, nos travaux ont mis en évidence que la souche 3.2 résistante à la déshydratation présente une nodulation peu abondante et est peu compétitive par rapport à la souche 3.32 ; cette dernière, par contre très infective et compétitive présente une forte sensibilité à la dessiccation. De même, les expérimentations au champ ont montré qu'à population égale, les inoculums déshydratés induisent une moins bonne nodulation que les inoculums non déshydratés à base de tourbe. A cet égard, toute étude pouvant étayer l'hypothèse de résistance à la dessiccation par l'accumulation de métabolites tels que le tréhalose et le mannitol, serait intéressante à mener.

Dans cette optique, il serait également utile de déterminer si l'accumulation de tels métabolites, aboutit nécessairement à une perte de l'infectivité des cellules, ou s'il est possible de placer les

cellules dans les conditions optimales de résistance à la déshydratation (synthèse ou protection extérieure par de telles substances dans les inoculums) tout en préservant leur infectivité.

Grâce aux travaux ayant trait à la déshydratation, les paramètres physiques favorables au maintien des potentialités vitales des inoculums déshydratés ont pu être cernés.

L'étape de la déshydratation aboutit à la destruction de 40 à plus de 99% des cellules suivant les souches, les supports, l'âge physiologique des cellules ; les changements rapides de structure des membranes liés à la perte d'eau et la fuite du matériel intracellulaire sont vraisemblablement responsables de la mortalité très importante observée à ce stade. La dessiccation par atomisation permet cependant d'atteindre des concentrations très importantes allant jusqu'à 10^{12} bactéries par gramme. Le maintien de telles concentrations passe par la maîtrise des facteurs affectant la survie de Bradyrhizobium japonicum en l'état déshydraté.

La présence d'oxygène se révèle à cet égard particulièrement nocive. Elle provoque en général une perte de viabilité linéaire en fonction du temps, ce qui traduirait que les altérations cellulaires ont lieu en cours de conservation probablement par oxydation de sites démasqués par l'élimination de l'eau.

Toutes les expérimentations mettant en jeu le facteur température aboutissent aux mêmes conclusions. L'augmentation de la température de conservation accélère la dégradation de l'inoculum.

L'emploi d'enceintes à différentes humidités relatives pour apprécier l'influence de ce paramètre sur la conservation des Rhizobiums a mis en évidence des relations complexes entre ce facteur et la survie des cellules déshydratées. En effet, dans le cas d'inoculums déshydratés, la conservation à une a_w de 0,11 est la plus favorable, mais on peut considérer que les a_w 0,0, 0,11, 0,23 sont satisfaisantes. Il en va de même, pour les enrobages réalisés avec les cellules en

milieu liquide. Par contre, dans les enrobages réalisés à partir de tourbe, les valeurs 0,0, 0,11, 0,23 et 0,43 donnent des résultats voisins.

La valeur d' a_w n'est donc pas le facteur déterminant de la survie. Par contre chaque valeur d' a_w impose des modifications de la disponibilité de l'eau dans le produit. Nous avons mis en évidence par l'étude des isothermes d'adsorption que la survie optimale se situe vraisemblablement au premier changement de pente des isothermes, point qui correspond à une couverture monomoléculaire d'eau fortement liée sur le substrat. L'élimination d'une partie de cette fraction d'eau par un séchage extrême conduit à une détérioration de l'inoculum. La présence d'eau faiblement liée au delà de ce point d'inflexion est très réactive, et la mortalité de l'inoculum augmente avec des quantités croissantes de cette fraction d'eau. La mortalité serait la plus forte au deuxième point d'inflexion, qui traduit la présence d'eau libre d'interaction avec le substrat. Au delà de ce point la mortalité est en général un peu moins forte, mais la détérioration de l'inoculum reste très rapide. L'état de l'eau dans le produit déshydraté dépend des valeurs d' a_w , et est caractéristique du support employé. Il serait à ce titre intéressant de comparer la survie des Rhizobiums pour plusieurs valeurs d' a_w , dans des supports, dont les caractéristiques thermodynamiques sont établies, afin d'étayer cette hypothèse.

De même, des études visant à expliquer les processus responsables de la mort des cellules seraient utiles. En effet, les études de conservation des denrées alimentaires ont montré que de nombreuses réactions sont directement dépendantes de l'eau (15). Des réactions d'autooxydation des lipides interviennent aux humidités relatives inférieures à 11% ; les réactions de brunissement qui aboutissent à la dégradation des acides nucléiques sont les plus intenses à une H.R. située autour de 50% ; le fonctionnement enzymatique commence dès qu'une humidité relative de 20% environ est atteinte. On ne sait par contre pas grand chose de l'existence et de l'intensité de ces réactions chez des bactéries vivantes conservées à humidités relatives contrôlées. De telles réactions, si elles ont lieu, pourraient causer des dommages sévères aux cellules.

Des dommages physiques aux membranes, liées à l'élimination de l'eau, peuvent également intervenir dans l'altération des fonctions vitales de la cellule (34). Des études de microscopie électronique aideraient en cela à la compréhension de ces phénomènes.

Cependant, par l'emploi de lait écrémé additionné de saccharose, la conservation à basse température (2°C), absence d'oxygène et faible humidité relative (<0,23) permet de maintenir une population bactérienne supérieure à 10^9 bactéries/g pendant plus de 4 mois pour la souche 3.2. Ces conditions sont relativement faciles à remplir par l'utilisation d'emballages imperméables aux échanges gazeux et à l'humidité. Un court séchage éventuel en chambre de séchage à la sortie de l'atomiseur, suffirait à éliminer l'eau faiblement liée qui subsiste dans les inoculum. En outre, il est possible de différer production de la biomasse et déshydratation, par congélation des concentrés cellulaires, sans perte de viabilité des cellules.

L'étape ultérieure de pelliculage des microorganismes sur la graine est très prometteuse. En effet, le respect des contraintes liées à la survie des cellules déshydratées de Bradyrhizobium japonicum suffit à préserver des quantités de bactéries, au dessus des normes agronomiques, pendant plus de deux mois à 20°C et plus de 7 mois à 6°C. L'emploi de Rhizobiums cultivés sur tourbe et de substances protectrices, se révèle à cet égard particulièrement approprié. La survie des cellules n'est que peu affectée par la déshydratation qui suit le pelliculage, alors que la mortalité des Rhizobiums apportés sous forme de concentrés cellulaires est importante. D'un point de vue pratique, l'entreprisage des semences enrobées, à des températures basses de préférence et à une humidité relative inférieure ou égale à 43%, permet une excellente conservation des bactéries sur la graine. Au dessus de 75% d'H.R. et à 20°C, la survie n'est acceptable que pour de courtes périodes (1 mois). Cependant, il n'est pas envisable de stocker des semences à des humidités relatives aussi élevées sans perte importante de pouvoir germinatif. La réalisation de ces enrobages est simple et utilise les techniques classiques de pelliculage en turbine.

ANNEXES

EXPERIMENTATIONS AU CHAMP.

Pour étudier le comportement des souches en symbiose dans des conditions se rapprochant des conditions réelles de culture, des expérimentations au champ ont été réalisées durant deux années consécutives.

L'expérimentation de 1985 a pour but de comparer les performances de plusieurs souches de Bradyrhizobium japonicum apportées soit sous forme de cultures liquides, soit sous forme d'inoculums déshydratés. La variété Effi du groupe 00 obtenue par Tourneur a été utilisée pour cette étude, la variété Mapple arrow a servi de témoin.

I. - MODE D'IMPLANTATION.

Les essais ont été réalisés en trois lieux : Coulommiers, Pouy-Roquelaure, et Villeneuve d'Ascq.

Les semis ont été effectués à la main, en parcelles de 3 lignées de 5 mètres (50 cm d'écartement) à raison de 450 graines environ, ce qui correspond à un peuplement de 600 000 pieds/ha.

Les dates des semis sur les trois sites sont respectivement : 24, 25, 26 Avril ; 24, 25, 26 Avril ; 4 Mai 85.

II. - PRODUCTION DES INOCULATS.

Les inoculats liquides sont constitués de 10 ml de culture en fin de phase exponentielle (environ 10^9 bactéries/ml).

Les inoculats déshydratés sont produits comme suit : 2 l de culture sont centrifugés. Le culot cellulaire est repris dans 200 ml de lait écrémé à 100g/l de matière sèche additionné de 2g de saccharose. Le concentré cellulaire est ensuite atomisé. Les inoculats destinés aux parcelles ont été produits entre le 12 Mars et le 10 Avril 1985, et conservés à 4°C sous vide partiel jusqu'à l'expédition.

Le tableau LV indique le nombre de bactéries revivifiables déterminé lors de la dernière numération effectuée. Ces valeurs doivent être prises à titre indicatif. En effet, les semis interviennent après les dates des dénombrements cellulaires, et la perte de viabilité peut



Tableau LV
 Nombre de Bradyrhizobium japonicum survivant dans les inoculats
 déterminé par numération (c.f.u.).

Souches	Date de production	Numération initiale bactéries/g MS	Date dernière numération	Numération finale des Rhizobium/ g MS	Inoculum apporté/ parcelle(g)
3.41	10.04.85	$7,5 \cdot 10^9$	10.04.85	$7,5 \cdot 10^9$	1
J5	10.04.85	$9,4 \cdot 10^9$	10.04.85	$9,4 \cdot 10^9$	en mélange 0,5
3.2	09.04.85	$2,6 \cdot 10^{10}$	09.04.85	$2,6 \cdot 10^{10}$	1
3.43	09.04.85	$2,3 \cdot 10^8$	09.04.85	$2,3 \cdot 10^8$	-
3.1	05.04.85	$2,5 \cdot 10^9$	05.04.85	$2,5 \cdot 10^9$	1
J315	03.04.85	$2,3 \cdot 10^9$	03.04.85	$2,3 \cdot 10^9$	en mélange 0,5
3.32	01.04.85	$3,4 \cdot 10^7$	19.04.85	$2 \cdot 10^5$	1
3.15b3	21.03.85	$1 \cdot 10^9$	05.04.85	$7 \cdot 10^7$	1
3.30	20.03.85	$3,2 \cdot 10^{10}$	05.04.85 20.05.85	$1,8 \cdot 10^9$ $1,1 \cdot 10^8$	1
3.28	20.03.85	ND	05.04.85	ND	1
3.15	18.03.85	$\sim 10^{12}$	22.03.85 05.04.85	$5 \cdot 10^9$ $5 \cdot 10^8$	1
T83005	15.03.85	$6,4 \cdot 10^9$	29.03.85	$7,5 \cdot 10^6$	1
3.55	12.03.85	$1,4 \cdot 10^{10}$	27.03.85	$3 \cdot 10^8$	1
CB1809	14.12.84	$2,1 \cdot 10^9$	12.02.85 22.03.85	$6 \cdot 10^7$ $3 \cdot 10^5$	en mélange
CB1809	14.12.84	ND	12.02.85 22.03.85	$1 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^6$	en mélange

Tableau LVI

Villeneuve d'Ascq : semis du 04/05/1985 ; liste des inoculations effectuées.

N° essais	Souche	
1	3.1	Liq EFFI
2	3.2	Liq EFFI
3	3.15	Liq EFFI
4	3.15 b3	Liq EFFI
5	3.28	Liq EFFI
6	3.30	Liq EFFI
7	3.32	Liq EFFI
8	3.41	Liq EFFI
9	3.55	Liq EFFI
10	3.4.3	Liq EFFI
11	3.1	Poudre EFFI
12	3.2	Poudre EFFI
13	3.15	Poudre EFFI
14	3.15 b3	Poudre EFFI
15	3.28	Poudre EFFI
16	3.30	Poudre EFFI
17	3.32	Poudre EFFI
18	3.41	Poudre EFFI
19	3.55	Poudre EFFI
20	T83005	Poudre EFFI
21	Mel 1	Liquide EFFI
22	Mel 2	Liquide EFFI
23	Mel 3	Liquide EFFI
24	Mel 1	Poudre EFFI
25	Mel 2	Poudre EFFI
26	Mel 3	Poudre EFFI
27	Mel 1	Liquide Mapple A
28	Mel 2	Liquide Mapple A
29	Mel 3	Liquide Mapple A
30	Mel 1	Poudre Mapple A
31	Mel 2	Poudre Mapple A
32	Mel 3	Poudre Mapple A
33		Bioprox EFFI
34		Lipha EFFI
35		Naninoc.EFFI
36		Bioprox M.A.
37		Lipha M.A.
38		Naninoc. M.A.
Mel 1 : = Inoc 83	T83005 5 ml J5 5 ml J315 5 ml CB1809 5 ml	
Mel 2	3.55 3.2 3.41 3.15	
Mel 3 liq	3.4.3 3.1 3.15 b3 3.30	Mel 3 Poudre 3.15 3.1 3.15 b3 3.30
		Mélanges souches du pourtour du champ. 10 ml de chaque CB 1809 3.15 b3 3.4.3. J5 T83005

Tableau LVII
Analyse de terre effectuée à Villeneuve d'Ascq ; 07/05/1985

pH H ₂ O	5,9
pH KCl.....	5,2
C organique.....	1,09 g C % g terre
Matière organique.....	1,87 %
Azote total Anstet.....	0,116 g N % g terre
Azote ammoniacal.....	0,85 mg NH ₃ % g terre
Azote nitrique.....	1,29 mg NO ₃ % g terre
Calcaire total.....	s. non estimable
Calcaire actif.....	3,7 g CaCO ₃ ‰ g de terr
Phosphore fraction acide.....	0,433 mg P ₂ O ₅ /g de terre
Phosphore fraction basique.....	0,412 mg P ₂ O ₅ /g de terre
Phosphore total.....	0,845 mg P ₂ O ₅ /g de terre
Potassium échangeable.....	16,26 mg K ₂ O % g terre

être importante, suite à l'exposition des poudres à l'oxygène, et à des températures plus élevées.

L'inoculation par les poudres a été effectuée par mise en suspension d'un gramme d'inoculum dans l'eau, et mélange avec les semences.

III. - OBSERVATIONS EFFECTUEES.

A Villeneuve d'Ascq, 10 plantes par parcelle ont été prélevées deux mois après le semis. Certaines observations et mesures ont été effectuées sur ces plantes :

- pourcentage de plantes nodulées.
- nombre moyen de nodules par plante.
- estimation de l'activité nitrogénasique des nodules par mesure de l'A.R.A.

La mesure de l'A.R.A. n'a pas pour but de comparer les souches entre elles, mais de comparer à une même date, inoculum frais et inoculum déshydraté. En effet, l'échantillonnage est réalisé sur une semaine et l'activité nitrogénasique liée au stade de développement de la plante, varie de manière importante sur cette période. Ces observations sont récapitulées dans le tableau LVIII.

D'autres notations ont été effectuées en cours de culture et à la récolte :

- La couleur du feuillage a été appréciée sur les trois lieux.
- La date de chute des feuilles a été notée à Pouy-Roquelaure.
- Enfin, les rendements en grains ont été mesurés à la récolte.

IV. - RESULTATS.

Les diverses observations réalisées à Villeneuve d'Ascq permettent de tirer les conclusions suivantes quant-à la qualité des inoculats produits.

- **nodulation** : les inoculums frais et tourbe induisent tous deux une nodulation abondante. Par contre, les inoculums déshydratés ne permettent une nodulation satisfaisante que dans deux cas (souches 3.2 et 3.30). Dans les autres parcelles, le pourcentage de plantes nodulées

Tableau L VIII
 Résultats des parcelles expérimentales de Villeneuve d'Ascq 1985.

N° parcelle souche	date	nodulation % - nb moyen	A.R.A. μmoles	poids à 14%	rendement estimé	couleur 1/09/85
1 3.1 LIQ.	1/07	100% - 10,4	2,5	2,00 kg	27 qx	vert foncé
11 3.1 SEC.	1/07	80% - 2,0	2,2	1,65 kg	22 qx	vert clair
2 3.2 LIQ.	1/07	100% - 10,2	5,6	2,05 kg	27 qx	vert foncé
12 3.2 SEC.	1/07	100% - 11,0	7,8	2,03 kg	27 qx	vert foncé
3 3.15 LIQ.	1/07	100% - 12,0	5,4	1,76 kg	24 qx	vert foncé
13 3.15 SEC.	1/07	80% - 4,8	3,8	1,81 kg	24 qx	vert clair
4 3.15b3 LIQ.	2/07	100% - 4,8	11,2	1,86 kg	25 qx	vert foncé
14 3.15b3 SEC.	2/07	83% - 5,0	5,2	2,02 kg	27 qx	vert clair
5 3.28 LIQ.	2/07	100% - 21,0	22,2	1,65 kg	22 qx	vert clair
15 3.28 SEC.	2/07	40% - 7,0	3,1	1,59 kg	21 qx	jaunatre
6 3.30 LIQ.	2/07	100% - 13,0	10,0	1,91 kg	26 qx	vert foncé
16 3.30 SEC.	2/07	100% - 4,5	6,5	1,59 kg	21 qx	vert clair
7 3.32 LIQ.	3/07	100% - 18,0	21,5	2,08 kg	28 qx	vert foncé
17 3.32 SEC.	3/07	37% - 2,0	1,9	1,73 kg	23 qx	jaunatre
8 3.41 LIQ.	3/07	100% - 20,0	13,0	1,93 kg	26 qx	vert foncé
18 3.41 SEC.	3/07	25% - 3,0	3,2	1,39 kg	19 qx	jaune
9 3.55 LIQ.	3/07	100% - 4,2	4,3	1,90 kg	25 qx	vert
19 3.55 SEC.	3/07	43% - 1,0	2,2	1,64 kg	22 qx	jaune
10 3.4.3 LIQ.	8/07	100% - 8,3	10,4	2,04 kg	27 qx	vert
20 T83005 SEC.	8/07	0 % - 0,0	0	1,15 kg	15 qx	jaune

Tableau LVIII (suite)

Résultats des parcelles expérimentales de Villeneuve d'Ascq 1985.

N° parcelle souche	date	nodulation % - nb moyen	A.R.A. umoles	pois à 14%	rendement estimé	couleur 1/09/85
variété Effi						
21 MEL.1 LIQ.	8/07	100% - 16,0	19,4	2,10 kg	28 qx	vert foncé
22 MEL.2 LIQ.	8/07	100% - 18,0	17,7	2,10 kg	28 qx	vert foncé
23 MEL.3 LIQ.	8/07	100% - 15,0	20,0	1,95 kg	26 qx	vert foncé
24 MEL.1 SEC.	8/07	22% - 2,5	3,1	1,46 kg	20 qx	jaune
25 MEL.2 SEC.	8/07	89% - 2,0	4,0	1,47 kg	20 qx	jaunatre
26 MEL.3 SEC.	8/07	50% - 2,0	7,8	1,52 kg	20 qx	jaunatre
variété Mapple arrow						
27 MEL.1 LIQ.	9/07	100% - 16,0	17,0	3,07 kg	41 qx	vert foncé
28 MEL.2 LIQ.	9/07	100% - 20,0	16,6	2,99 kg	40 qx	vert foncé
29 MEL.3 LIQ.	9/07	100% - 33,0	13,3	2,75 kg	37 qx	vert foncé
30 MEL.1 SEC.	9/07	67% - 2,0	5,9	1,52 kg	20 qx	vert clair
31 MEL.2 SEC.	9/07	100% - 2,7	5,1	2,09 kg	28 qx	vert
32 MEL.3 SEC.	9/07	100% - 5,7	9,3	2,01 kg	27 qx	vert clair
variété Effi						
33 BIOPROX	11/07	100% - 21,0	19,1	2,17 kg	29 qx	vert foncé
34 LIPHA	11/07	100% - 13,4	19,5	2,22 kg	30 qx	vert foncé
35 NON INOC.	11/07	0% - 0	0	1,30 kg	17 qx	jaune
variété Mapple arrow						
36 BIOPROX	11/07	100% - 23,0	9,7	2,77 kg	37 qx	vert foncé
37 LIPHA	11/07	100% - 25,0	11,6	2,57 kg	34 qx	vert foncé
38 NON INOC.	11/07	0% - 0	0	1,93 kg	26 qx	vert clair

est inférieur à 100% et le nombre moyen de nodules par plante très souvent inférieur à 5, contre une moyenne de 15 à plus de 20 dans le cas des inoculums liquides. Les numérations de contrôle effectuées peu de temps avant expédition révèlent de fait que certains inoculums ont une faible concentration bactérienne, ce qui explique l'échec plus ou moins prononcé de l'inoculation de nombreuses parcelles.

- **activité nitrogénasique** : les mesures d'efficacité effectuées par le test de réduction de l'acétylène, confirment les observations précédentes. Les plantes prélevées dans les parcelles où la nodulation est peu abondante ont une activité nitrogénasique inférieure à celle observée avec le témoin inoculé par une culture liquide de la souche. Les parcelles pour lesquelles les différences sont peu importantes concernent les souches 3.1, 3.2 et 3.30.
- L'observation de la **couleur du feuillage** au début septembre, révèle une carence azotée typique (feuillage vert clair à jaune) dans les parcelles où la nodulation est peu abondante.

A Pouy-Roquelaure (Tableau LIX), les observations de feuillage et de précocité soulignent que les inoculums déshydratés ne permettent pas d'apporter aux plantes les quantités de bactéries suffisantes pour une bonne couverture azotée. La végétation de ces parcelles est dans l'ensemble jaune. Les parcelles inoculées avec les inoculums liquides sont de couleur verte, mais d'un vert moins foncé que les inoculums commerciaux sur tourbe. Des différences de précocité peuvent également être remarquées entre parcelles. Elles pourraient être en rapport direct avec une balance azotée déficitaire pour les parcelles où la chute des feuilles a lieu le plus tôt.

A Coulommiers, la couleur du feuillage, jaune en général, révèle une carence azotée importante. Seuls les inoculums commerciaux sur tourbe, et quelques exceptions donnent une couleur verte au feuillage.

Tableau LIX
Résultats expérimentaux des parcelles de Pouy -Roquelaure.

	Aspect végétation	Jaunissement	Chute feuilles	Poids à 15
Effi N.1	Jaune	17/8	21/8	2,35
Effi Liphe	Vert foncé	16/8	21/8	2,45
Effi Portex Bioprox	Vert foncé	16/8	21/8	3,25
Effi 3.1 sec	Jaune	16/8 -	21/8 -	2,10
Effi 3.2 sec	Jaune	16/8 -	21/8 -	2
Effi 3.15 sec	Jaune	16/8	21/8	2,15
Effi 3.15 b3 sec	Jaune	16/8	21/8	2,35
Effi 3.28 sec	Jaune	14/8	18/8	2,10
Effi 3.30 sec	Jaune	10/8	16/8	1,95
Effi 3.32 sec	Jaune	10/8	16/8	1,65
Effi 3.41 sec	Jaune	10/8	16/8	1,80
Effi 3.55	Jaune	12/8	18/8	2,05
Effi T 83,005 sec	Jaune	11/8	18/8	2
Effi Mélange 1 sec	Jaune	12/8	18/8	2,1
Effi Mélange 2 sec	Jaune	14/8	22/8	2
Effi Mélange 3 sec	Jaune	14/8	21/8	2,05
Effi 3.1 liquide	Vert légt foncé	13/8	20/8	2,25
Effi 3.2 liquide	Vert légt foncé	12/8	18/8	2,15
Effi 3.15 liquide	Vert foncé	13/8	20/8	2,10
Effi 3.15b3 liquide	Vert foncé	13/8	20/5	2,20
Effi 3.28 liquide	Vert légt foncé	12/8	20/8	2,20
Effi 3.30 liquide	Vert légt foncé	14/8	23/8	2,25
Effi 3.32 liquide	Vert foncé	14/8	23/8	2,40
Effi 3.41 liquide	Vert légt foncé	15/8	23/8	1,75
Effi 3.55 liquide	Vert légt foncé	16/8	23/8	1,75
Effi 3.43 liquide	Vert légt foncé	14/8	23/8	1,95
Effi Mélange 1 liq.	Vert légt foncé	13/8	23/8	2,05
Effi Mélange 2 liq.	Vert foncé	15/8	23/8	2,05
Effi Mélange 3 liq.	Vert légt foncé	14/8	23/8	2,20
M.ARROW N.I	Jaune	24/8	29/8	2,25
M.ARROW Liphe	Vert foncé	20/8	26/8	2,80
M.ARROW Portex	Vert foncé	18/8	26/8	2,90



Tableau LX
Résultats expérimentaux des parcelles de Coulommiers.

INOCULATION						
ANNEE : 1985				CODE ESSAI : SAG		
LIEU : COULOMMIERS				PARCELLE : 1509		
INOCULATION	PROV. N°	Date de Semis	Couleur feuille 1=Vert clair 9=Vert foncé	% H ₂ O à la récolte (2/10)	Rdt à 16% q/ha	
M. ARROW Non Inoc.	01	24/4 AM	2	11	8,1	
M. ARROW LIPHA	02	"	7	12	14,3	
M. ARROW BIOPROX	03	"	9	11,5	15,2	
M. ARROW X1	04	"	1	14,7	4,5	
M. ARROW X2	05	"	1	12,7	6,2	
M. ARROW X3	06	"	2	12,7	6,1	
EFFI Non Inoc.	07	25/4 AM	2	11,3	5,8	
EFFI LIPHA	08	24/4 AM	7	13	16,6	
EFFI BIOPROX	09	"	9	10,5	19,9	
EFFI X1	10	"	3	12,7	8,3	
EFFI X2	11	"	4	4,9	9,8	
EFFI X3	12	"	5	12,8	12,8	
EFFI 3-1 P sec	13	24-4 AM	4	10	13,1	
EFFI 3-1 L Frais	14	24-4 PM	6	11,5	15,7	
EFFI 3-2 sec	15	"	5	11	13,1	
EFFI 3-2 Frais	16	25-4 AM	4	10	12,4	
EFFI 3-15 sec	17	"	4	14	10,6	
EFFI 3-15 Frais	18	"	3	11	9,5	
EFFI 3-15b3 sec	19	"	2	14,7	7,1	
EFFI 3-15b3 Frais	20	"	3	12	9,5	
EFFI 3-28 sec	21	"	2	11,7	8,3	
EFFI 3-28 Frais	22	"	2	14	6,5	
EFFI Non Inoc.	23	"	2	14	6,4	
EFFI LIPHA	24	24-4 PM	6	10,5	18,1	
EFFI BIOPROX	25	"	8	10,5	19,9	
EFFI 3-30 sec	26	25-4 AM	1	12	7,3	
EFFI 3-30 Frais	27	"	1	12	9,5	
EFFI 3-32 sec	28	"	1	11,3	8,6	
EFFI 3-32 Frais	29	"	2	10,7	7,9	
EFFI 3-41 sec	30	"	1	14,7	6,6	
EFFI 3-41 Frais	31	"	3	12,7	13,8	
EFFI 3-55 sec	32	"	3	13,4	9,5	
EFFI 3-55 Frais	33	"	3	11	11,6	
EFFI T83005 sec	34	"	4	14,7	9,1	
EFFI 3-4-3 Frais	35	"	5	12,5	13,2	
EFFI Non Inoc	36	24-4 PM	3	11,3	9,6	
EFFI LIPHA	37	"	6	12,5	20,0	
EFFI BIOPROX	38	"	9	14	21,7	
EFFI X1 Frais	39	26-4	9	7,5	13,8	
EFFI X2 Frais	40	"	3	12	14,6	
EFFI X3 Frais	41	"	6	11,5	13,3	
moyenne Non Inoc			2,25	11,9	7,5	
moyenne Temoins			7,6	11,8	18,2	
(LIPHA + Bio Prox) 2						



- En termes de **rendements**, les conclusions sont identiques (Tableau LXbis).

A Villeneuve d'Ascq, les rendements les plus faibles ont été obtenus dans le cas des parcelles faiblement nodulées. Ainsi des écarts extrêmes de 15 à 30 qx/ha ont été observés, avec la variété Effi. La variété Mapple arrow fournit des rendements en graines plus importants compris entre 26 qx/ha pour le témoin non inoculé et 41 qx/ha. L'observation des rendements en graines des parcelles inoculées par les cultures liquides de forte concentration bactérienne montre que les souches ayant une forte activité nitrogénasique in vitro, présentent également aux champs des performances intéressantes. Les souches 3.32, 3.2, 3.1, et 3.4.3 donnent les rendements les plus élevés.

A Pouy, la récolte des graines ne met pas en évidence d'écarts importants entre les variétés. L'inoculum tourbe Bioprox fournit de très bons rendements. Les plus faibles rendements correspondent, pour les inoculums déshydratés, à ceux où la population bactérienne est faible. Les inoculums liquides ne permettent pas des rendements en moyenne supérieurs à ceux observés avec les poudres atomisées, contrairement au cas de Villeneuve d'Ascq. Ceci pourrait témoigner d'une mauvaise survie des bactéries en culture liquide, au cours du transport et du temps de stockage précédant le semis et pourrait expliquer la couleur vert clair des parcelles.

A Coulommiers, les rendements de la quasi totalité des parcelles sont faibles et en moyenne inférieurs à ceux observés sur les deux autres lieux. Les inoculums commerciaux sur tourbe, donnent les meilleurs rendements. Quelques parcelles inoculées avec des inoculums liquides ont des rendements supérieurs à la moyenne. Ces résultats témoignent vraisemblablement d'une mauvaise nodulation dans les parcelles inoculées avec les cultures liquides et les poudres atomisées qui pourrait comme dans le cas précédent provenir d'une concentration bactérienne trop faible dans les inoculats.

Tableau LXbis

Rendements observés à 14%, sur les parcelles expérimentales des trois stations.

N° parcelle souche	rendement estimé Pouy-Roquelaure	rendement estimé Coulommiers	rendement estimé Villeneuve d'Ascq
1 3.1 LIQ.	30 qx/ha	16 qx/ha	27 qx/ha
11 3.1 SEC.	28 qx/ha	13 qx/ha	22 qx/ha
2 3.2 LIQ.	29 qx/ha	12 qx/ha	27 qx/ha
12 3.2 SEC.	27 qx/ha	13 qx/ha	27 qx/ha
3 3.15 LIQ.	28 qx/ha	9 qx/ha	24 qx/ha
13 3.15 SEC.	29 qx/ha	11 qx/ha	24 qx/ha
4 3.15b3 LIQ.	29 qx/ha	9 qx/ha	25 qx/ha
14 3.15b3 SEC.	31 qx/ha	7 qx/ha	27 qx/ha
5 3.28 LIQ.	29 qx/ha	7 qx/ha	22 qx/ha
15 3.28 SEC.	28 qx/ha	8 qx/ha	21 qx/ha
6 3.30 LIQ.	30 qx/ha	9 qx/ha	26 qx/ha
16 3.30 SEC.	26 qx/ha	7 qx/ha	21 qx/ha
7 3.32 LIQ.	32 qx/ha	8 qx/ha	28 qx/ha
17 3.32 SEC.	22 qx/ha	9 qx/ha	23 qx/ha
8 3.41 LIQ.	23 qx/ha	13 qx/ha	26 qx/ha
18 3.41 SEC.	24 qx/ha	7 qx/ha	19 qx/ha
9 3.55 LIQ.	23 qx/ha	12 qx/ha	25 qx/ha
19 3.55 SEC.	27 qx/ha	9 qx/ha	22 qx/ha
10 3.4.3 LIQ.	26 qx/ha	13 qx/ha	27 qx/ha
20 T83005 SEC.	27 qx/ha	9 qx/ha	15 qx/ha



Tableau LXbis (suite)

Rendements observés à 14%, sur les parcelles expérimentales des trois stations.

N° parcelle souche	rendement estimé Pouy-Roquelaure	rendement estimé Coulommiers	rendement estimé Villeneuve d'Ascq
variété Effi			
21 MEL 1 LIQ.	27 qx/ha	14 qx/ha	28 qx/ha
22 MEL 2 LIQ.	27 qx/ha	15 qx/ha	28 qx/ha
23 MEL 3 LIQ.	29 qx/ha	13 qx/ha	26 qx/ha
24 MEL 1 SEC.	28 qx/ha	8 qx/ha	20 qx/ha
25 MEL 2 SEC	27 qx/ha	10 qx/ha	20 qx/ha
26 MEL 3 SEC	27 qx/ha	13 qx/ha	20 qx/ha
variété Mapple arrow			
27 MEL 1 LIQ.	ND	ND	41 qx/ha
28 MEL 2 LIQ.	ND	ND	40 qx/ha
29 MEL 3 LIQ.	ND	ND	37 qx/ha
30 MEL 1 SEC	ND	5 qx/ha	20 qx/ha
31 MEL 2 SEC	ND	6 qx/ha	28 qx/ha
32 MEL 3 SEC	ND	6 qx/ha	27 qx/ha
variété Effi			
33 BIOPROX	43 qx/ha	21 qx/ha	29 qx/ha
34 LIPHA	33 qx/ha	18 qx/ha	30 qx/ha
35 NON INOC.	31 qx/ha	7 qx/ha	17 qx/ha
variété Mapple arrow			
36 BIOPROX	39 qx/ha	15 qx/ha	37 qx/ha
37 LIPHA	37 qx/ha	14 qx/ha	34 qx/ha
38 NON INOC.	30 qx/ha	8 qx/ha	26 qx/ha

Il n'est pas possible de comparer entre elles les performances des souches sur les trois sites. Les problèmes de survie rencontrés aussi bien dans les inoculums liquides à Pouy et à Coulommiers que dans les inoculums déshydratés fausseraient complètement toute interprétation des résultats. Il semble important d'étudier les paramètres qui favoriseraient la survie des Rhizobiums dans les inoculums déshydratés. De même, les témoins liquides ne sont pas appropriés étant donné que la mortalité est élevée lorsque les cultures ne sont plus agitées.

On peut cependant noter les performances intéressantes des souches 3.1, 3.2, 3.32 et 3.15b3.

EXPERIMENTATION AU CHAMP 1986

Au regard des résultats de 1985 et des différences marquées entre les performances des inoculats déshydratés et apportés sur tourbe, nous avons jugé intéressant de comparer d'un point de vue qualitatif ces deux types d'inoculum en employant trois souches du laboratoire et deux témoins commerciaux (souches isolées des inoculums Bioprox et Lipha).

I. PRODUCTION DES INOCULUMS.

1 / INOCULUMS SUR TOURBE.

Ils ont été réalisés début avril, sur tourbe pulvérisée issue d'une dose d'inoculum commercial. Après répartition, par quantité de vingt grammes environ, en flacon de 125 ml, stérilisation 2 x 30 min, ces échantillons sontensemencés par 2 ml de culture en phase exponentielle des souches désirées. Après incubation à 29°C pendant 15 jours, les inoculats sont conservés à température ambiante jusqu'à l'emploi. C'est à ce moment que l'on effectue un contrôle sur la pureté et la densité de la population bactérienne.

2 / INOCULUMS DESHYDRATES.

Ils sont produits comme suit : 2 l de culture en phase exponentielle des souches sont centrifugés, puis repris dans 100 ml de milieu TY additionné de lait écrémé à 10% (w/v). Ces suspensions sont ensuite déshydratées dans un atomiseur puis stockées sous azote à 4°C, à une humidité relative proche de 0 par addition de silicagel dans l'emballage de conservation.

II. IMPLANTATION DES PARCELLES.

A Villeneuve d'Ascq, les essais ont dû être réalisés à deux reprises :

- le premier essai a été effectué le 7 Mai ; mais la nature très argileuse du sol et les fortes pluies consécutives au semis, ont été responsables de la formation d'une croûte de battance. Cette dernière liée à une préparation grossière du sol a fortement inhibé la germination des graines (10% en moyenne, de 7 à 24%) ;

- l'essai a été recommencé le 11 Juin 86. Il est à noter que la proximité immédiate d'un massif d'arbres et l'exiguïté du terrain mis à notre disposition, ont été responsables d'une diminution de la vigueur et d'un léger étiollement des plantes des parcelles de bordure, ce qui a favorisé la verse de certaines parcelles (1 et 3) à la fin Août.

Les traitements appliqués à chaque parcelle, ainsi que les résultats des contrôles effectués sur les inoculats figurent dans le tableau LXI.

III. NOTATIONS EFFECTUEES.

Conformément au programme préalablement établi, les notations relatives aux caractères suivants ont été effectuées :

- **pourcentage de germination** au stade deux feuilles trifoliées ; notation de 1 à 9 ;
- **vigueur** au stade jeune : échelle de 1 à 9 ;
- **nodulation** : pourcentage de plantes nodulées, localisation et nombre de nodules ; notation de 1 à 9 ;
- **couleur du feuillage** : mi-août, échelle de 1 à 9 ;
- **précocité** : à la floraison, en cours et en fin de végétation ; notations effectuées d'après la nomenclature américaine sur échantillons de 10 plantes à chaque passage ;
- **récolte** : la récolte et l'écossage ont été faits manuellement pour l'essai n°1. Etant donné le faible peuplement des parcelles, nous n'avons enregistré que le poids des mille grains et l'humidité à la récolte. La maturité tardive et les conditions climatiques de fin octobre début novembre n'ont pas permis d'assurer la récolte des parcelles du deuxième essai.

L'ensemble de ces données est résumé dans le tableau LXII pour l'essai n°1, LXIII pour l'essai n°2, LXIV pour l'essai de Coulommiers.

Tableau LXI
Désignation des parcelles et population bactérienne dans les inoculats.

N°	Variété	Inoculum	
1	Mapple Arrow	Bioprox	Tourbe
2	Mapple Arrow	Bioprox	Atomisé
3	Mapple Arrow	Lipha	Tourbe
4	Mapple Arrow	Lipha	Atomisé
5	Mapple Arrow	3.2	Tourbe
6	Mapple Arrow	3.2	Atomisé
7	Mapple Arrow	3.4.3	Tourbe
8	Mapple Arrow	3.4.3	Atomisé
9	Mapple Arrow	3.32	Tourbe
10	Mapple Arrow	3.32	Atomisé
11	Mapple Arrow	Non	inoculé

Tableau - Population bactérienne dans les inocula

N°inoculum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
log Nb de Rhizobium/g										
5 mai	> 9	10,8	> 9	9,0	> 9	11,5	> 9	9,9	> 9	10,0
18 juin	ND	10,8	ND	8,7	ND	11,4	ND	9,5	ND	9,7

Tableau LXII
 Résultats expérimentaux de l'essai n°1 réalisé à Villeneuve d'Ascq.

Parcelle	% levée	Couleur:04/08	Date stade R3	Virage stade R7	Chute feuilles stade R8	Humidité Récolte	Poids à 14 % 1000 graines
1	16	9/9	23/07	05/09	19/09	15,5 %	196
2	16	8/9	23/07	05/09	19/09	10,0 %	195
3	8	8/9	21/07	09/09	24/09	16,0 %	206
4	8	5/9	21/07	12/09	24/09	9,9 %	191
5	9	7/9	23/07	05/09	19/09	10,0 %	188
6	24	8/9	21/07	05/09	19/09	10,0 %	191
7	16	8/9	23/07	12/09	24/09	10,0 %	172
8	7,5	8/9	23/07	12/09	24/09	10,8 %	181
9	11	9/9	23/07	09/09	24/09	10,0 %	194
10	9	9/9	21/07	05/09	19/09	11,0 %	195
11	10	5/9	21/07	05/09	19/09	9,0 %	169

Tableau LXIII
Résultats expérimentaux de l'essai n°2 réalisé à Villeneuve d'Ascq.

N° parcelle	Stade 2 F. trifoliées 26/06		Nodulation		Date d'apparition des stades :										Notation couleur 15/08
	% levée	vigueur	% plantes nodulées Nb nodules localisation	Note	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Jau- nisse- ment	Chute des feuilles		
1	87	4	100 % > 20 collet	9	06/08	12/08	14/08	22/08	25/08 verse	06/10	17/10	17/10			8
2	91	6	70 % < 5 collet	6	04/08	08/08	12/08	18/08	22/08	06/10	06/10	06/10	13/10		7
3	90	7	100 % 20 collet	9	04/08	12/08	14/08	22/08	25/08	06/10	13/10	13/10			9
4	90	9	50 % 5 R.I.	5	04/08	08/08	12/08	18/08	22/08	06/10	09/10	06/10	13/10		7
5	93	9	75 % 5-10 collet	7	01/08	04/08	08/08	12/08	18/08	18/09	06/10	06/10	09/10		7
6	93	6	100 % 5-10 collet	8	01/08	04/08	08/08	14/08	18/08	18/09	06/10	06/10	13/10		8
7	94	4	100 % 10 collet	8	06/08	06/08	12/08	18/08	22/08	06/10	06/10	26/09	09/10		5
8	90	7	70 % < 5 collet-R.I.	6	01/08	04/08	12/08	18/08	22/08	26/09	06/10	26/09	09/10		6
9	90	9	80 % ≈ 10 collet	7	04/08	08/08	12/08	22/08	25/08	06/10	09/10	09/10	23/10		9
10	88	9	70 % 5 collet	6	01/08	06/08	12/08	18/08	22/08	26/09	09/10	26/09	09/10		7
11	93	8	5 % 1	1	04/08	08/08	08/08	18/08	22/08	18/09	06/10	26/09	06/10		6

Tableau LXIV

Résultats expérimentaux des parcelles de Coulommiers : 1986.

Code Essai : SAG 953

Année 1986

Lieu : COULOMMIERS

Surface parcellaire : 7,5 m²

INOCULATION SUR MAPPLE ARROW

≠ sautes juvénance de Lille

N°	NOMS	DENSITE	Nbre de nodules \bar{x}/plte		Jaunisst des feuilles 1/9	Rdt sec/ Parcelle g	%T : n°4 LIPHA TOURBE 24,6Qx/ha
			PETITS	GROS			
1	3-2 TOURBE	45	10,2	3,1	1	1785	97
2	3-3-2 TOURBE	54	11,4	7,9	1	1947	105
3	3-4-3 TOURBE	43	7,1	3,1	3	1647	89
4	LIPHA TOURBE	39	13,2	6,2	1	1845	100
5	BIOPROX TOURBE	44	11,8	2,5	2	1764	96
6	TEMOIN N.I.	38	0,2	0	4	1479	80
7	3-2 SEC	37	2,1	1,4	3	1616	88
8	3-3-2 SEC	49	2,3	1,2	4	1410	76
9	3-4-3 SEC	36	3,4	0,4	4	1308	71
10	LIPHA SEC	33	5,2	0,5	4	1418	77
11	BIOPROX SEC	35	3,4	1,2	4	1468	80

IV. RESULTATS - DISCUSSION.

1 / DENSITE.

Essai 1.

La levée des semences a été très hétérogène à l'intérieur des parcelles et le taux de germination très faible de 7 à 24%.

Essai 2.

Levée régulière avec fort taux de germination, de 130 à 143 plantes/rang sur 150 théoriquement semées, ce qui correspond à une densité de 26 à 29 plantes/mètre linéaire.

Coulommiers

densité au mètre linéaire élevée.

2 / VIGUEUR.

Essai 1.

Plantes germées très vigoureuses, pas de différence observable entre parcelles.

Essai 2.

Vigueur moindre pour les parcelles 1, 6, 7, 11 au stade deux feuilles trifoliées, ce qui pourrait correspondre à leur position en bordure de champ. Ces différences de vigueur se sont estompées en cours de végétation.

3 / NODULATION.

La nodulation a été contrôlée sur quelques plantes (<5) pour l'essai 1 et sur 12 plantes pour l'essai 2.

Essai 1.

Nodulation importante, localisée au collet mais nombre de plantes observables trop faible pour tirer des conclusions.

- Influence du type d'inoculum.

Essai 2.

- * Inoculum sur tourbe : parcelles 1, 3, 5, 7 et 9
 - nodulation au collet
 - fort pourcentage de plantes nodulées (>90%)
 - nombre de nodules élevé : >20 pour les parcelles 1, 3 et 9 ; entre 5 et 10 pour les parcelles 5 et 7
- * Inoculum déshydraté : parcelles 2, 4, 6, 8 et 10
 - nodulation au collet
 - pourcentage de plantes nodulées plus faible : en moyenne 75% (de 50 à 100%)
 - nombre de nodules par plante : entre 5 et 10

Coulommiers.

- * Inoculum sur tourbe :
 - nombre de nodules par plante : entre 10 et 20
- * Inoculum déshydraté :
 - nombre de nodules plus faible : <5

- Différences entre souches.

Les expérimentations sur cultures aseptiques de plantules réalisées au préalable, ont mis en évidence deux phénotypes distincts parmi les souches de la collection :

- les souches 3.2 et 3.4.3 sont caractérisées, entre autre, par :
 - une différenciation lente des nodules sur plantules (3 semaines)
 - un nombre faible des nodules (environ 5) et une efficacité élevée
 - une production d'exopolysaccharides faible
- les souches Lipha, Bioprox et 3.32 sont caractérisées par :
 - une formation rapide des nodules sur plantules (8 jours)
 - un nombre élevé de nodules et une forte efficacité
 - une abondante production d'exopolysaccharides

Ces observations pourraient avoir comme origine l'appartenance de ces deux types de souches à deux types symbiotiques divergents de Rhizobium japonicum (166bis) à savoir divergence d'organisation génomique de gènes connus (nif, nod), de voies de métabolisme.

* Au champ, les différences entre souches relatives à l'abondance de la nodulation sont confirmées.

* D'autre part, le mode d'inoculation joue un rôle important pour les souches 3.32, Bioprox et Lipha. Malgré des populations élevées de 10^9 à 10^{11} bactéries par gramme, une nodulation de moindre abondance a été constatée pour les inoculats déshydratés sur les deux stations. Pour les souches 3.2 et 3.4.3, la nodulation n'est pas affectée par le mode d'inoculation à Villeneuve d'Ascq. Elle est moins abondante pour les inoculums déshydratés à Coulommiers.

4 / COULEUR

Essai 2

Les parcelles inoculées avec l'inoculum tourbe sont d'un vert plus soutenu que celles inoculées avec l'inoculum déshydraté pour les souches Bioprox, Lipha et 3.32 ; pour les souches 3.2 et 3.4.3 on n'observe pas de contraste entre parcelles.

5 / PRECOCITE

Essai 1

Les plantes étant très clairsemées, il est difficile d'observer les écarts de précocité entre parcelles (Tableau LXII)

- pas d'écarts importants entre les deux modes d'inoculation.
- légers décalages entre parcelles inoculées avec des souches différentes.

Essai 2

Les décalages observés portent sur quelques jours en cours de végétation et s'allongent jusqu'à 10 jours en fin de végétation (Tableau LXIII). L'augmentation des écarts doit en partie être imputée à la verse partielle ou totale des parcelles 1, 3 et 9, consécutive à de fortes pluies.

- souches 3.2 et 3.4.3 : pas d'écarts de précocité entre les deux modes d'inoculation.
- souches 3.32, Bioprox et Lipha : les parcelles inoculées avec les inoculats déshydratés ont un gain de précocité de 3 à 4 jours en cours de végétation (stades R3, R4). Les écarts restent sensiblement identiques au stade R7 (sauf parcelles versées) et pourraient être imputés à une balance azotée légèrement différente entre les deux modes d'inoculation (nodulation plus ou moins abondante).

Coulommiers

Comme à Villeneuve d'Ascq, le jaunissement des feuilles intervient plus tôt sur les parcelles inoculées avec les inoculums déshydratés (balance azotée légèrement déficitaire).

6 / RECOLTE

La récolte d'échantillons dans les parcelles de l'essai 1 nous a permis de mettre en évidence un poids de mille grains :

- supérieur au témoin dans tous les cas, et variable entre souches,
- pour les souches Bioprox , Lipha et 3.32, un poids des mille grains meilleur dans le cas des inoculations par la tourbe,
- pour les souches 3.2 et 3.4.3, les poids des mille grains les plus élevés dans le cas des inoculations par les poudres atomisées.

A Coulommiers, la récolte des graines met en évidence des différences de rendement importantes entre les deux modes d'inoculation particulièrement pour les souches 3.32 et Lipha. L'inoculation par les tourbes permet les rendements les plus élevés.



CONCLUSION

Les expérimentations de 1986 nous ont permis de confirmer les performances intéressantes des souches 3.32 et 3.2 cultivées sur tourbe en comparaison avec les souches utilisées dans les inoculums commerciaux.

En outre, l'incidence de l'emploi d'inoculums déshydratés sur l'infectivité des souches est manifeste ; la nodulation est moins abondante malgré des populations très élevées dans les inoculums. Ce phénomène est très marqué pour les souches telles que la souche 3.32 qui est très sensible à la déshydratation. A ce sujet la mise en suspension dans l'eau pour l'inoculation se révèle peut être néfaste à la survie dans le sol des bactéries déshydratées et ils serait peut être souhaitable d'appliquer la poudre directement dans le rang de semis.

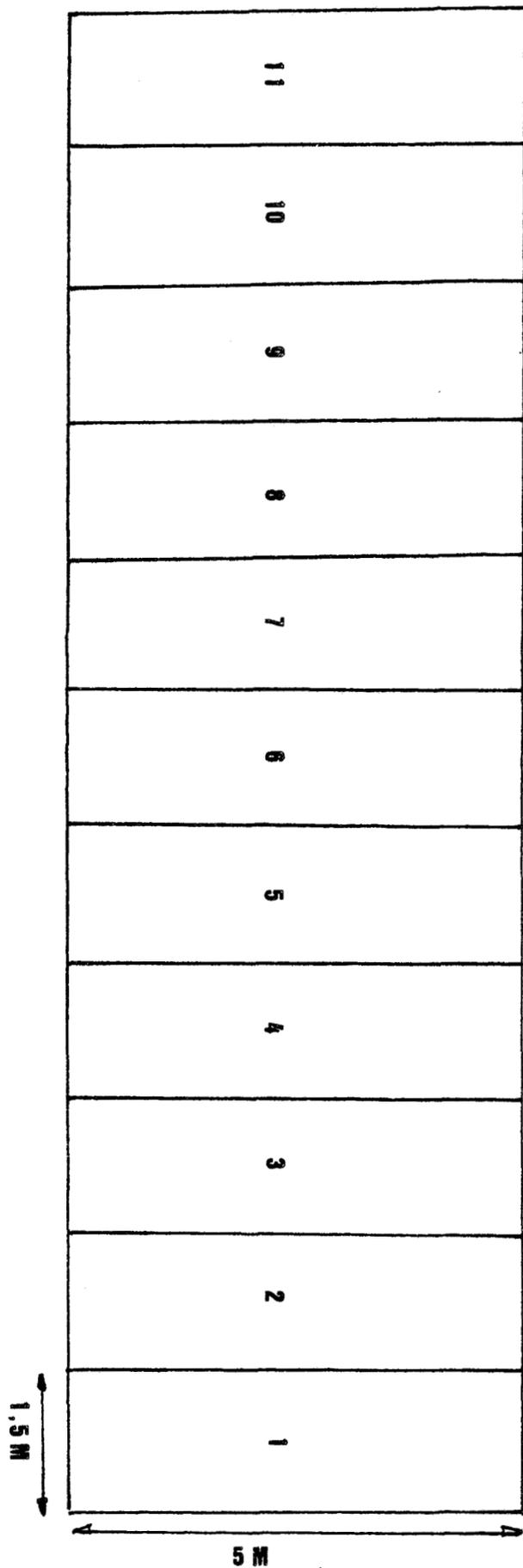
Trois facteurs peuvent être déterminants pour expliquer ce phénomène :

- le fait que les bactéries soient adsorbées sur la tourbe ce qui favorise la formation de pili ;
- la déshydratation qui met en oeuvre des adaptations métaboliques néfastes à l'infectivité des cellules comme il est suggéré par Streeter (170).
- une forte mortalité consécutive à la réhydratation des cellules déshydratées par atomisation à partir d'une phase liquide.

Nos travaux ultérieurs de bactérisation par enrobage ont montré l'incidence déterminante de la tourbe sur la survie des bactéries déshydratées notamment dès que l'humidité relative de conservation dépasse 43%. Dans ce cas, pour un même adhésif, les cellules déshydratées sans support solide meurent très rapidement, alors que les Rhizobiums cultivés sur tourbe survivent sur de plus longues périodes. Il serait très intéressant de poursuivre dans ce sens, l'emploi d'inoculums déshydratés présentant de nombreux avantages : le maintien de la stérilité n'y est pas nécessaire et les bactéries déshydratées sont à même de survivre à une exposition à des températures élevées sur de courtes périodes alors que la mortalité est totale dans les inoculums tourbe hydratés dès qu'une température de 40°C est atteinte. A cette fin, il est indispensable d'étudier les mécanismes qui aboutissent à la perte d'infectivité des cellules dans les inoculums déshydratés par atomisation.

VILLENEUVE D'ASCQ : ESSAI N°1

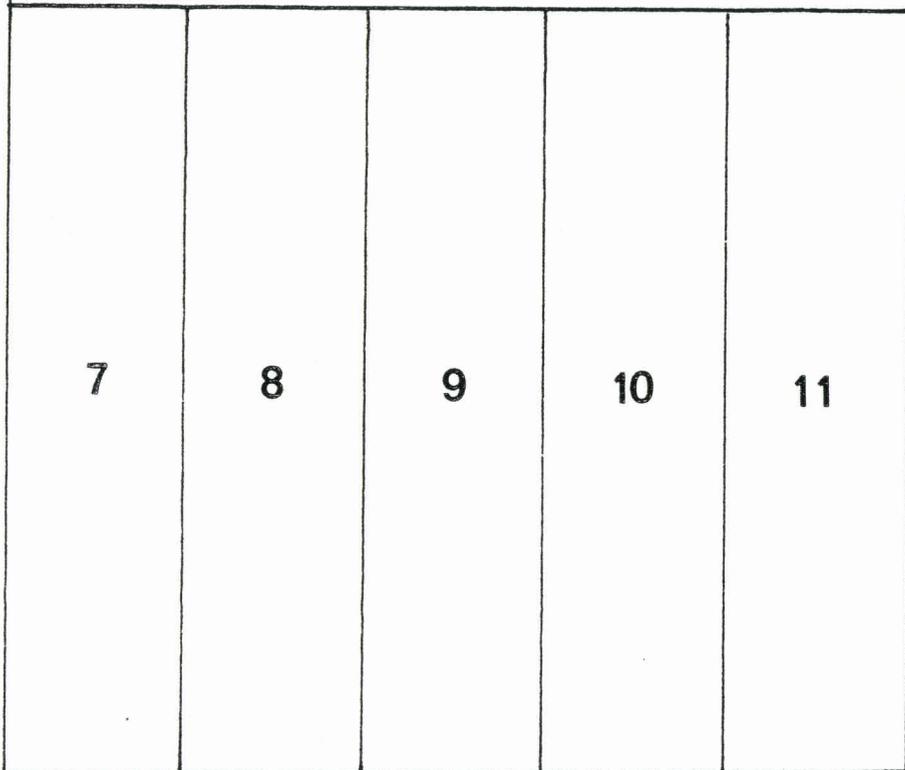
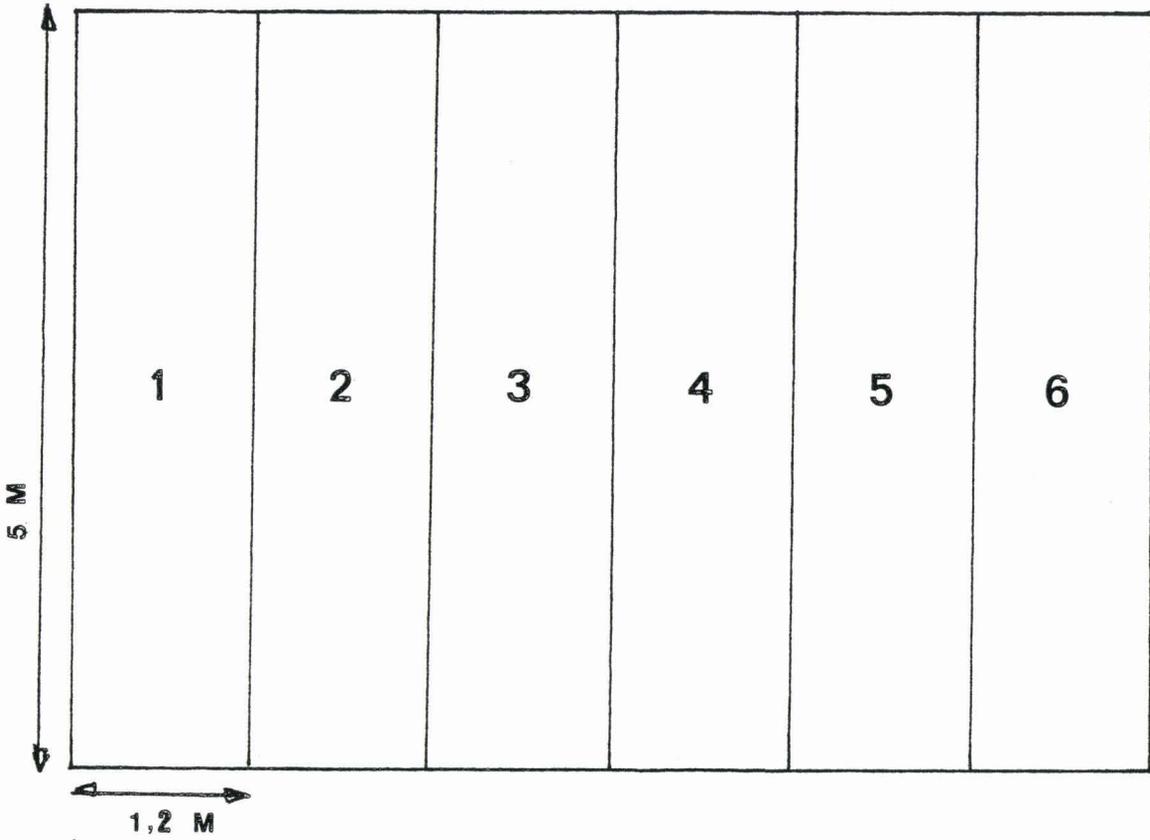
SEMIS : 7 MAI 1986



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
19/07	R1	R1	R2	R2	R2	R2	R1	R2	R1	R2	R2
21/07	V9 R2	V9 R2	V8 R3	V8 R3	V9 R2	V9 R3	V8 R2	V8 R2	V8 R2	V7 R3	V7 R3
23/07	R3	R3	R4	R4	R3						
26/07	V10 R3	V9 R4	V9 R4	V9 R4	V10 R4	V9 R3	V10 R3	V9 R4	V9 R3	V9 R3	V9 R4
30/07	R4	R5	R5	R5	R4	R4	R4	R5	R4	R4	R5
04/08	V10 R5	V11 R4	V10 R5	V11 R5	V10 R5	V10 R5					
08/08	R5	R5	R6	R5							
12/08	R5	R6	R6	R5	R6	R6	R5	R5	R5	R5	R6
25/08	R6										
05/09	R7	R7	R6	R6	R7	R7	R6	R6	R6	R7	R7
09/09	R7	R7	R7	R6	R7	R7	R6	R6	R7	R7	R7
12/09	R7										
19/09	R8	R8	R7	R7	R8	R8	R7	R7	R7	R8	R8
24/09	R8										



VILLENEUVE D'ASCQ : ESSAI N°2
SEMIS : 11 JUIN 1986



MASSIF D' ARBRES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11											
25/07	V3	V4	V5	V4	V4	V3	V3	V4	V5	V5	V4											
28/07	V4	V4	V5	V4	V5	V4	V3	V5	V5	V5	V5											
30/07	V5	V5	V5	V5	V5	V4	V4	V5	V5	V6	V6											
01/08	V5	V5	V6	V5	V6	R1	V5	R1	V5	V6	R1	V6										
04/08	V6	V6	R1	V7	R1	V6	R1	V6	R2	V5	R2	V5	V6	R2	V6	R1	V7	R1	V6	R1		
06/08	V6	R1	V6	R1	V7	R1	V6	R1	V6	R2	V5	R2	V5	R2	V6	R2	V6	R1	V7	R2	V7	R1
08/08	V6	R1	V6	R2	V7	R1	V6	R2	V6	R3	V6	R3	V5	R2	V6	R2	V6	R2	V7	R2	V7	R3
12/08	V7	R2	V7	R3	V7	R2	V7	R3	V6	R4	V6	R3	V6	R3	V7	R3	V7	R3	V8	R3	V7	R3
14/08	V7	R3	V7	R3	V8	R3	V7	R3	V7	R4	V6	R4	V6	R3	V7	R3	V7	R3	V8	R3	V7	R3
18/08		R3	R4	R3	R4	R5	R5	R4	R4	R3	R4	R4	R3	R4	R4	R3	R4	R4	R3	R4	R4	R4
22/08		R4	R5	R4	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R4	R5	R5	R4	R5	R5	R5
25/08		R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5
02/09		R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5
18/09	V9	R5	V9	R5	V10	R5	V9	R5	V8	R6	V8	R6	V8	R5	V9	R5	V10	R5	V9	R5	V9	R6
26/09	V9	R5	V11	R5	V10	R5	V11	R5	V8	R6	V9	R6	V9	R5	V10	R6	V10	R5	V10	R6	V10	R6
06/10		R6	R7	R6	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R6	R6	R6	R6	R6	R6	R7
09/10		R6	R7	R6	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R7	R8
13/10		R7	R7	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R8	R8	R8	R7	R8	R7	R8	R8	R8	R8
17/10		R7	R8	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R8	R8	R8	R7	R8	R7	R8	R8	R8	R8
23/10		R7	R7	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R7	R8	R8	R8	R8	R8	R7	R8	R7	R8	R8	R8	R8

Annexe 2 (suite) - Relevé de parcelles - Essai n°2



ANNEXES

CALCUL STATISTIQUE.

REALISATION DES CALCULS RELATIFS A L'ANALYSE DE LA VARIANCE A UN CRITERE DE CLASSIFICATION.

— Analyse de la variance à un critère de classification : réalisation des calculs dans le cas d'échantillons d'effectifs inégaux.

1° Les calculs peuvent être réalisés conformément au tableau ci-dessous, en utilisant les notations et les formules suivantes :

pour l'effectif total : $n_{..} = \sum_{i=1}^p n_i$,

pour les totaux par échantillon : $X_{i.} = \sum_{k=1}^p x_{ik}$ (pour tout i),

pour le total général : $X_{..} = \sum_{i=1}^p X_{i.}$ (*),

pour la somme des carrés générale : $T = \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^p x_{ik}^2$,

pour les sommes des carrés des écarts par échantillon :

$$SCE_i = \sum_{k=1}^p x_{ik}^2 - X_{i.}^2/n_i \text{ (pour tout } i),$$

pour la somme des carrés des écarts résiduelle : $SCE_r = \sum_{i=1}^p SCE_i$,

pour les variances estimées : $\hat{\sigma}_i^2 = SCE_i/(n_i - 1)$ (pour tout i),

et pour les moyennes estimées :

$$\bar{x}_i = X_{i.}/n_i \text{ (pour tout } i) \text{ et } \bar{x} = X_{..}/n_{..}$$

(*) Les quantités $X_{i.}$ et $X_{..}$ sont donc des sommes de valeurs observées et non des variables aléatoires. De même, T et C sont la somme des carrés des valeurs observées et un terme correctif, et non des variables aléatoires.

k \ i	1	2	...	p	TOTAUX
1	x_{11}	x_{21}	...	x_{p1}	}
2	x_{12}	x_{22}	...	x_{p2}	
⋮	⋮	⋮		⋮	
	x_{1n_i}	x_{2n_i}		x_{pn_i}	
n_i	n_1	n_2	...	n_p	$n_{..}$
$X_{i.}$	$X_{1.}$	$X_{2.}$...	$X_{p.}$	$X_{..}$
$\sum_{k=1}^p x_{ik}^2$	$\sum_{k=1}^p x_{1k}^2$	$\sum_{k=1}^p x_{2k}^2$...	$\sum_{k=1}^p x_{pk}^2$	T
$X_{i.}^2/n_i$	$X_{1.}^2/n_1$	$X_{2.}^2/n_2$...	$X_{p.}^2/n_p$	—
SCE_i	SCE_1	SCE_2	...	SCE_p	SCE_r
$\hat{\sigma}_i^2$	$\hat{\sigma}_1^2$	$\hat{\sigma}_2^2$...	$\hat{\sigma}_p^2$	—
\bar{x}_i	\bar{x}_1	\bar{x}_2	...	\bar{x}_p	—

Pour pouvoir dresser le tableau d'analyse de la variance reste à calculer :

le terme correctif : $C = X_{..}^2/n_{..}$,

la somme des carrés des écarts totale : $SCE_t = T - C$,

la somme des carrés des écarts factorielle : $SCE_f = SCE_t - SCE_r$,

les carrés moyens : $CM_f = SCE_f/(p - 1)$ et $CM_r = SCE_r/(n_{..} - p)$,

ainsi que leur rapport : $F_{obs} = CM_f/CM_r$.

2° On peut alors réaliser le test de l'hypothèse nulle, par comparaison de F_{obs} avec la valeur $F_{1-\alpha}$, dont les nombres de degrés de liberté sont $k_1 = p - 1$ et $k_2 = n_{..} - p$.

Analyse de la variance à un critère de classification : tableau d'analyse de la variance dans le cas d'effectifs inégaux.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Facteur contrôlé, variation entre populations	p-1	SCE _f	CM _f	F _{obs}
erreur résiduelle entre observations dans les populations	n.-p	SCE _r	CM _r	
TOTAUX	n.-1	SCE_t		

TABLE DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR.

p=0,95

K ₁	K ₂																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞
1	164	200	216	225	230	234	237	239	241	242	246	248	249	250	252	253	254	254
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,62	8,58	8,55	8,54	8,53	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,80	5,75	5,70	5,66	5,64	5,63	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50	4,44	4,41	4,39	4,37	4,37
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81	3,75	3,71	3,69	3,68	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38	3,32	3,27	3,24	3,23	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,33	3,22	3,15	3,08	3,02	2,97	2,92	2,92	2,92
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,47	3,29	3,23	3,18	3,14	3,08	2,94	2,86	2,80	2,76	2,73	2,72	2,72	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,95	2,83	2,77	2,70	2,64	2,59	2,56	2,55	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,83	2,72	2,65	2,57	2,51	2,46	2,43	2,42	2,40
12	4,73	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,73	2,62	2,54	2,47	2,40	2,35	2,32	2,31	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,64	2,53	2,46	2,38	2,31	2,26	2,23	2,22	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,63	2,56	2,46	2,39	2,31	2,24	2,19	2,16	2,14	2,13
15	4,54	3,68	3,28	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25	2,18	2,12	2,10	2,08	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,35	2,28	2,19	2,12	2,07	2,04	2,02	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,44	2,31	2,23	2,15	2,08	2,02	1,99	1,97	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,27	2,19	2,11	2,04	1,98	1,95	1,93	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,23	2,16	2,07	2,00	1,94	1,91	1,89	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04	1,97	1,91	1,88	1,86	1,84
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,15	2,07	1,98	1,91	1,85	1,82	1,80	1,78
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,11	2,03	1,94	1,86	1,80	1,77	1,75	1,73
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,07	1,99	1,90	1,82	1,76	1,73	1,71	1,69
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,04	1,96	1,87	1,79	1,73	1,69	1,67	1,65
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,01	1,93	1,84	1,76	1,70	1,66	1,64	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,13	2,08	1,92	1,84	1,74	1,66	1,59	1,55	1,53	1,51
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,01	1,85	1,76	1,69	1,60	1,52	1,48	1,46	1,44
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,98	1,81	1,73	1,65	1,56	1,48	1,44	1,41	1,39
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,13	2,06	2,00	1,94	1,77	1,69	1,60	1,51	1,43	1,39	1,37	1,35
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,10	2,03	1,97	1,91	1,74	1,66	1,57	1,48	1,39	1,35	1,33	1,32
200	3,89	3,04	2,65	2,42	2,26	2,14	2,06	1,98	1,91	1,84	1,67	1,59	1,50	1,41	1,32	1,28	1,27	1,26
500	3,86	3,01	2,62	2,39	2,23	2,12	2,03	1,95	1,88	1,81	1,64	1,56	1,47	1,38	1,29	1,25	1,24	1,23
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,67	1,57	1,46	1,35	1,24	1,17	1,11	1,00

Exemples: F_{0,95} = 3,17 pour K₁ = 5 et K₂ = 10;
F_{0,95} = 1/4,74 = 0,211 pour K₁ = 5 et K₂ = 10.

D. TABLES DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR: p = 0,95
Valeurs critiques F_p, telles que:
$$\int_0^{F_p} e^{-x} x^{k_1-2} (k_1 x + k_2)^{-(k_1+k_2)/2} dx = p,$$

pour p = 0,95, K₁ = (1)(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, ∞
et K₂ = (1)(1)20(2)30(10)50(20)100, 200, 500, ∞.



p=0,975

K ₁	K ₂																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞
1	648	800	864	900	922	937	948	957	963	969	975	981	1000	1013	1016	1017	1018	1018
2	38,5	39,0	39,2	39,2	39,3	39,3	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4
3	17,4	16,0	15,4	15,1	14,9	14,7	14,6	14,5	14,5	14,4	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
4	12,2	10,6	9,98	9,60	9,26	9,07	8,98	8,90	8,84	8,76	8,66	8,56	8,46	8,38	8,32	8,29	8,27	8,26
5	10,0	8,43	7,76	7,39	7,15	6,98	6,83	6,76	6,68	6,62	6,43	6,33	6,23	6,14	6,08	6,05	6,03	6,02
6	8,81	7,26	6,61	6,23	5,99	5,82	5,70	5,60	5,52	5,46	5,27	5,17	5,07	4,98	4,92	4,88	4,86	4,85
7	8,07	6,54	5,89	5,52	5,29	5,12	4,99	4,90	4,82	4,76	4,57	4,47	4,36	4,28	4,21	4,18	4,16	4,14
8	7,57	6,06	5,42	5,05	4,82	4,65	4,53	4,43	4,36	4,30	4,10	4,00	3,89	3,81	3,74	3,70	3,68	3,67
9	7,21	5,71	5,08	4,72	4,48	4,32	4,20	4,10	4,03	3,96	3,77	3,67	3,56	3,47	3,40	3,37	3,35	3,33
10	6,94	5,46	4,83	4,47	4,24	4,07	3,95	3,85	3,78	3,72	3,52	3,42	3,31	3,22	3,15	3,12	3,09	3,08
11	6,72	5,26	4,63	4,28	4,04	3,88	3,76	3,66	3,59	3,53	3,33	3,23	3,12	3,03	2,96	2,92	2,90	2,88
12	6,55	5,10	4,47	4,12	3,89	3,73	3,61	3,51	3,44	3,37	3,18	3,07	2,96	2,87	2,80	2,76	2,74	2,72
13	6,41	4,97	4,35	4,00	3,77	3,60	3,48	3,39	3,31	3,25	3,05	2,95	2,84	2,76	2,67	2,63	2,61	2,60
14	6,30	4,86	4,24	3,89	3,66	3,50	3,38	3,29	3,21	3,15	2,95	2,84	2,73	2,64	2,56	2,53	2,50	2,49
15	6,20	4,76	4,15	3,80	3,58	3,41	3,29	3,20	3,12	3,06	2,86	2,76	2,64	2,55	2,47	2,44	2,41	2,40
16	6,12	4,69	4,08	3,73	3,50	3,34	3,22	3,12	3,05	2,99	2,79	2,68	2,57	2,47	2,40	2,36	2,33	2,32
17	6,04	4,62	4,01	3,66	3,44	3,28	3,16	3,06	2,98	2,92	2,72	2,61	2,50	2,41	2,33	2,29	2,26	2,25
18	5,98	4,56	3,95	3,61	3,38	3,22	3,10	3,01	2,93	2,87	2,67	2,56	2,44	2,35	2,27	2,23	2,20	2,19
19	5,92	4,51	3,90	3,56	3,33	3,17	3,05	2,96	2,88	2,82	2,62	2,51	2,39	2,30	2,22	2,18	2,15	2,13
20	5,87	4,46	3,86	3,51	3,29	3,13	3,01	2,91	2,84	2,77	2,57	2,46	2,35	2,25	2,17	2,13	2,10	2,09
22	5,79	4,38	3,78	3,44	3,22	3,05	2,93	2,84	2,76	2,70	2,50	2,39	2,27	2,17	2,09	2,05	2,02	2,00
24	5,72	4,32	3,72	3,38	3,15	2,99	2,87	2,78	2,70	2,64	2,43	2,33	2,21	2,11	2,02	1,98	1,95	1,94
26	5,66	4,27	3,67	3,33	3,10	2,94	2,82	2,73	2,65	2,59	2,38	2,28	2,16	2,05	1,97	1,92	1,90	1,88
28	5,61	4,22	3,63	3,29	3,06	2,90	2,78	2,69	2,61	2,55	2,34	2,23	2,11	2,01	1,92	1,88	1,85	1,83
30	5,57	4,18	3,59	3,25	3,03	2,87	2,75	2,65	2,57	2,51	2,31	2,20	2,07	1,97	1,88	1,84	1,81	1,79
40	5,42	4,05	3,46	3,13	2,90	2,74	2,62	2,53	2,45	2,39	2,18	2,07	1,94	1,83	1,74	1,69	1,66	1,64
50	5,34	3,98	3,39	3,06	2,83	2,67	2,55	2,46	2,38	2,32	2,11	1,99	1,87	1,75	1,66	1,60	1,57	1,55
60	5,29	3,93	3,34	3,01	2,79	2,62	2,51	2,41	2,33	2,27	2,06	1,94	1,82	1,70	1,60	1,54	1,51	1,48
80	5,22	3,86	3,28	2,95	2,73	2,57	2,45	2,36	2,28	2,21	2,00	1,88	1,75	1,64	1,54	1,48	1,45	1,42
100	5,18	3,83	3,25	2,92	2,70	2,54	2,43	2,33	2,24	2,18	1,97	1,85	1,71	1,59	1,48	1,42	1,38	1,35
200	5,10	3,76	3,18	2,85	2,63	2,47	2,35	2,26	2,18	2,11	1,90	1,78	1,64	1,51	1,39	1,32	1,27	1,23
500	5,05	3,72	3,14	2,81	2,59	2,43	2,31	2,22	2,14	2,07	1,86	1,74	1,60	1,46	1,34	1,25	1,19	1,14
∞	5,02	3,69	3,12	2,79	2,57	2,41	2,29	2,19	2									

TABLE DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR.

p=0,99

D. TABLES DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR (suite): p = 0,99

Valeurs critiques F_p , telles que:

$$\int_0^{F_p} c^{k_1/2} - (k_1 x + k_2)^{-(k_1+k_2)/2} dx = p,$$

pour $p = 0,99$, $k_1 = (1)(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, \infty$
 et $k_2 = (1)(1)20(2)30(10)60(20)100, 200, 500, \infty$.

Les valeurs de la première ligne ($k_2 = 1$) doivent être multipliées par 10.

$k_1 \backslash k_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞	
1	403	500	540	563	576	586	593	598	602	606	610	614	618	621	625	628	631	633	635
2	98,5	99,0	99,2	99,2	99,3	99,3	99,3	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5
3	34,1	30,8	29,5	28,7	28,2	27,9	27,7	27,5	27,3	27,2	26,9	26,7	26,5	26,4	26,2	26,1	26,1	26,1	26,1
4	21,2	18,0	16,7	16,0	15,5	15,2	15,0	14,8	14,7	14,5	14,2	14,0	13,8	13,7	13,6	13,5	13,5	13,5	13,5
5	16,3	13,3	12,1	11,4	11,0	10,7	10,5	10,3	10,2	10,1	9,72	9,55	9,38	9,24	9,13	9,08	9,04	9,02	9,02
6	13,7	10,9	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,56	7,40	7,23	7,09	6,99	6,93	6,90	6,88	6,88
7	12,2	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,31	6,16	5,99	5,86	5,75	5,70	5,68	5,65	5,65
8	11,1	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,53	5,36	5,20	5,07	4,96	4,91	4,88	4,86	4,86
9	10,6	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	4,96	4,81	4,65	4,52	4,42	4,36	4,33	4,31	4,31
10	10,0	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,56	4,41	4,25	4,12	4,01	3,96	3,93	3,91	3,91
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54	4,25	4,10	3,94	3,81	3,71	3,66	3,62	3,60	3,60
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,01	3,86	3,70	3,57	3,47	3,41	3,38	3,36	3,36
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	3,82	3,66	3,51	3,38	3,27	3,22	3,19	3,17	3,17
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,70	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,66	3,51	3,35	3,22	3,11	3,06	3,03	3,00	3,00
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,52	3,37	3,21	3,08	2,98	2,92	2,89	2,87	2,87
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69	3,41	3,26	3,10	2,97	2,86	2,81	2,78	2,75	2,75
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59	3,31	3,16	3,00	2,87	2,76	2,71	2,68	2,65	2,65
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51	3,23	3,08	2,92	2,78	2,68	2,62	2,59	2,57	2,57
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43	3,15	3,00	2,84	2,71	2,60	2,55	2,51	2,49	2,49
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,09	2,94	2,78	2,64	2,54	2,48	2,44	2,42	2,42
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26	2,98	2,83	2,67	2,53	2,42	2,36	2,33	2,31	2,31
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17	2,89	2,74	2,58	2,44	2,33	2,27	2,24	2,21	2,21
26	7,72	5,51	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09	2,82	2,66	2,50	2,36	2,25	2,19	2,16	2,13	2,13
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03	2,75	2,60	2,44	2,30	2,19	2,13	2,09	2,06	2,06
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98	2,70	2,55	2,39	2,25	2,13	2,07	2,03	2,01	2,01
40	7,31	5,18	4,31	3,82	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80	2,52	2,37	2,20	2,06	1,94	1,87	1,83	1,80	1,80
50	7,17	5,06	4,20	3,72	3,41	3,19	3,02	2,89	2,79	2,70	2,42	2,27	2,10	1,95	1,82	1,76	1,71	1,68	1,68
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,83	2,74	2,65	2,37	2,22	2,05	1,89	1,75	1,68	1,63	1,60	1,60
80	6,96	4,88	4,04	3,56	3,26	3,04	2,87	2,74	2,64	2,55	2,27	2,12	1,94	1,79	1,66	1,58	1,53	1,49	1,49
100	6,90	4,82	3,98	3,51	3,21	2,99	2,82	2,69	2,59	2,50	2,22	2,07	1,89	1,73	1,60	1,52	1,47	1,43	1,43
200	6,76	4,71	3,88	3,41	3,11	2,89	2,73	2,60	2,50	2,41	2,13	1,97	1,79	1,63	1,48	1,41	1,37	1,32	1,28
500	6,69	4,65	3,82	3,36	3,05	2,84	2,68	2,55	2,44	2,35	2,07	1,91	1,74	1,58	1,41	1,31	1,23	1,16	1,16
∞	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,04	1,88	1,70	1,52	1,36	1,25	1,15	1,00	1,00

Exemples: $F_{0,99} = 5,64$ pour $k_1 = 5$ et $k_2 = 10$;
 $F_{0,99} = 1/10,1$ pour $k_1 = 5$ et $k_2 = 10$.

p=0,995

D. TABLES DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR (suite): p = 0,995

Valeurs critiques F_p , telles que:

$$\int_0^{F_p} c^{k_1/2} - (k_1 x + k_2)^{-(k_1+k_2)/2} dx = p,$$

pour $p = 0,995$, $k_1 = (1)(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, \infty$
 et $k_2 = (1)(1)20(2)30(10)60(20)100, 200, 500, \infty$.

Les valeurs de la première ligne ($k_2 = 1$) doivent être multipliées par 100.

$k_1 \backslash k_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞	
1	162	200	216	225	231	237	241	244	246	248	250	252	253	254	254	255	255	255	255
2	198	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199
3	55,6	49,8	47,5	46,2	45,4	44,8	44,4	44,1	43,9	43,7	43,1	42,8	42,5	42,2	42,0	41,9	41,9	41,8	41,8
4	31,3	26,3	24,3	23,2	22,5	22,0	21,6	21,4	21,1	21,0	20,4	20,2	19,9	19,7	19,5	19,4	19,4	19,3	19,3
5	22,8	18,3	16,5	15,6	14,9	14,5	14,2	14,0	13,8	13,6	13,1	12,9	12,7	12,5	12,3	12,2	12,2	12,1	12,1
6	18,6	14,5	12,9	12,0	11,5	11,1	10,8	10,6	10,4	10,2	9,81	9,59	9,36	9,17	9,03	8,95	8,91	8,88	8,88
7	16,2	12,4	10,9	10,0	9,52	9,16	8,89	8,68	8,51	8,38	7,97	7,75	7,53	7,35	7,22	7,15	7,12	7,10	7,08
8	14,7	10,9	9,60	8,81	8,30	7,95	7,69	7,50	7,34	7,21	6,81	6,61	6,40	6,22	6,09	6,02	5,98	5,95	5,95
9	13,6	10,1	8,72	7,96	7,47	7,13	6,88	6,69	6,54	6,42	6,03	5,83	5,62	5,45	5,32	5,26	5,21	5,19	5,19
10	12,8	9,43	8,08	7,34	6,87	6,54	6,30	6,12	5,97	5,85	5,47	5,27	5,07	4,90	4,77	4,71	4,67	4,64	4,64
11	12,2	8,91	7,60	6,88	6,42	6,10	5,86	5,68	5,54	5,42	5,05	4,86	4,65	4,49	4,36	4,29	4,25	4,23	4,23
12	11,8	8,51	7,23	6,52	6,07	5,76	5,52	5,35	5,20	5,09	4,72	4,53	4,33	4,17	4,04	3,97	3,93	3,90	3,90
13	11,4	8,19	6,93	6,23	5,79	5,48	5,25	5,08	4,94	4,82	4,46	4,27	4,07	3,91	3,78	3,71	3,67	3,65	3,65
14	11,1	7,92	6,68	6,00	5,56	5,26	5,03	4,86	4,72	4,60	4,25	4,06	3,86	3,70	3,57	3,50	3,46	3,44	3,44
15	10,8	7,70	6,48	5,80	5,37	5,07	4,83	4,67	4,54	4,42	4,07	3,88	3,69	3,52	3,39	3,33	3,29	3,26	3,26
16	10,6	7,51	6,30	5,64	5,21	4,91	4,69	4,52	4,38	4,27	3,92	3,73	3,54	3,37	3,25	3,18	3,14	3,11	3,11
17	10,4	7,35	6,16	5,50	5,07	4,78	4,56	4,39	4,25	4,14	3,79	3,61	3,41	3,25	3,12	3,05	3,01	2,98	2,98
18	10,2	7,21	6,03	5,37	4,96	4,66	4,44	4,28	4,14	4,03	3,68	3,50	3,30	3,14	3,01	2,94	2,90	2,87	2,87
19	10,1	7,09	5,92	5,27	4,85	4,56	4,34	4,18	4,04	3,93	3,59	3,40	3,21	3,04	2,91	2,85	2,80	2,78	2,78
20	9,94	6,99	5,82	5,17	4,76	4,47	4,26	4,09	3,96	3,85	3,50	3,32	3,12	2,96	2,83	2,76	2,72	2,69	2,69
22	9,73	6,81	5,65	5,02	4,61	4,32	4,11	3,94	3,81	3,70	3,36	3,18	2,98	2,82	2,69	2,62	2,57	2,55	2,55
24	9,55	6,66	5,52	4,89	4,49	4,20	3,99	3,83	3,69	3,59	3,25	3,06	2,87	2,70	2,57	2,50	2,46	2,43	2,43
26	9,41	6,54	5,41	4,79	4,38	4,10	3,89	3,73	3,60	3,49	3,15	2,97	2,77	2,61	2,47	2,40	2,36	2,33	2,33
28	9,28	6,44	5,32	4,70	4,30	4,02	3,81	3,65	3,52	3,41	3,07	2,89	2,69	2,53	2,39	2,32	2,28	2,25	2,25
30	9,18	6,35	5,24	4,62	4,23	3,95	3,74	3,58	3,45	3,34	3,01	2,82	2,63	2,46	2,32	2,25	2,21	2,18	2,18
40	8,83	6,07	4,98	4,37	3,99	3,71	3,51	3,35	3,22	3,12	2,78	2,60	2,40	2,23	2,09	2,01	1,95	1,91	1,91
50	8,63	5,90	4,83	4,23	3,85	3,58	3,38	3,22	3,09	2,99	2,65	2,47	2,27	2,10	1,95	1,87	1,82		

TABLE DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR.

p=0,999

Les valeurs de la première ligne (k₂ = 1) doivent être multipliées par 1000.

k ₁ \ k ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞
1	405	500	540	562	576	586	593	598	602	606	610	614	618	623	628	633	636	637
2	998	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
3	168	148	141	137	135	133	132	131	130	129	127	126	125	124	124	124	124	124
4	74,1	61,2	56,2	53,4	51,7	50,5	49,7	49,0	48,5	48,0	47,6	47,2	46,8	46,4	46,1	45,9	45,8	45,8
5	47,0	36,6	33,2	31,1	29,8	28,8	28,2	27,6	27,2	26,9	26,7	26,5	26,4	26,3	26,2	26,1	26,0	26,0
6	35,5	27,0	25,3	23,9	23,0	22,4	21,9	21,5	21,2	20,9	20,7	20,6	20,5	20,4	20,3	20,2	20,1	20,1
7	29,2	21,7	20,4	19,2	18,5	18,0	17,6	17,3	17,1	16,9	16,7	16,6	16,5	16,4	16,3	16,2	16,1	16,1
8	25,4	18,3	17,2	16,2	15,5	15,0	14,6	14,3	14,1	13,9	13,8	13,7	13,6	13,5	13,4	13,3	13,2	13,2
9	22,9	16,4	15,9	15,1	14,5	14,0	13,6	13,3	13,1	12,9	12,8	12,7	12,6	12,5	12,4	12,3	12,2	12,2
10	21,0	14,9	14,6	13,9	13,4	13,0	12,7	12,5	12,3	12,1	12,0	11,9	11,8	11,7	11,6	11,5	11,4	11,4
11	19,7	13,8	13,6	13,0	12,5	12,1	11,8	11,5	11,3	11,1	11,0	10,9	10,8	10,7	10,6	10,5	10,4	10,4
12	18,6	13,0	12,8	12,3	11,8	11,4	11,1	10,8	10,6	10,4	10,3	10,2	10,1	10,0	9,9	9,8	9,7	9,7
13	17,8	12,3	12,1	11,6	11,1	10,7	10,4	10,1	9,8	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,9
14	17,1	11,8	11,6	11,1	10,6	10,2	9,8	9,5	9,2	8,9	8,7	8,6	8,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,1
15	16,6	11,3	11,1	10,6	10,1	9,6	9,2	8,8	8,5	8,2	8,0	7,8	7,7	7,6	7,5	7,4	7,3	7,3
16	16,1	11,0	10,9	10,4	9,9	9,4	9,0	8,6	8,2	7,8	7,5	7,3	7,1	7,0	6,9	6,8	6,7	6,7
17	15,7	10,7	10,6	10,1	9,6	9,1	8,7	8,3	7,9	7,5	7,2	7,0	6,8	6,6	6,5	6,4	6,3	6,3
18	15,4	10,4	10,3	9,8	9,3	8,8	8,4	8,0	7,6	7,2	6,9	6,7	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6,1
19	15,1	10,2	10,1	9,6	9,1	8,6	8,2	7,8	7,4	7,0	6,7	6,5	6,3	6,2	6,1	6,0	5,9	5,9
20	14,8	9,9	9,8	9,3	8,8	8,3	7,9	7,5	7,1	6,7	6,4	6,2	6,0	5,9	5,8	5,7	5,6	5,6
22	14,4	9,6	9,5	9,0	8,5	8,0	7,6	7,2	6,8	6,4	6,1	5,9	5,7	5,6	5,5	5,4	5,3	5,3
24	14,0	9,3	9,2	8,7	8,2	7,7	7,3	6,9	6,5	6,1	5,8	5,6	5,4	5,3	5,2	5,1	5,0	5,0
26	13,7	9,1	9,0	8,5	8,0	7,5	7,1	6,7	6,3	5,9	5,6	5,4	5,2	5,1	5,0	4,9	4,8	4,8
28	13,5	8,9	8,8	8,3	7,8	7,3	6,9	6,5	6,1	5,7	5,4	5,2	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	4,6
30	13,3	8,7	8,6	8,1	7,6	7,1	6,7	6,3	5,9	5,5	5,2	5,0	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4	4,4
40	12,6	8,2	8,1	7,6	7,1	6,6	6,2	5,8	5,4	5,0	4,7	4,5	4,3	4,2	4,1	4,0	3,9	3,9
50	12,2	7,9	7,8	7,3	6,8	6,3	5,9	5,5	5,1	4,7	4,4	4,2	4,0	3,9	3,8	3,7	3,6	3,6
60	12,0	7,7	7,6	7,1	6,6	6,1	5,7	5,3	4,9	4,5	4,2	4,0	3,8	3,7	3,6	3,5	3,4	3,4
80	11,7	7,5	7,4	6,9	6,4	5,9	5,5	5,1	4,7	4,3	4,0	3,8	3,6	3,5	3,4	3,3	3,2	3,2
100	11,5	7,4	7,3	6,8	6,3	5,8	5,4	5,0	4,6	4,2	3,9	3,7	3,5	3,4	3,3	3,2	3,1	3,1
200	11,2	7,1	7,0	6,5	6,0	5,5	5,1	4,7	4,3	3,9	3,6	3,4	3,2	3,1	3,0	2,9	2,8	2,8
500	11,0	7,0	6,9	6,4	5,9	5,4	5,0	4,6	4,2	3,8	3,5	3,3	3,1	3,0	2,9	2,8	2,7	2,7
∞	10,8	6,9	6,8	6,3	5,8	5,3	4,9	4,5	4,1	3,7	3,4	3,2	3,0	2,9	2,8	2,7	2,6	2,6

Exemples: F_{0,999} = 10,5 pour k₁ = 5 et k₂ = 10;
F_{0,999} = 1/26,9 = 0,037 pour k₁ = 5 et k₂ = 10.

p=0,9995



D. TABLES DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR (suite): p = 0,999
Valeurs critiques F_p telles que:
$$\int_0^{F_p} c^{k_1/2} - (k_1 x + k_2)^{-1} c^{(k_1 + k_2)/2} dx = p,$$

pour p = 0,999, k₁ = (1)(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, ∞
et k₂ = (1)(1)20(2)30(1)60(2)100, 200, 500, ∞.

D. TABLES DES DISTRIBUTIONS F DE SNEDECOR (suite): p = 0,9995
Valeurs critiques F_p telles que:
$$\int_0^{F_p} c^{k_1/2} - (k_1 x + k_2)^{-1} c^{(k_1 + k_2)/2} dx = p,$$

pour p = 0,9995, k₁ = (1)(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, ∞
et k₂ = (1)(1)20(2)30(1)60(2)100, 200, 500, ∞.

Les valeurs de la première ligne (k₂ = 1) doivent être multipliées par 10000; celles de la deuxième ligne (k₂ = 2) par 10.

k ₁ \ k ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞
1	162	200	216	225	231	234	237	239	241	242	246	248	250	252	253	253	254	254
2	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
3	266	237	225	218	214	211	209	208	207	206	205	204	203	201	199	198	197	196
4	106	87,4	80,1	76,1	73,6	71,9	70,6	69,7	68,9	68,3	67,6	67,0	66,5	66,0	65,6	65,2	64,9	64,6
5	63,6	49,8	44,4	41,5	39,7	38,5	37,6	36,9	36,4	35,9	35,4	35,0	34,6	34,2	33,9	33,6	33,4	33,3
6	46,1	34,8	30,4	28,1	26,6	25,6	24,9	24,3	23,9	23,5	23,2	22,9	22,6	22,3	22,1	21,9	21,8	21,7
7	37,0	27,2	23,5	21,4	20,2	19,3	18,7	18,2	17,8	17,5	17,2	16,9	16,6	16,3	16,1	15,9	15,8	15,7
8	32,0	22,8	19,4	17,6	16,4	15,7	15,1	14,6	14,3	14,0	13,7	13,4	13,2	12,9	12,7	12,5	12,4	12,3
9	28,0	19,9	16,8	15,1	14,1	13,3	12,8	12,4	12,1	11,8	11,5	11,3	11,1	10,9	10,7	10,5	10,4	10,3
10	25,5	17,9	15,0	13,4	12,4	11,8	11,3	10,9	10,6	10,3	10,1	9,9	9,7	9,5	9,3	9,2	9,1	9,0
11	23,6	16,4	13,6	12,2	11,2	10,6	10,1	9,7	9,4	9,2	8,9	8,7	8,5	8,3	8,1	7,9	7,8	7,7
12	22,2	15,3	12,7	11,2	10,4	9,7	9,2	8,9	8,6	8,4	8,2	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,1	7,0
13	21,1	14,4	11,9	10,5	9,6	9,0	8,6	8,3	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8	6,6	6,5	6,4
14	20,2	13,7	11,3	9,9	9,1	8,5	8,1	7,8	7,5	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,1	6,0	5,9
15	19,5	13,2	10,8	9,4	8,6	8,1	7,8	7,5	7,2	7,0	6,8	6,6	6,4	6,2	6,0	5,8	5,7	5,6
16	18,9	12,7	10,3	9,0	8,2	7,7	7,3	7,0	6,7	6,5	6,3	6,1	5,9	5,7	5,5	5,4	5,3	5,2
17	18,4	12,3	9,9	8,7	7,9	7,4	7,0	6,7	6,4	6,2	6,0	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,9	4,8
18	17,9	11,9	9,6	8,4	7,7	7,1	6,8	6,5	6,2	6,0	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,7	4,6
19	17,5	11,6	9,4	8,2	7,4	6,9	6,5	6,2	5,9	5,7	5,5	5,3	5,1	4,9	4,7	4,5	4,4	4,3
20	17,2	11,4	9,2	8,0	7,2	6,6	6,2	5,9	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,1	4,0
22	16,6	11,0	8,8	7,6	6,9	6,4	6,0	5,7	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,9	3,8
24	16,2	10,6	8,5	7,3	6,6	6,1	5,7	5,4	5,1	4,9	4,7	4,5	4,3	4,1	3,9	3,7	3,6	3,5
26	15,8	10,3	8,2	7,0	6,3	5,8	5,4	5,1	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,3	3,2
28	15,5	10,1	8,0	6,8	6,1	5,6	5,2	4,9	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,1	3,0
30	15,3	9,9	7,8	6,6	5,9	5,4	5,0	4,7	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,9	2,8
40	14,4	9,2	7,3	6,3	5,6	5,1	4,8	4,5	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8	2,7	2,6
50	13,9	8,8	7,0	6,0	5,3	4,8	4,5	4,2	3,9	3,7	3,5	3,3	3,1	2,9	2,7	2,5	2,4	2,3
60	13,6	8,6	6,8	5,8	5,2	4,7	4,4	4,1	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8	2,6	2,4	2,3	2,2
80	13,2	8,4	6,6	5,6	4,9	4,4	4,0	3,7	3,4	3,2	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,9	1,8
100	13,0	8,2	6,4	5,4	4,8	4,3	3,9	3,7	3,4	3,2	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,9	1,8
200	12,5	7,9	6,1	5,2	4,6	4,2	3,9	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,9	1,8
500	12,3	7,7	6,0	5,0	4,5	4,1	3,8	3,5	3,3	3,1	2,9	2,7	2,5	2,3	2,1	1,9	1,8	1,7
∞	12,1	7,6	5,9	5,0	4,4	4,0	3,7	3,4	3,2	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,8	1,7	1,6

Exemples: F_{0,9995} = 12,4 pour k₁ = 3 et k₂ = 10;
F_{0,9995} = 1/35,9 = 0,028 pour k₁ = 5 et k₂ = 10.

COMPARAISON MULTIPLE DE MOYENNES :
METHODE DE NEWMAN ET KEULS (37, 94, 129)

La méthode de NEWMAN et KEULS est basée sur la comparaison des amplitudes observées pour des groupes de deux, trois, ..., p moyennes, avec l'amplitude maximale attendue à un niveau de signification donné.

Pour effectuer cette comparaison, on doit d'abord calculer la plus petite amplitude significative relative à des groupes de 2, 3, ..., p moyennes. Ce calcul nécessite l'emploi de tables particulières, des valeurs $q_{1-\alpha}$. La plus petite amplitude significative est, pour un niveau de signification α , pour un nombre de degrés de liberté donné et pour un nombre de moyennes donné :

$$q_{1-\alpha} \sqrt{CMr/n}$$

les valeurs $q_{1-\alpha}$ ayant été calculées de telle sorte que, pour p populations normales de même moyenne et de même variance, la probabilité de dépasser la plus petite amplitude significative soit précisément égale à α .

Après avoir déterminé de cette manière les amplitudes maximales admissibles relatives aux différents nombres de moyennes, on compare l'amplitude observée des p moyennes considérées, à la plus petite amplitude significative correspondante, puis on traite de la même manière l'amplitude des différents groupes de p-1 moyennes, de p-2 moyennes, etc., jusqu'au moment où l'amplitude de certains groupes de moyennes ne dépasse plus la limite admissible correspondante. Les moyennes de ces groupes sont alors considérées comme non significativement différentes.

Le carré moyen résiduel doit éventuellement être remplacé par le carré moyen ayant servi de base de comparaison, et l'effectif n par le nombre d'observations qui interviennent dans le calcul de chacune des moyennes. De même, le nombre de degrés de liberté est d'une façon générale, celui du carré moyen servant de base de comparaison.

TABLE DES VALEURS CRITIQUES DU TEST DE NEWMAN ET KEULS :

$\alpha = 0,05$

Valeurs critiques $q_{1-\alpha}$
pour $\alpha = 0,05$, $p = 2(1)20$ et $k = 2(1)20, 24, 30, 40, 60, 120, \infty$.

$k \backslash p$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	6,08	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99	14,39	14,75	15,08	15,38	15,65	15,91	16,14	16,37	16,57	16,77
3	4,50	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,46	9,72	9,95	10,15	10,35	10,52	10,69	10,84	10,98	11,11	11,24
4	3,93	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,03	8,21	8,37	8,52	8,66	8,79	8,91	9,03	9,13	9,23
5	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,17	7,32	7,47	7,60	7,72	7,83	7,93	8,03	8,12	8,21
6	3,46	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	6,65	6,79	6,92	7,03	7,14	7,24	7,34	7,43	7,51	7,59
7	3,34	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16	6,30	6,43	6,55	6,66	6,76	6,85	6,94	7,02	7,10	7,17
8	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,05	6,18	6,29	6,39	6,48	6,57	6,65	6,73	6,80	6,87
9	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	5,87	5,98	6,09	6,19	6,28	6,36	6,44	6,51	6,58	6,64
10	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	5,72	5,83	5,93	6,03	6,11	6,19	6,27	6,34	6,40	6,47
11	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,61	5,71	5,81	5,90	5,98	6,06	6,13	6,20	6,27	6,33
12	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,51	5,61	5,71	5,80	5,88	5,95	6,02	6,09	6,15	6,21
13	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,43	5,53	5,63	5,71	5,79	5,86	5,93	5,99	6,05	6,11
14	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,36	5,46	5,55	5,64	5,71	5,79	5,85	5,91	5,97	6,03
15	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,31	5,40	5,49	5,57	5,65	5,72	5,78	5,85	5,90	5,96
16	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,26	5,35	5,44	5,52	5,59	5,66	5,73	5,79	5,84	5,90
17	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,21	5,31	5,39	5,47	5,54	5,61	5,67	5,73	5,79	5,84
18	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,17	5,27	5,35	5,43	5,50	5,57	5,63	5,69	5,74	5,79
19	2,96	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,14	5,23	5,31	5,39	5,46	5,53	5,59	5,65	5,70	5,75
20	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,11	5,20	5,28	5,36	5,43	5,49	5,55	5,61	5,66	5,71
24	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,01	5,10	5,18	5,25	5,32	5,38	5,44	5,49	5,55	5,59
30	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	4,92	5,00	5,08	5,15	5,21	5,27	5,33	5,38	5,43	5,47
40	2,86	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	4,82	4,90	4,98	5,04	5,11	5,16	5,22	5,27	5,31	5,36
60	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81	4,88	4,94	5,00	5,06	5,11	5,15	5,20	5,24
120	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,64	4,71	4,78	4,84	4,90	4,95	5,00	5,04	5,09	5,13
∞	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,55	4,62	4,68	4,74	4,80	4,85	4,89	4,93	4,97	5,01

Exemple: $q_{0,05} = 3,96$ pour $p = 4$ populations et $k = 20$ degrés de liberté.

$\alpha = 0,01$

Valeurs critiques $q_{1-\alpha}$
pour $\alpha = 0,01$, $p = 2(1)20$ et $k = 2(1)20, 24, 30, 40, 60, 120, \infty$.

$k \backslash p$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	14,04	19,02	22,29	24,72	26,63	28,20	29,53	30,68	31,69	32,59	33,40	34,13	34,81	35,43	36,00	36,53	37,03	37,50	37,95
3	8,26	10,62	12,17	13,33	14,24	15,00	15,64	16,20	16,69	17,13	17,53	17,89	18,22	18,52	18,81	19,07	19,32	19,55	19,77
4	6,51	8,12	9,17	9,96	10,58	11,10	11,55	11,93	12,27	12,57	12,84	13,09	13,32	13,53	13,73	13,91	14,08	14,24	14,40
5	5,70	6,98	7,80	8,42	8,91	9,32	9,67	9,97	10,24	10,48	10,70	10,89	11,08	11,24	11,40	11,55	11,68	11,81	11,93
6	5,24	6,33	7,03	7,56	7,97	8,32	8,61	8,87	9,10	9,30	9,48	9,65	9,81	9,95	10,08	10,21	10,32	10,43	10,54
7	4,95	5,92	6,54	7,01	7,37	7,68	7,94	8,17	8,37	8,55	8,71	8,86	9,00	9,12	9,24	9,35	9,46	9,55	9,65
8	4,75	5,64	6,20	6,62	6,96	7,24	7,47	7,68	7,86	8,03	8,18	8,31	8,44	8,55	8,66	8,76	8,85	8,94	9,03
9	4,60	5,43	5,96	6,35	6,66	6,91	7,13	7,33	7,49	7,65	7,78	7,91	8,03	8,13	8,23	8,33	8,41	8,49	8,57
10	4,48	5,27	5,77	6,14	6,43	6,67	6,87	7,05	7,21	7,36	7,49	7,60	7,71	7,81	7,91	7,99	8,08	8,15	8,23
11	4,39	5,15	5,62	5,97	6,25	6,48	6,67	6,84	6,99	7,13	7,25	7,36	7,46	7,56	7,65	7,73	7,81	7,88	7,95
12	4,32	5,05	5,50	5,84	6,10	6,32	6,51	6,67	6,81	6,94	7,06	7,17	7,26	7,36	7,44	7,52	7,59	7,66	7,73
13	4,26	4,96	5,40	5,73	5,98	6,19	6,37	6,53	6,67	6,79	6,90	7,01	7,10	7,19	7,27	7,35	7,42	7,48	7,55
14	4,21	4,89	5,32	5,63	5,88	6,08	6,26	6,41	6,54	6,66	6,77	6,87	6,96	7,05	7,13	7,20	7,27	7,33	7,39
15	4,17	4,84	5,25	5,56	5,80	5,99	6,16	6,31	6,44	6,55	6,66	6,76	6,84	6,93	7,00	7,07	7,14	7,20	7,26
16	4,13	4,79	5,19	5,49	5,72	5,92	6,08	6,22	6,35	6,46	6,56	6,66	6,74	6,82	6,90	6,97	7,03	7,09	7,15
17	4,10	4,74	5,14	5,43	5,66	5,85	6,01	6,15	6,27	6,38	6,48	6,57	6,66	6,73	6,81	6,87	6,94	7,00	7,05
18	4,07	4,70	5,09	5,38	5,60	5,79	5,94	6,08	6,20	6,31	6,41	6,50	6,58	6,65	6,73	6,79	6,85	6,91	6,97
19	4,05	4,67	5,05	5,33	5,55	5,73	5,89	6,02	6,14	6,25	6,34	6,43	6,51	6,58	6,65	6,72	6,78	6,84	6,89
20	4,02	4,64	5,02	5,29	5,51	5,69	5,84	5,97	6,09	6,19	6,28	6,37	6,45	6,52	6,59	6,65	6,71	6,77	6,82
24	3,96	4,55	4,91	5,17	5,37	5,54	5,69	5,81	5,92	6,02	6,11	6,19	6,26	6,33	6,39	6,45	6,51	6,56	6,61
30	3,89	4,45	4,80	5,05	5,24	5,40	5,54	5,65	5,76	5,85	5,93	6,01	6,08	6,14	6,20	6,26	6,31	6,36	6,41
40	3,82	4,37	4,70	4,93	5,11	5,26	5,39	5,50	5,60	5,69	5,76	5,83	5,90	5,96	6,02	6,07	6,12	6,16	6,21
60	3,76	4,28	4,59	4,82	4,99	5,13	5,25	5,36	5,45	5,53	5,60	5,67	5,73	5,78	5,84	5,89	5,93	5,97	6,01
120	3,70	4,20	4,50	4,71	4,87	5,01	5,12	5,21	5,30	5,37	5,44	5,50	5,56	5,61	5,66	5,71	5,75	5,79	5,83
∞	3,64	4,12	4,40	4,60	4,76	4,88	4,99	5,08	5,16	5,23	5,29	5,35	5,40	5,45	5,49	5,54	5,57	5,61	5,65

METHODES RELATIVES A LA REGRESSION.

Relation de type $Y = a + b \cdot x$

X : variable indépendante

Y : variable dépendante

droite de régression au sens des moindres carrés

$$\text{variance de } x : s_x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2$$

$$\text{variance de } y : s_y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2 - 1/n \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2$$

$$\text{cov}(x,y) = 1/n * \sum_{i=1}^n x_i * y_i - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)$$

*** Calcul du coefficient de régression b :**

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i * y_i - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} = \frac{\text{cov}(x,y)}{s_x^2}$$

*** Calcul de la variance résiduelle de Y**

On appelle résidu de y par rapport à x, les écarts $y - y(x_i)$
La variance résiduelle de Y est la variance de ces résidus.

$$s_{y \cdot x}^2 = 1/n * \sum_{i=1}^n (y_i - y(x_i))^2 = s_y^2 - \text{cov}^2(x,y) / s_x^2$$

$\text{cov}^2(x,y) / s_x^2$: variance expliquée par la droite de régression de y en x.

*** Coefficient de corrélation :**

$$r = \frac{\text{cov}(x,y)}{s_x * s_y}$$

s_x^2 : variance de x
 s_y^2 : variance de y s_x, s_y différents de 0

L'estimation de ces valeurs nécessite le calcul des quantités suivantes

$$\text{SCE}_x = \sum_{i=1}^n x_i^2 - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2$$

$$\text{SCE}_y = \sum_{i=1}^n y_i^2 - 1/n \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2$$

$$\text{SPE} = \sum_{i=1}^n x_i * y_i - 1/n \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)$$

On déduit ainsi les valeurs :

$$b_{y \cdot x} = \frac{\text{SPE}}{\text{SCE}_x}$$

$$r = \text{SPE} / \sqrt{\text{SCE}_x * \text{SCE}_y}$$



$$s_{y \cdot x}^2 = 1/n * \left[\text{SCE}_y - \frac{\text{SPE}^2}{\text{SCE}_x} \right]$$

*** Test de signification du coefficient de régression.**

On teste l'hypothèse $b = 0$

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression linéaire	1	SCE ₁	CM ₁	Fobs
Ecarts par rapport à la régression	n-2	SCE _{y.x}	CM _{y.x}	
TOTAUX	n-1	SCE _y		

$$F_{\text{obs}} = \text{CM}_1 / \text{CM}_{y \cdot x}$$

*** Comparaison de plus de 2 coefficients de régression.**

test de parallélisme : tableau d'analyse de la variance.

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés des écarts	carrés moyens	F
Régression linéaire moyenne	1	SCE1	CML	F1
Non parallélisme	p-1	SCEb	CMb	Fb
Ecart par rapport aux régressions linéaires	n.-2p	SCEy.x	CMy.x	
TOTAUX	n.-p	SCEy		



$$SCEy.x = \sum_{i=1}^P (SCEy.x)_i$$

$$SCEy = \sum_{i=1}^P (SCEy)_i$$

$$SCE1 = \left(\sum_{i=1}^P SPEi \right)^2 / \sum_{i=1}^P SCEx$$

$$b = \sum_{i=1}^P SPEi / \sum_{i=1}^P (SCEx)_i$$

$$SCEb = \sum_{i=1}^P (SCE1)_i - SCE1$$

$$Fb = CMb / CMy.x$$

* Dans le cas où la valeur Fb n'est pas significative, on accepte l'hypothèse d'égalité des coefficients de régression et on peut chercher la régression moyenne puis tester la signification de ce coefficient de régression moyen par le test F1.

* Dans le cas où la valeur Fb est significative, les coefficients de régression doivent être considérés comme différents dans leur ensemble. On peut ensuite les comparer par la méthode de la plus petite amplitude significative.

TABLE DES DISTRIBUTIONS T DE STUDENT :

Valeurs critiques t_p telles que :

$$\int_{-\infty}^{t_p} c(1 + t^2/k)^{-(k+1)/2} dt = p,$$

pour $p = 0,6(0,1)0,9, 0,95, 0,975, 0,99, 0,995, 0,999, 0,9995$
 et $k = 1(1)30, 40(20)100, 200, 500, \infty$.

$k \backslash p$	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,999	0,9995
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94
4	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	0,258	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,255	0,529	0,851	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
60	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
80	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415
100	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389
200	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339
500	0,253	0,525	0,842	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,106	3,310
∞	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291



TABLE DES VALEURS CRITIQUES DU TEST DE HARTLEY :

Valeurs critiques $H_{1-\alpha}$
 pour $\alpha = 0,05$ et $0,01$, $p = 2(1)12$,
 et $k = 2(1)10, 12, 15, 20, 30, 60, \infty$.

$\alpha = 0,05$

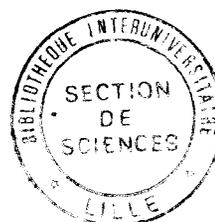
$\frac{p}{k}$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	39,0	87,5	142	202	266	333	403	475	550	626	704
3	15,4	27,8	39,2	50,7	62,0	72,9	83,5	93,9	104	114	124
4	9,60	15,5	20,6	25,2	29,5	33,6	37,5	41,1	44,6	48,0	51,4
5	7,15	10,8	13,7	16,3	18,7	20,8	22,9	24,7	26,5	28,2	29,9
6	5,82	8,38	10,4	12,1	13,7	15,0	16,3	17,5	18,6	19,7	20,7
7	4,99	6,94	8,44	9,70	10,8	11,8	12,7	13,5	14,3	15,1	15,8
8	4,43	6,00	7,18	8,12	9,03	9,78	10,5	11,1	11,7	12,2	12,7
9	4,03	5,34	6,31	7,11	7,80	8,41	8,95	9,45	9,91	10,3	10,7
10	3,72	4,85	5,67	6,34	6,92	7,42	7,87	8,28	8,66	9,01	9,34
12	3,28	4,16	4,79	5,30	5,72	6,09	6,42	6,72	7,00	7,25	7,48
15	2,86	3,54	4,01	4,37	4,68	4,95	5,19	5,40	5,59	5,77	5,93
20	2,46	2,95	3,29	3,54	3,76	3,94	4,10	4,24	4,37	4,49	4,59
30	2,07	2,40	2,61	2,78	2,91	3,02	3,12	3,21	3,29	3,36	3,39
60	1,67	1,85	1,96	2,04	2,11	2,17	2,22	2,26	2,30	2,33	2,36
∞	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

$\alpha = 0,01$

$\frac{p}{k}$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	199	448	729	1036	1362	1705	2063	2432	2813	3204	3605
3	47,5	85	120	151	184	216	249	281	310	337	361
4	23,2	37	49	59	69	79	89	97	106	113	120
5	14,9	22	28	33	38	42	46	50	54	57	60
6	11,1	15,5	19,1	22	25	27	30	32	34	36	37
7	8,89	12,1	14,5	16,5	18,4	20	22	23	24	26	27
8	7,50	9,9	11,7	13,2	14,5	15,8	16,9	17,9	18,9	19,8	21
9	6,54	8,5	9,9	11,1	12,1	13,1	13,9	14,7	15,3	16,0	16,6
10	5,85	7,4	8,6	9,6	10,4	11,1	11,8	12,4	12,9	13,4	13,9
12	4,91	6,1	6,9	7,6	8,2	8,7	9,1	9,5	9,9	10,2	10,6
15	4,07	4,9	5,5	6,0	6,4	6,7	7,1	7,3	7,5	7,8	8,0
20	3,32	3,8	4,3	4,6	4,9	5,1	5,3	5,5	5,6	5,8	5,9
30	2,63	3,0	3,3	3,4	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0	4,1	4,2
60	1,96	2,2	2,3	2,4	2,4	2,5	2,5	2,6	2,6	2,7	2,7
∞	1,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Exemples: $H_{0,95} = 4,85$ pour $p = 3$ populations et $k = 10$ degrés de liberté;
 $H_{0,99} = 7,4$ pour $p = 3$ populations et $k = 10$ degrés de liberté.

Remarque: certaines valeurs ne sont qu'approximées, à partir du troisième chiffre significatif.



BIBLIOGRAPHIE

1

AARONS, S.; AHMAD, M.H.; 1986
Examining growth and survival of cowpea "Rhizobia" in Jamaican peat.
LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 2 : 115-118

2

ABEL, G.H.; ERDMAN, L.W.; 1964
Response of Lee soybeans to different strains of "Rhizobium japonicum".
AGRONOMY JOURNAL, 56 : 423-424

3

AHMAD, M.H.; SMITH, E.; 1985
Utilization of carbon sources and acid/alkali production by cowpea "Rhizobia".
PLANT AND SOIL, 86 : 279-282

4

ALVA, A.K.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G.; 1986
The role of calcium in alleviating aluminium toxicity.
AUSTRALIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, 37 : 375-382

5

ALVA, A.K.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C.; 1986
Relationship between root length of soybean and calculated activities of aluminium monomers in nutrient solution.
SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 50(4) : 959-962

6

ALVA, A.K.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C.; 1986
Effects of phosphorus/aluminium molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminium toxicity.
SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 50(1) : 133-137

7

ANGLE, J.S.; PUGASHETTI, B.K.; WAGNER, G.H.; 1981
Fungal effects on "Rhizobium japonicum"-soybean symbiosis.
AGRONOMY JOURNAL, 73 : 301-306

8

ANTHEUNISSE, J.; ARKESTEIJN-DIJKSMAN, L.; 1979
Rate of drying and the survival of microorganisms.
ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, 45 : 177-184

9

ASANUMA, S.; THOTTAPPILLY, G.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; 1985
Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of "Rhizobium" both in culture and from root nodules of soybeans and cowpeas.
CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 31 : 524-528

10

BERINGER, J.E.; 1974
R Factor transfer in "Rhizobium leguminosarum".
JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 84 : 188-198

11

BERNARD, T.; POCARD, J.A.; PERROUD, B.; LE RUDULIER, D.; 1986
Variations in the response of salt-stressed "Rhizobium" strains to betaines.
ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, 143 : 359-364

12

BEZDICEK, D.F.; EVANS, D.W.; ABEDE, B.; WITTERS, R.E.; 1978
Evaluation of peat and granular inoculum for soybean yield and nitrogen fixation under irrigation.
AGRONOMY JOURNAL, 70(5) : 765-768

13

BIZOT, H.; 1983
Using the 'G.A.B.' model to construct sorption isotherms.
PHYSICAL PROPERTIES OF FOODS, ED. R. JOWITT, F. ESCHER, B. HALLSTROM
H.F.T. MEFFERT, W.E.L. SPIESS, APPL. SCI. PUBLISHERS : 43-54

14

BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; 1983
Effects of aluminium, OH:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture.
SOIL SCIENCE, 136(4) : 197-207

15

BOULDOIRES, J.P.; 1975
Eau libre et eau liée dans les aliments. Application de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire dans les I.A., 233-282
XV symposium international, BOLOGNE, Nov 75. Ed: Stampato dalla cooperativa. Libreria universitria Editrice Bologna.

16

BROCKWELL, J.; 1977
Application of legume seed inoculant.
A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, SECT. IV : 277-309
ED. HARDY, R.W.F.; GIBSON, A.H.

17

BROCKWELL, J.; ROUGHLEY, R.J.; 1967
J. AUST. INST. AGR. SCI., 33 : 204

18

BROMFIELD, E.P.S.; 1984
Variation in preference for "Rhizobium meliloti" within and between
"medicago sativa" cultivars grown in soil.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 48(1) : 1231-1236

19

BROSIO, E.; ALTOBELLI, G.; DI NOLA, A.; 1984
A pulsed low-resolution NMR study of water binding to milk proteins.
JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY, 19 : 103-108

20

BROSIO, E.; ALTOBELLI, G.; YU, S.H.; DI NOLA, A.; 1983
A pulsed low resolution NMR study of water binding to powdered milk.
JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY, 18 : 219-226

21

BROWN, A.D.; 1976
Microbial water stress.
BACTERIOLOGICAL REVIEWS, 40(4) : 803-846

22

BROWN, A.D.; 1978
Compatible solutes and extreme water stress in Eukaryotic microorganisms
ADVANCES IN MICROBIAL PHYSIOLOGY, 17 : 181-242

23

BRUNAUER, S.; EMMET, P.H.; TELLER, E.; 1938
J. AM. CHEM. SOC., 60 : 309

24

BURNS, R.G.; 1986
Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids.
in "INTERACTIONS OF SOIL MINERALS WITH NATURAL ORGANISMS & MICROBES"
SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA Spec. Pub., 17 : 429-451

25

BURNS, R.G.; 1985
The rhizosphere : microbial and enzymatic gradients and prospects for
manipulation.
PEDOLOGIE, 35 : 283-295

26

BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C.; 1977

Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 99 : 19-27

27

BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C.; 1977

Water status of "Rhizobia" in relation to their susceptibility to desiccation and their protection by montmorillonite.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 99 : 19-27

28

CHAMBER, M.A.; MONTES, F.J.; 1982

Effects of some seeds disinfectants and methods of rhizobial inoculation on soybeans "Glycine max" (L.) Merrill.

PLANT AND SOIL, 66 : 350-360

29

CHAO, W.L.; ALEXANDER, M.; 1982

Influence of soil characteristics on the survival of "Rhizobium" in soil undergoing drying.

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 46 : 949-952

30

CHAO, W.L.; ALEXANDER, M.; 1984

Mineral soil as carriers for "Rhizobium" inoculants.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 47(1) : 94-97

31

CHIRIFE, J.; 1983

A survey of existing sorption data.

**PHYSICAL PROPERTIES OF FOODS, ED. R. JOWITT, F. ESCHER, B. HALLSTROM
H.F.T. MEFFERT, W.E.L. SPIESS, APPL. SCI. PUBLISHERS : 55-64**

32

CRAWFORD, S.L.; BERRYHILL, D.L.; 1983

Survival of "Rhizobium phaseoli" in coal-based legume inoculants applied to seeds.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 45 : 703-705

33

CRIST, D.K.; WYZA, R.E.; MILLS, K.K.; BAUER, W.D.; EVANS, W.R.; 1984

Preservation of "Rhizobium" viability and symbiotic infectivity by suspension in water.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 47(5) : 895-900

34

CROWE, J.H.; CROWE, M.L.; CHAPMAN, D.; 1984
Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose.
SCIENCE, 223 : 701-703

35

CROZAT, Y.; CLEYET-MAREL, J.C.; GIRAUD, J.J.; OBATON, M.; 1982
Survival rates of "Rhizobium japonicum" populations introduced into different soils.
SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 14 : 401-405

36

CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.N.; 1984
The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in "Rhizobium".
SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 48 : 1273-1276

37

DAGNELIE, P.; 1984
Théorie et méthodes statistiques. Vol I : 378p & Vol II 463p
PRESSES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

38

DALTON, D.A.; EVANS, H.J.; HANUS, F.J.; 1985
Stimulation by nickel of soil microbial urease activity and urease and hydrogenase activities in soybeans grown in a low-nickel soil.
PLANT AND SOIL, 88, 245-258

39

DANSO, S.K.A.; ALEXANDER, M.; 1974
Survival of two strains of "Rhizobium" in soils.
SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA PROC., 38 : 86-89

40

DATE, R.A.; 1972
Sources and quantities of yeast extract for growth of "Rhizobia".
JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 35 : 461-464

41

DATE, R.A.; ROUGHLEY, R.J.; 1977
Preparation of legume seed inoculants.
A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, SECT. IV : 243-275
ED. HARDY, R.W.F.; GIBSON, A.H.

42

DAVIDSON, F.; REUSZER, H.W.; 1978

Persistence of "Rhizobium japonicum" on the soybean seed-coat under controlled temperature and humidity.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 35(1) : 84-96

43

DE CARVALHO, M.M.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G.; ANDREW, C.S.; 1982

Lack of effect of toxic aluminium concentrations on nitrogen fixation by nodulated "Stylosanthes" species.

PLANT AND SOIL, 66 : 225-231

44

DE CARVALHO, M.M.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; ANDREW, C.S.; 1982

Effects of aluminium on nodulation of two Stylosanthes species grown in nutrient solution.

PLANT AND SOIL, 64 : 141-152

45

DE CARVALHO, M.M.; EDWARDS, G.G.; ANDREW, C.S.; ASHER, C.J.; 1981

Aluminium toxicity, nodulation, and growth of "Stylosanthes" species.

AGRONOMY JOURNAL, 73 : 261-265

46

DE VALDES, G.; DE GIORI G.S.; DE RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G.; 1985

Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 49 : 413-415

47

DESCHODT, C.C.; STRIJDOM, W.B.; 1976

Suitability of a coal-bentonite base as carrier of "Rhizobia" in inoculants.

PHYTOLACTICA, 8 : 1-6

48

DEVINE, T.E.; 1984

Inheritance of soybean nodulation response with a fast-growing strain of "Rhizobium".

THE JOURNAL OF HEREDITY, 75 : 359-361

49

DEVINE, T.E.; BREITHAUPT, B.H.; 1981

Frequencies of nodulation response alleles, Rj2 and Rj4, in soybean plant introduction and breeding lines.

TECHNICAL BULLETIN 1628, U.S. DEPT. OF AGRICULTURE

50

DEVINE, T.E.; BREITHAUPT, B.H.; KUYKENDALL, L.D.; 1981
Tests for diffusible compound endowing rj1-incompatible strains of "Rhizobium japonicum" with the ability to nodulate the rjlrj1 soybean genotype.
CROP SCIENCE, 21 : 696-699

51

DEVINE, T.E.; BREITHAUPT, B.H.; 1980
Phenotypical thermal stability of rhizobitoxine-induced chlorosis and the nodulation controlling gene, rj1.
CROP SCIENCE, 20 : 394-396

52

DEVINE, T.E.; KIANG, Y.T.; GORMAN, M.B.; 1984
Simultaneous genetic mapping of morphological and biochemical traits in the soybean.
THE JOURNAL OF HEREDITY, 75 : 311-312

53

DEVINE, T.E.; KUYKENDALL, L.D.; BREITHAUPT, B.H.; 1983
Nodule-like structures induced on peanut by chlorosis producing strains of "Rhizobium" classified as "R. japonicum".
CROP SCIENCE, 23 : 394-397

54

DEVINE, T.E.; PALMER, R.D.; BUZZEL, R.I.; 1983
Analysis of genetic linkage in the soybean.
THE JOURNAL OF HEREDITY, 74 : 457-460

55

DIATLOFF, A.; 1986
Compatibility of systemic and non systemic fungicides with "Rhizobium japonicum" applied to soybean seed.
SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 18(1) : 121-122

56

DILWORTH, J.M.; WILLIAMS, D.C.; 1966
Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparation from "Clostridium pasteurianum".
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 48 : 31-36

57

DOMMARGUES, Y.R.; DIEM, H.G.; DIVIES, C.; 1979
Polyacrylamide-entrapped "Rhizobium" as an inoculant for legumes.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 37 : 779-781

- 58
DOWDLE, S.F.; BEN BOHLOOL, B.; 1985
Predominance of fast-growing "Rhizobium japonicum" in a soybean field in the People's Republic of China.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 50(5) : 1171-1176
- 59
DUNIGAN, E.P.; SOBER, O.B.; RABB, J.L.; BOQUET, D.J.; 1980
Effects of various inoculants on nitrogen fixation and yield of soybeans.
LOUISIANA STATE UNIVERSITY BULLETIN 726 : 16p
- 60
DUNLAP, V.J.; CSONKA, L.N.; 1985
Osmotic regulation of L-proline transport in "Salmonella newport".
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 163 : 296-304
- 61
DYE, M.; 1982
A note on some factors affecting the survival of "Rhizobium" cultures during freeze-drying and subsequent storage.
JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 58 : 517-524
- 62
EASTIN, E.F.; 1978
Total nitrogen determination for plant material containing nitrate.
ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 85 : 591-594
- 63
EL HALOUI, N.E.; 1985
Incidences de la mobilité et du chimiotactisme sur la compétitivité chez "Rhizobium meliloti".
THESE DE 3^{ème} CYCLE (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE)
- 64
EL HALOUI, N.E.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R.; 1986
Compétitivité pour l'infection entre souches de "Rhizobium meliloti"
Rôle de la mobilité.
PLANT AND SOIL, 95 : 337-344
- 65
ELEGBA, A.S.; RENNIES, R.J.; 1984
Effect of different inoculant adhesive agents on Rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene reducing) activity of soybeans ("Glycine max" (L.) Merrill).
CANADIAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE, 64 : 631-636

66

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S.; 1971
State of development description for soybeans, "Glycine max" (L.)
Merrill.
CROP SCIENCE, 11 : 929-931

67

FOULDS, W.; 1971
Effect of drought on three species of "Rhizobium".
PLANT SOIL, 35 : 665-667

68

FRASER, M.E.; 1975
A method of culturing "Rhizobium meliloti" on porous granules to form a
pre-inoculant for lucerne seed.
JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 39 : 345-351

69

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; Mc COY, E.; 1932
In "root nodule bacteria and leguminous plants".
University of Wisconsin Press, Madison

70

FUHRMANN, J.; WOLLUM II, A.G.; 1985
Simplified enzyme-linked immunosorbent assay for routine identification
of "Rhizobium japonicum" antigens.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 49(4) : 1010-1013

71

GANGAWANE, L.V.; SALVE, P.B.; 1985
Pesticidal effects on "Rhizobium" and nitrogen fixation in legumes - a
review
PROC. SYMP. ASSESS. ENVIRON. POLLUT., 239-252

72

GEORGE, T.; BEN BOHLOOL, B.; SINGLETON, P.W.; 1987
"Bradyrhizobium japonicum"- environment interactions : nodulation and
interstrain competition in soils along an elevational transect.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 53(5) : 1113-1117

73

GIBSON, A.H.; 1977
The influence of the environment and managerial practices on the
legume-"Rhizobium" symbiosis
A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, SECT. IV : 393-451
ED. HARDY, R.W.F.; GIBSON, A.H.

74

GOLLOBIN, G.S.; LEVIN, R.A.; 1974
Streptomycin resistance in "Rhizobium japonicum".
ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, 101 : 83-90

75

GRAHAM, P.H.; 1969
Selective medium for growth of "Rhizobia".
APPLIED MICROBIOLOGY, 17 : 769-

76

HABTE, M.; 1985
Selective medium for recovering specific populations of "Rhizobia"
introduced into tropical soils.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 50(6) : 1553-1555

77

HAHN, M.; STUDER, D.; 1986
Competitiveness of a nif- "Bradyrhizobium japonicum" mutant against the
wild type strain.
FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 33 : 143-148

78

HALVERSON, L.J.; STACEY, G.; 1986
Signal exchange in plant-microbe interactions.
MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 50(2) : 193-225

79

HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.D.; 1973
Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen
fixation.
SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 5 : 47-81

79 Bis

HEATHERLY, L.G.; SCIUMBATO, G.L.; 1986
Effect of Benomyl fungicide and irrigation on soybean yield and yield
components.
CROP SCIENCE, 26 : 352-355

80

HITBOLD, A.E.; THURLOW, D.L., SKIPPER, H.D.; 1980
Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques.
AGRONOMY JOURNAL, 72 : 675-681

81

HOCKING, A.D.; 1986

Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 132 : 269-275

81 Bis

HOSSAIN, A.K.; ALEXANDER, M.; 1984

Enhancing soybean rhizosphere colonization by "Rhizobium japonicum".

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 48 (3) : 468-472

82

HUNT, P.G.; WOLLUM, A.G.; MATHENY; T.A.; 1981

Effects of soil water on "Rhizobium japonicum" infection, nitrogen accumulation, and yield in bragg soybeans.

AGRONOMY JOURNAL, 73 : 501-505

83

ISRAEL, D.W.; BURTON, J.W.; WILSON, R.F.; 1985

Studies on genetic male-sterile soybeans.

PLANT PHYSIOLOGY, 78 : 762-767

84

ISWARAN, V.; APTE, R.; SEN, A.; 1973

A simple medium for quick growth of "Rhizobium japonicum".

ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE II, 128 (5), 23-24

85

JANSEN VAN RENSBURG, H.; STRIJDOM, B.W.; 1982

Competitive abilities of "Rhizobium meliloti" strains considered to have potential as inoculants.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 44(1) : 98-106

86

JANSEN VAN RENSBURG, H.; STRIJDOM, B.W.; 1985

Effectiveness of "Rhizobium" strains used in inoculants after their introduction into soils.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 49(1) : 127-131

87

JANSEN VAN RENSBURG, H.; STRIJDOM, B.W.; 1980

Survival of fast and slow-growing "Rhizobium" spp. under conditions of relatively mild desiccation.

SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 12 : 353-356

88

JARVIS, S.C.; HATCH, D.J.; 1985

Rates of nitrogen ion efflux by nodulated legumes grown in flowing solution culture with continuous pH monitoring and adjustment.

ANNALS OF BOTANY, 55 : 41-51

89

JONES, R.A.; GIDDENS, J.E.; 1985

Tolerance of soybean "Rhizobia" to soil acidity.

PERTANIK, 8(3) : 311-315

90

JORDAN, D.C.; 1982

Transfer of "Rhizobium japonicum" Buchanan 1980 to "Bradyrhizobium" gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 32(1) : 136-139

91

JUNG, G.; MUGNIER, J.; 1983

Préparation d'inoculums à faible activité de l'eau et résistance à la température et à la réhydratation.

BREVET EUROPEEN, N° 0 083 267 A1

92

JUNG, G.; MUGNIER, J.; 1981

Préparation d'inoculums à longue viabilité et résistance à la température améliorée et produits ainsi obtenus.

BREVET FRANCAIS, N° 81 24403

93

KANDASAMY, R.; PRASAD, N.N.; 1971

Lignite as a carrier of "Rhizobia".

CURRENT SCIENCE, 40 : 496

94

KEULS, M.; 1952

The use of studentized range in connection with an analysis of variance.

EUPHYTICA, 1 : 112-122

95

KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N.; 1979

Tolerance of "Rhizobia" to acidity, aluminium and phosphate.

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 43 : 519-523

96

KEYSER, H.H.; VAN BERKUM, P.; WEBER, D.F.; 1982

A comparative study of the physiology of symbioses formed by "Rhizobium japonicum" with "Glycine max", "Vigna unguiculata", and "Macroptilium atropurpureum".

PLANT PHYSIOLOGY, 70 : 1626-1630

97

KHALASSI, M.; 1985

Sélection d'une souche acido-tolérante de "Rhizobium japonicum".

DEA, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

98

KILBERTUS, G.; PROTH, J.; MANGENOT, F.; 1977

Sur la répartition et la survivance des microorganismes du sol. Etude électronique.

BULL. ACAD. SOC. LORRAINES DES SCIENCES, XVI(3) :93-103

99

KILBERTUS, G.; PROTH, J.; VERVIER, B.; 1979

Effets de la dessiccation sur les bactéries gram-négatives d'un sol.

SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 11 : 109-114

100

KOSSLAK, R.M.; BEN BOHLOOL, B.; DOWDLE, S.; SADOWSKY, M.J.; 1983

Competition of "Rhizobium japonicum" strains in early stages of soybean nodulation.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 46(4) : 870-873

101

KOSSLAK, R.M.; BEN BOLHOOL, B.; 1985

Influence of environmental factors on interstrain competition in "Rhizobium japonicum".

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 49(5) : 1128-1133

102

KREMER, R.J.; PETERSON H.L.; 1983

Effects of carrier and temperature on survival of "Rhizobium" spp in legume inocula : development of an improved type of inoculant.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 45(6) : 1790-1794

103

KUYKENDALL, L.D.; DEVINE, T.E.; CREGAN, P.B.; 1982

Positive role of nodulation on the establishment of "Rhizobium japonicum" in subsequent crops of soybean.

CURRENT MICROBIOLOGY, 7 : 79-81

104

LA FAVRE, A.K.; EAGLESHAM, R.J.; 1986

The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of "Bradyrhizobia".

CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 32(1) : 22-27

105

LAIRD, D.J.; 1932

Bacteriophage and the root nodule bacteria.

ARCH. MIKROBIOL., 3, 159-193

106

LANG, K.W.; STEINBERG, M.P.; 1983

Characterization of polymer and solute bound water by pulsed NMR.

JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 48 : 517-520

107

LE RUDULIER, D.; BERNARD, T.; 1986

Salt tolerance in "Rhizobium" : a possible role for betaines.

FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, 39 : 67-72

108

LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P.; MAUPERIN, C.; 1985

Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels.

CANADIAN JOURNAL OF BOTANY, 63(9) : 1664-1668

109

LENNOX, L.B.; ALEXANDER, M.; 1984

Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of "Phaseolus vulgaris" by "Rhizobium phaseoli".

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 41(2) : 404-411

110

LIE, T.A.; AKKERMANS, A.D.L.; VAN EGERAAT, A.W.S.M.; 1984

Natural variation in symbiotic nitrogen-fixing "Rhizobium" and "Frankia" spp.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, 50 : 489-503

111

LIEBERMAN, M.T.; ZABLOTOWICZ, R.M.; DAVIS-OMHOLT, N.; 1986

Improved method of typing "Bradyrhizobium japonicum" in soybean nodules.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 51(4)

112

LOWENDORF, H.S.; 1980

Factors affecting survival of "Rhizobium" in soil.

ADVANCES IN MICROBIOLOGICAL ECOLOGY, 4 : 87-124

113

MACKAY, M.A.; NORTON, R.S.; BOROWITZKA, L.L.; 1984

Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 130 : 2177-2191

114

MARTENS, R.; 1982

Apparatus to study the quantitative relationships between root exudates and microbial populations in the rhizosphere.

SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 14 : 315-317

115

MARTENSSON, A.M.; GUSTAFSSON, J.G.; 1985

Competition between "Rhizobium trifolii" strains for nodulation, during growth in a fermenter, and in soil-based inoculants studied by ELISA.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 131 : 3077-3082

116

MARY, P.; 1983

Influence de l'activité de l'eau sur la conservation et la croissance de "Rhizobium meliloti".

THESE DE 3^{ème} CYCLE (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE)

117

MARY, P.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R.; 1986

Growth status of "Rhizobia" in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses.

SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 18(2) : 179-184

118

MARY, P.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R.; 1985

Rates of drying and survival of "Rhizobium meliloti" strains during storage at different relative humidities.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 50 : 207-211

119

MATERON, L.A.; WEAVER, R.W.; 1985

Inoculant maturity influences survival of "Rhizobia" on seed.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 49(2) : 465-467

120

McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W.; VOLK, R.J.; 1980
Evaluation of the relative ureide content of the xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans.
PLANT PHYSIOLOGY, 66 : 720-725

121

MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F.; 1985
Production and storage of "Rhizobium leguminosarum" cell concentrates for use as inoculants.
JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 58 : 517-524

122

MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J.E.; MULLER, M.; 1983
A major error in the reduction assay : decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions.
JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, 34 : 641-649

123

MUCHOVEJ, R.M.C.; BORGES, A.C.; NOVAIS, R.F.; THIEBAUT, J.T.L.; 1986
Effect of liming levels and Ca : Mg ratios on yield, nitrogen content and nodulation of soyabeans grown in acid Cerrado soils.
JOURNAL OF SOIL SCIENCE, 37 : 235-240

124

MUGNIER, J.; JUNG, G.; 1985
Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymers gels.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 50(1) : 108-114

124 bis

MULTON, J.L.; BIZOT, H.; MARTIN, G.;
Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.
Tome IV, 1 : Eau (dosage, sorption et a.).
ED. TECHNIQUES ET DOCUMENTATION ; APRIA^w; FRANCE

125

MUNEVAR, F.; WOLLUM, A.G.; 1981
Growth of "Rhizobium japonicum" strains at temperature above 27°C.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 42 : 272-276

126

MURPHY, H.E.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; 1984
Effects of aluminium on nodulation and early growth of four tropical pasture legumes.
AUSTRALIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, 35 : 663-673

127

MYTTON, L.R.; 1984

Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation.

PLANT AND SOIL, 82 : 329-335

128

NANGJU, D.; 1980

Soybean response to indigeneous "Rhizobia" as influenced by cultivar origin.

AGRONOMY JOURNAL, 72 : 403-406

129

NEWMAN, D; 1939

The distribution of range in samples from a normal population expressed in terms of an independent estimate of standard deviation.

BIOMETRIKA, 31 : 20-30

130

NICOLAIDIS, M.; 1987

Applications de la RMN en levurerie.

MEMOIRE D'INGENIEUR C.N.A.M.; LILLE : 181 p

131

NICOLAIDIS, M.J.; 1986

La reconnaissance "Rhizobium meliloti"-luzerne : rôle d'une lectine végétale et des polysaccharides bactériens.

MEMOIRE D'INGENIEUR C.N.A.M.; LILLE : 162 p

132

NOEL, K.D.; BRILL, W.J.; 1980

Diversity and dynamics of indigeneous "Rhizobium japonicum" populations.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 40(5) : 931-938

133

NORMAN, A.G.; 1942

Persisistence of "Rhizobium japonicum" in soil.

J. AM. SOC. AGRON., 34 : 499

134

NUTMAN, P.S.; 1969

Symbiotic nitrogen fixation : Legume nodule bacteria.

ROTHAMSTED REPORT FOR 1968, part 2 : 179-181

135

OCHIN, D.; 1980

La production en masse et la préparation de cellules déshydratées de "Rhizobium".

THESE DE 3^{ème} CYCLE (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE)

136

OCHIN, D.; TAILLIEZ, R.; GUILLAUME, J.B.; 1985

Etude expérimentale de la symbiose entre la luzerne et "Rhizobium meliloti". Mise au point d'une miniserre.

PLANT AND SOIL, 84 : 29-35

137

OCHIN, D.; TAILLIEZ, R.; GUILLAUME, J.B.; 1986

Conservation de la viabilité de "Rhizobium meliloti" par atomisation.

BIO-SCIENCE, 5 : 179-183

138

PARKE, D.; RIVELLI, M.; ORNSTON, L.N.; 1985

Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids : comparison of "Bradyrhizobium japonicum" and "Rhizobium trifolii".

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 163(2) : 417-422

139

PARKER, C.A.; TRINICK, M.J.; CHATEL, D.L.; 1977

"Rhizobia" as soil and rhizosphere inhabitants.

A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, SECT. IV : 311-352

ED. HARDY, R.W.F.; GIBSON, A.H.

140

PATTERSON, T.G.; LARUE, T.A.; 1983

N₂ fixation (C₂H₂) and ureide content of soybeans : ureides as an index of fixation.

CROP SCIENCE, 23 : 825-831

141

PATTISON, A.C.; SKINNER, F.A.; 1974

The effects of antimicrobial substances on "Rhizobium" spp. and their use in selective media.

JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 37 : 239-250

142

PAULING; 1952

PROC. NAT. ACAD. SCI. U.S. 38 : 112

143

PENA CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M.; 1979

Survival of "Rhizobium" in soils undergoing drying.

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL, 43 : 962-966

144

PETERSON, H.L.; LOYNACHAN, T.E.; 1981

The significance and application of "Rhizobium" in agriculture.

INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY, SUP.13 : 311-331

145

PHILPOTTS, H.; 1976

Filter mud as a carrier for " Rhizobium" inoculants.

JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 41 : 277-281

146

PRIOR, B.A.; KENYON, C.P.; VAN DER VEEN, M.; MILDENHALL, J.P.; 1987

Water relations of solute accumulation in "Pseudomonas fluorescens".

JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 62 : 118-128

147

PUGASHETTI, B.K.; GOPALGOWDA, H.S.; PATIL, R.B.; 1971

Cellulose powder as legume inoculant base.

CURRENT SCIENCE, 40 : 494-495

148

RACCA, R.W; 1980

Nouvelles techniques pour l'étude in vitro de la formation des nodosités chez le soja (*Glycine max* (L.) Merr.).

COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES DE PARIS, SER.D, 291 : 311

149

ROBERT, F.M.; SCHMIDT, E.L.; 1983

Population changes and persistence of "Rhizobium phaseoli" in soil rhizospheres.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 45(2) : 550-556

150

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R.; 1987

Survival strategies of bacteria in the natural environment.

MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 51(3) : 365-379

151

ROUGHLEY, R.J.; 1968

Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture.

JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 31 : 259-265

152

ROUGHLEY, R.J.; 1976

The production of light quality inoculants and their contribution to legume yield.

in **"SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS"**

Ed. NUTMAN, P.S.; University Press Cambridge : 125-136

153

ROUGHLEY, R.J.; VINCENT, J.M.; 1967

Growth and survival of "Rhizobium" spp in peat culture.

JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 95 : 362-376

154

RUIZ-SAINZ, J.E.; BELLOGIN, R.A.; GUTIERREZ-NAVARRO, A.M.; PEREZ-SILVA, J.; 1986

Cysteine and toxicity of the fungicides Captan and Captafol on "Rhizobium".

MICROBIOS, 46 : 71-86

155

SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BEN BOHLOOL, B.; 1983

Biochemical characterization of fast and slow-growing "Rhizobia" that nodulate soybeans.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 33(4) : 716-722

156

SAMSON, C.; MONTANGE, D.; BEUNARD, P.; 1984

Influence du pH du milieu nutritif sur la fixation de l'azote par l'association "Glycine max"- "Rhizobium japonicum".

L'AGRONOMIE TROPICALE, 39(2) : 149-152

157

SCHWINGHAMER, E.A.; 1977

Genetic aspect of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbionts.

A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, Section III BIOLOGY : 577-622

ED. HARDY, R.W.F. & GIBSON A.H.

158

SCOTT, W.J.; 1958

The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 19 : 624-633

159

SHUMAN, L.M.; 1985

Evaluation of liming and magnesium materials for increasing soil pH and available magnesium.

COMMUNICATIONS IN SOIL SCIENCE AND PLANT ANALYSIS, 16(10) : 1053-1070

160

SKINNER, F.A.; ROUGHLEY, R.J.; CHANDLER, M.R.; 1977

Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in "Rhizobium" spp.

JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 43 : 287-297

161

SMITH, R.S.; ELLIS, M.A.; SMITH, R.E.; 1981

Effect of "Rhizobium japonicum" rates on soybean nodulation in a tropical soil.

AGRONOMY JOURNAL, 73 : 505-508

162

SOBY, S.; BERGMAN, K.; 1983

Mobility and chemotaxis of "Rhizobium meliloti" in soil.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 46(5) : 995-998

163

SOMASEGARAN, P.; 1985

Inoculant production with diluted liquid cultures of "Rhizobium" spp and autoclaved peat : Evaluation of diluents, "Rhizobium" spp., peats, sterility requirements, storage and plant effectiveness.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 50(2) : 398-405

164

SOMASEGARAN, P.; HALLIDAY, J.; 1982

Dilution of liquid "Rhizobium" cultures to increase production capacity of inoculant plants.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 44(2) : 330-333

165

SOMASEGARAN, P.; REYES, V.G.; HOBEN, H.J.; 1984

The influence of high temperatures on the growth and survival of "Rhizobium" spp. in peat inoculants during preparation, storage and distribution.

CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 30(1) : 23-30

166

SPIESS, W.E.L.; WOLF, W.R.; 1983

The results of the COST 90 project on water activity.

PHYSICAL PROPERTIES OF FOODS, ED. R. JOWITT, F. ESCHER, B. HALLSTROM
H.F.T. MEFFERT, W.E.L. SPIESS, APPL. SCI. PUBLISHERS : 65-91

166 Bis

STANLEY, J; BROWN, G.G.; VERMA, D.P.S.; 1985

Slow growing "Rhizobium japonicum" comprises two highly divergent symbiotic types.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 163(1) : 148-154

167

STOWERS, M.D.; 1985

Carbon metabolism in "Rhizobium" species.

ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, 39 : 89-108

168

STOZKY, G.; 1986

Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses.

in "INTERACTIONS OF SOIL MINERALS WITH NATURAL ORGANISMS & MICROBES"

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA Spec. Pub., 17 : 305-427

170

STREETER, J.G.; 1985

Accumulation of α , β -trehalose by "Rhizobium" bacteria and bacteroids.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 164(1) : 78-84

171

STRIJDOM, B.W.; DESCHODT, C.C.; 1976

Carriers of "Rhizobia" and the effects of prior treatment on the survival of "Rhizobia".

in "SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS"

Ed. NUTMAN, P.S.; University Press Cambridge : 151-168

172

STRIJDOM, B.W.; VAN RENSBURG, H.J.; 1981

Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of "Rhizobium" inoculants.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 41 : 1344-1347

173

SUBBA RAO, N.S.; LAKSHMI-KUMARI, M.; SINGH, C.S.; MAGU, S.P.; 1972

Nodulation of lucerne ("Medicago sativa L.") under the influence of sodium chloride.

INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE, 42 : 384-386

174

TALBOTT, H.J.; KENWORTHY, W.J.; LEGG, J.O.; 1982
Field comparison of the nitrogen-15 and different methods of measuring
nitrogen fixation.
AGRONOMY JOURNAL, 74 : 799-804

175

TESFAI, K.; MALLIK, M.A.B.; 1986
Effect of fungicide application on soybean-"Rhizobia" symbiosis and
isolation of fungicide-resistant strains of "Rhizobium japonicum".
BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, 38 : 819-836

176

THEVELEIN, J.M.; 1984
Regulation of trehalose mobilization in fungi.
MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 48(1) : 42-59

177

TILAK, K.V.B.R.; SUBBA RAO, N.S.; 1978
Carriers for legume inoculants.
FERTILISER NEWS, 23 : 25-28

178

TRIPLETT, E.W.; 1986
Two indirect methods for detecting ureide synthesis by nodulated
soybeans.
PLANT PHYSIOLOGY, 81 : 566-571

179

TUZIMURA, K.; WATANEBE, I.; SHI, J.F.; 1966
Different growth and survival of "Rhizobium" species in the rhizosphere
of various plants in different sorts of soil.
SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION, 12 : 99-106

180

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C.; 1983
Autoanalytical procedure for the determination of allantoin and
allantoic acid in soybean tissue.
PLANT PHYSIOLOGY, 73 : 511-513

181

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C.; WEBER, D.F.; CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H.; 1985
Relationship between ureide N and N₂ fixation, aboveground N
accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and
field studies with "Glycine max L. (Merr)".
PLANT PHYSIOLOGY, 77 : 53-58

182

VINCENT, J.M.; 1982

The genus "Rhizobium". part 67 : 818-841

"The prokaryotes - a Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria." Eds. STAZRR, M.P.; STOLP, H.; TRUPPER, H.G.; BALOWS, A.; SHEGEL, H.G. Springer Verlag Berlin, Heidelberg & N.Y.

183

WALKER, R.H.; BROWN, P.E.; 1935

The number of "Rhizobium meliloti" and "Rhizobium trifolii" in soils as influenced by soil management practices.

J. AM. SOC. AGRON., 27 : 289-296

184

WATT, I.C.; 1983

The theory of water sorption by biological materials.

PHYSICAL PROPERTIES OF FOODS, ED. R. JOWITT, F. ESCHER, B. HALLSTROM
H.F.T. MEFFERT, W.E.L. SPIESS, APPL. SCI. PUBLISHERS : 27-41

185

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R.; DUMENIL, L.C.; 1972

Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of "Rhizobium japonicum" in Iowa soils.

SOIL SCIENCE, 114 : 137-141

186

WEBB, S.J.; 1964

Bound water, metabolites, and genetic continuity.

NATURE, 203 : 374-377

187

WEBB, S.J.; 1961

Factors affecting the viability of air-borne bacteria : the effect of desiccation on some metabolic systems of "Escherichia coli".

CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGIE, 7 : 621-632

188

WEBB, S.J.; 1967

Mutation of bacterial cells by controlled desiccation.

NATURE, 213 : 1137-1139

189

WILKINSON, J.F.; 1958

The extracellular polysaccharides of bacteria.

BACTERIOLOGICAL REVIEWS, 128 : 215-218

190

WRIGHT, S.F.; FOSTER, J.G.; BENNETT, O.L.; 1986

Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of "Rhizobium trifolii".

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 52(1) : 119-123