

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour le titre de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : **Microbiologie**

par

**Mohieddine BOUMAHDI**

**EVOLUTION DES TAUX DE SURVIE ET DES ACIDES GRAS  
CELLULAIRES DE *RHIZOBIACEAE* AU COURS DES STRESS DE  
DESSICCATION**

soutenue le 04 avril 1997 devant la Commission d'Examen

Président: Pr. R. TAILLIEZ, Université de Lille I

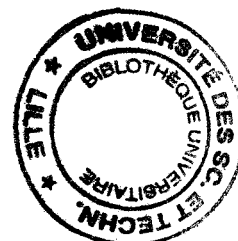
Rapporteurs: Pr P. VASSEUR, Centre des Sciences de l'Environnement (Metz)

Pr G. PRENSIER, Université de Clermont Ferrand

Examineurs: Pr J.P. HORNEZ, Université de Lille I

Pr M. SANCHOLLE, Université du Littoral (Calais)

Dr C. DEFIVES, Université de Lille I



*A mes Parents, Bouchaib, M'Hammed, El Mostafa, mes autres Frères et Soeurs et  
ma Femme Caroline*

## REMERCIEMENTS

*Cette Thèse a été effectuée au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université des Sciences et Technologie de Lille, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ. Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour tout l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de recherche. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait de présider la Commission d'Examen.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur P. MARY, Maître de Conférences à l'I.U.T. « A » de Lille I Département de Biologie Appliquée pour sa participation active à la réalisation de ce travail. Ton soutien et tes conseils scientifiques m'ont guidé durant ces années de Thèse. J'ai également beaucoup apprécié ta lecture critique du manuscrit et les corrections que tu m'as permis d'apporter.*

*Tous mes remerciements à Madame le Professeur P. VASSEUR (Centre des Sciences de l'Environnement (Metz)) et à Monsieur le Professeur G. PRENSIER (Université de Clermont-Ferrand) pour tout l'intérêt que vous témoignez pour mes recherches en acceptant d'en être les Rapporteurs.*

*Je remercie Monsieur C. DEFIVES, Maître de Conférence à l'I.U.T. « A » de Lille I Département de Biologie Appliquée pour m'avoir initié aux techniques de préparation et d'observation en microscopie électronique. Je le remercie également pour sa participation au Jury.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur J-P. HORNEZ, Professeur à l'Université de Lille I, pour avoir accepté de juger cette thèse.*

*Je remercie Monsieur M. SANCHOLLE, Professeur à l'Université du Littoral (Calais), d'accepter de juger ce travail; je lui suis reconnaissant pour m'avoir initié aux techniques chromatographiques appliqués aux acides gras.*

*Je n'oublie pas tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille et en particulier Monsieur M. BECHET et Madame C. DOLHEM-BIREMON qui m'ont apporté aide et sympathie.*

## RESUME

L'influence de l'âge physiologique sur la survie des souches de *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* après dessiccations et conservations prolongées à cinq Humidités Relatives (H.R.(s)) a été étudiée. Une analyse de l'évolution des acides gras (A.G.(s)) au cours de ces stress a été menée afin d'établir une éventuelle corrélation entre degré d'insaturation des A.G.(s) et tolérance à la dessiccation.

Au cours de la croissance, les (brady)rhizobia régulent le degré d'insaturation de leurs A.G.(s). Celui-ci est maximal en phase exponentielle de croissance. Les plus grandes variations sont observées au niveau du C18:1w7c et du C19:0 cyclo 11-12. Cependant, l'évolution des degrés d'insaturation est liée aux variations du C16:0.

Les degrés d'insaturation diminuent pendant la dessiccation. La voie anaérobie de synthèse des A.G.(s) semble stoppée et la voie aérobie prend le relais. Une augmentation des A.G.(s)  $\leq$  à 15 atomes de carbone et du C16:0 ou du C18:0 est enregistrée à toutes les H.R.(s) testées. Une conversion du C18:1w7c en C19:0 cyclo 11-12 est observée aux H.R.(s)  $\geq$  à 68%. Une diminution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du milieu de culture s'accompagne d'une baisse du degré d'insaturation.

La dessiccation n'affecte pas la survie des (brady)rhizobia. Cependant, ces bactéries sont particulièrement sensibles à la conservation à différentes H.R.(s). L'H.R. optimale de conservation est de l'ordre de 43%. Les cellules en fin de phase de latence présentent une tolérance améliorée à la conservation. Parmi les souches testées, *R. meliloti* est le plus tolérant à la conservation. Il ne semble pas exister de corrélation nette entre les degrés d'insaturation et la tolérance à la dessiccation ou la conservation en l'état déshydraté.

La lyse bactérienne n'est pas la cause principale des mortalités observées. Les stress de dessiccation semblent induire un état viable mais non cultivable. Les bactéries sous cette forme sont cependant incapables de noduler la plante hôte.

Mots clés: *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, humidité relative, activité de l'eau, acides gras, dessiccation, degré d'insaturation, déshydratation.

## SUMMARY

The effect of the physiological state on the behaviour of *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* against desiccation and protracted storage at five Relative Humidities (R.H.(s)) was studied. Analysis of Cellular Fatty Acids (C.F.A.(s)) evolution during these stresses was conducted in order to find a possible correlation between the degree of unsaturation of C.F.A.(s) and tolerance against desiccation.

During the course of growth in liquid medium, (brady)rhizobia adjusted their degree of unsaturation. The greatest degree was found during the exponential phase of growth. Great variations in C.F.A.(s) composition were found at the C18:1w7c and C19:0 cyclo 11-12 levels. However, the evolution of the degree of unsaturation was mainly associated with the variation of the C16:0 level.

The degree of unsaturation was found to decrease during the desiccation steps. The anaerobic way of biosynthesis was probably stopped in favour of the aerobic way. An increase in C.F.A.(s)  $\leq$  to C15:0 and C16:0 or C18:0 levels was noted at all the R.H.(s) tested. At R.H.  $\geq$  to 68%, proportion of C19:0 cyclo 11-12 increased at the expense of C18:1w7c. Reduction of the medium water activities led to a decrease in the degree of unsaturation.

The desiccation step didn't affect directly the survival rates of (brady)rhizobia. However, they are particularly susceptible to storage at different R.H.(s). The optimum R.H. level for storage was generally 43%. Cells harvested at the end of the lag phase survived better than the cells collected at the other phases of growth. *Rhizobium meliloti* was found to be more tolerant during storage than bradyrhizobia. No clear relationship was found between degree of unsaturation and tolerance against desiccation and storage at different H.R.(s).

The observed death of cells was not associated with rupture of cells envelopes. Desiccation stresses seemed to induce a Viable but Non Culturable state. However, these bacteria were unable to nodulate the host plant.

# Table des matières

---

**Partie I : Généralités**

---

I- EVOLUTIONS TAXONOMIQUES AU SEIN DE LA FAMILLE DES <i>RHIZOBIACEAE</i>	4
II- PROPRIETES DES SOLUTIONS AQUEUSES ET ACTIVITE DE L'EAU	13
1- <u>Activité de l'eau (<math>a_w</math>) et potentiel chimique (<math>\mu_w</math>)</u>	13
2- <u>Activité de l'eau et pression osmotique</u>	13
3- <u>Potentiel matriciel</u>	15
4- <u>Potentiel de l'eau</u>	16
5- <u>Potentiel chimique et hydrique de la vapeur d'eau</u>	16
III- TOLERANCE DES MICRO-ORGANISMES A LA DESSICCATION: ASPECTS GENERAUX	19
IV- TOLERANCE A LA DESSICCATION CHEZ LES <i>RHIZOBIACEAE</i> : FACTEURS INHERENTS A LA BACTERIE	22
1- <u>Tolérance à la dessiccation des (brady)rhizobia suivant les groupes d'inoculation     et les souches</u>	22
2- <u>Influence de l'âge physiologique sur la tolérance des (brady)rhizobia à la     dessiccation</u>	25
3- <u>Production de polysaccharides extracellulaires et tolérance à la dessiccation</u>	27
4- <u>Formation de microcolonies et/ou de biofilms</u>	30
5- <u>Changement de morphologie et réponses physiologiques au stress de privations     nutritionnelles : acquisition de résistance à différents stress</u>	31
V- CONDITIONS RENCONTREES DANS LES SOLS ET TOLERANCE A LA DESSICCATION CHEZ LES <i>RHIZOBIACEAE</i>	33
1- <u>Aridité du site d'origine des souches de (brady)rhizobia</u>	33

2- <u>Déshydratations et réhydratations cycliques</u> .....	34
3- <u>Rapidité de la déshydratation et survie des (brady)rhizobia</u> .....	34
4- <u>Croissance en milieu de faible activité de l'eau (<math>a_w</math>) et tolérance à la dessiccation</u> .....	36
5- <u>Effet de la température sur la survie des (brady)rhizobia et leur tolérance à la dessiccation</u> .....	37
6- <u>Nature et texture des sols et survie des (brady)rhizobia</u> .....	38
<b>VI- CROISSANCE SOUS ACTIVITE DE L'EAU (<math>A_w</math>) REDUITE</b> .....	41
1- <u>Activité de l'eau de croissance de quelques micro-organismes</u> .....	41
2- <u>Effet de l'<math>a_w</math> sur les (brady)rhizobia</u> .....	44
<b>VII- QUELQUES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES POUVANT INTERVENIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION</b> .....	45
1- <u>Osmorégulation de l'espace périplasmique chez les rhizobia</u> .....	45
2- <u>Accumulation de solutés compatibles</u> .....	47
<b>VIII- LES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES ET LEUR RÔLE DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE BACTERIENNE LORS DE STRESS POUVANT ETRE LIES DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT A LA DESSICCATION</b> .....	52
1- <u>Structure et composition des lipides membranaires chez les <i>Rhizobiaceae</i></u> .....	52
a- Les acides gras (A.G.).....	52
b- Les phospholipides.....	58
c- Les hopanoides.....	59
2- <u>Quelques notions sur la synthèse des A.G. insaturés</u> .....	60
3- <u>Différents facteurs pouvant influencer l'état des lipides membranaires</u> .....	62
a- Age physiologique.....	63
b- Facteur nutritionnel.....	65
c- Température.....	67
d- Diminution de l' $a_w$ des milieux de culture et dessiccation.....	69



---

## Partie II : Matériels & Méthodes

---

I- MATERIEL BACTERIEN ET TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	71
1- <u>Origine des souches</u> .....	71
2- <u>Milieux</u> .....	71
a- Milieu Yeast Extract Mannitol (Y.E.M.) .....	71
b- Tampon de Non.Prolifération (T.N.P.) .....	72
3- <u>Cultures et dénombrements bactériens</u> .....	72
a- Précultures .....	72
b- Cultures .....	72
c- Dénombrements.....	73
II- METHODES DE DETERMINATION DES GROUPES D'HOMOLOGIE D'ADN DES SOUCHES DE <i>BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM</i>	73
III- TEST DE NODULATION	74
1- <u>Milieu de NICOL ET THORNTON</u> .....	74
2- <u>Culture aseptique de la luzerne et du soja</u> .....	74
a- Stérilisation et germination des graines .....	75
b- Culture en tube.....	75
IV- METHODES D'ETUDE DE LA DESSICCATION ET DE LA CROISSANCE SOUS Aw(s) REDUITES	76
1- <u>Solutions permettant l'obtention d'Humidités Relatives (H.R.(s)) fixes et   constantes à une température donnée</u> .....	76
2- <u>Protocole expérimental de la dessiccation</u> .....	78
4- <u>Réalisation des milieux pour l'étude de la croissance sous a<sub>w</sub>(s) réduites</u> .....	81
V- METHODE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ACIDES GRAS	82

1- <u>Préparation des réactifs</u> .....	82
2- <u>Procédures d'extraction (Fig. 8)</u> .....	82
3- <u>Analyse chromatographique des A.G.(s)</u> .....	85
a- <u>Caractéristiques de l'appareil utilisé</u> .....	85
b- <u>Conditions opérationnelles</u> .....	85
<b>VI- METHODE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE</b>	<b>87</b>

---

## Partie III : Résultats & Discussion

---

I- IDENTIFICATION DES SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA	89
1- <u>Identification des souches de <i>Bradyrhizobium</i> par le profil des résistances aux antibiotiques</u> .....	89
2- <u>Identification des souches de <i>Rhizobium meliloti</i>, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Bradyrhizobium elkanii</i> par les profils des acides gras cellulaires</u> .....	91
II- EVOLUTION DES A.G.(S) LORS DE LA CROISSANCE EN MILIEU LIQUIDE DES (BRADY)RHIZOBIA	94
1- <u>Croissance et degré d'insaturation</u> .....	95
2- <u>Croissance et évolution quantitative des acides gras prépondérants</u> .....	97
III- DEGRES D'INSATURATION DES A.G.(S) DES SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA OBSERVES AVANT DESSICCATION ET TAUX DE SURVIE JUSTE APRES DESSICCATION: INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE	100
1- <u>Degrés d'insaturation des A.G.(s) des souches de (brady)rhizobia observés aux trois phases de croissances retenues</u> .....	100
2- <u>Taux de survie des (brady)rhizobia après dessiccation sous différentes H.R.(s)</u> .....	103
a- Effet de la dessiccation sous différentes H.R.(s) sur la survie des souches de (brady)rhizobia .....	103
b- Effet de l'âge physiologique sur la survie de souches de (brady)rhizobia juste après dessiccation sous différentes H.R.(s).....	105
3- <u>Recherche d'une éventuelle corrélation entre taux de survie juste après dessiccation et degré d'insaturation avant dessiccation</u> .....	108
IV-DETERMINATION DES DEGRES D'INSATURATION ET PROFILS QUANTITATIF ET QUALITATIF DES A.G.(S) OBSERVES JUSTE APRES DESSICCATION DES (BRADY)RHIZOBIA: EFFET DE L'H.R. ET DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE	108

1- <u>Détermination des degrés d'insaturation des A.G.(s) de souches de (brady)rhizobia juste après dessiccation</u> .....	108
2- <u>Profils qualitatif et quantitatif des A.G.(s) observés chez les (brady)rhizobia juste après dessiccation</u> .....	114
 V- ETUDE DES CINETIQUES DE SURVIE DE SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA DESHYDRATEES ET CONSERVEES A DIFFERENTES HUMIDITES RELATIVES. RECHERCHE D'UNE CORRELATION AVEC LES DEGRES D'INSATURATION DES A.G.(S) JUSTE APRES DESSICCATION ET APRES 40 JOURS DE CONSERVATION	126
A- CINETIQUES DE SURVIE	126
1- <u>Comparaison de la tolérance à différentes H.R.(s) de <i>R. meliloti</i> RCR 2011, <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 et <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2</u> .....	126
2- <u>Humidités Relatives optimales de conservation des (brady)rhizobia</u> .....	127
3- <u>Influence de l'âge physiologique sur la survie des (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)</u> .....	129
4- <u>Allure générale des cinétiques de survie des (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)</u> .....	133
5- <u>Etude particulière de l'aspect biphasique des cinétiques de survie chez <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 à l'état déshydraté</u> .....	135
a- <u>Essai de sélection d'une souche anhydro-tolérante</u> .....	135
b- <u>Influence de la concentration cellulaire initiale sur la survie de <i>R. meliloti</i> RCR 2011</u> .....	137
B- RECHERCHE D'UNE CORRELATION AVEC LES DEGRES D'INSATURATION	141
1- <u>Degré d'insaturation juste après dessiccation et cinétiques de survie durant la conservation de cellules de (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)</u> .....	141
2- <u>Evolution des degrés d'insaturation après quarante jours de conservation à différentes H.R.(s)</u> .....	144
 VI- ETUDE DES DEGATS CELLULAIRES APRES DESSICCATION ET CONSERVATION	147
1- <u>Appréciation des taux de survie par la mobilité bactérienne</u> .....	147
2- <u>Etude des dégâts cellulaires en microscopie électronique à balayage</u> .....	151

3- <u>Etude de la nodulation des cellules réhydratées issues d'échantillons de</u> <u><i>Rhizobium meliloti</i> conservés quarante jours à différentes H.R.(s)</u> .....	156
---	-----

VII- DETERMINATION DES DEGRES D'INSATURATION APRES CULTURE DES (BRADY)RHIZOBIA A $A_w(S)$ REDUITES	157
---	-----

1- <u>Détermination des paramètres de croissance</u> .....	157
--	-----

2- <u>Evolution du degré d'insaturation</u> .....	163
---	-----

---

<b>Conclusion Générale</b>	<b>166</b>
----------------------------	------------

---

<b>Références Bibliographiques</b>	<b>169</b>
------------------------------------	------------

---

<b>Annexes</b>	<b>190</b>
----------------	------------

---

## Liste des illustrations

---



---

## Liste des illustrations (figures)

---



---

<b>Figure 1:</b> Arbre phylogénétique, basé sur les séquences de la petite sous unité 16S de l'ARNr des <i>Rhizobiaceae</i> et de quelques bactéries proches (YOUNG et HAUKKA, 1996) .....	7
<b>Figure 2:</b> Temps de survie de quelques espèces représentatives de procaryotes après séchage à l'air sur différent supports (d'après POTTS, 1994). L'échelle de temps est logarithmique (minute à 1000 ans).....	20
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique de la formation des A.G.(s) méthylés et méthoxylés à partir de leurs précurseurs C19:0 cyclo, C17:0 cyclo et C18:1 (D'après ORGAMBIDE <i>et al.</i> , 1993 a)	
<b>Figure 4:</b> Structure des triterpénoides identifiés chez les bradyrhizobia. I, squalène; II, hopène; III, Diploptérol; IV hopanoïde substitué (R= polyol) (d'après KANNENBERG <i>et al.</i> , 1995).....	59
<b>Figure 5:</b> Les voies aérobie et anaérobie de synthèse et d'incorporation des acides gras dans les phospholipides d'après KEWELOH et HEIPIEPER (1996). PL, phospholipides; ACP, acyl carrier protein; HDD, $\beta$ -hydroxydecanoyl-ACP-dehydratase.....	61
<b>Figure 6:</b> Schéma du procédé de culture des plantules.....	76
<b>Figure 7:</b> Protocole expérimental de dessiccation.....	80
<b>Figure 8:</b> Protocole d'extraction des acides gras.....	84
<b>Figure 9 :</b> Evolution du degré d'insaturation (●) au cours de la croissance (○) des (brady)rhizobia. Moyenne sur 3 répétitions $\pm$ l'intervalle de confiance (P = 0,05).....	96
<b>Figure 10:</b> Evolution des A.G.(s) majeurs (■: C16:0; ▲: C18:1; □: C19:0 cyclo) au cours de la croissance ( $\Delta$ ) des (brady)rhizobia.....	98
<b>Figure 11:</b> Degrés d'insaturation chez les trois souches de (brady)rhizobia observés pour trois phases de croissances. Moyenne sur trois répétitions $\pm$ intervalle de confiance (P = 0.05).....	101
<b>Figure 12 :</b> Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions $\pm$ intervalle de confiance (P=0,05).....	110
<b>Figure 13 :</b> Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions $\pm$ intervalle de confiance (P=0,05).....	111

<b>Figure 14 :</b> Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions $\pm$ intervalle de confiance (P=0,05).....	112
<b>Figure 15:</b> Comportement de <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 selon l'âge physiologique ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	130
<b>Figure 16 :</b> Comportement de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 selon l'âge physiologique ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	131
<b>Figure 17 :</b> Comportement de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 selon l'âge physiologique ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	132
<b>Figure 18:</b> Effet d'un double cycle de déshydratation-conservation ( $\triangle$ : premier cycle, $\blacksquare$ : deuxième cycle) à 3% d'H.R. (a) et 43% d'H.R. (b) sur les taux de survie de <i>R. meliloti</i> RCR 2011.....	138
<b>Figure 19:</b> Influence de la concentration cellulaire initiale ( $\triangle$ : $4,1 \times 10^9$ ; $\blacksquare$ : $3,9 \times 10^8$ et $\square$ : $4 \times 10^7$ ) sur la survie de <i>R. meliloti</i> RCR 2011 lors d'une conservation à 3% d'H.R. (a) et 43% (b) d'H.R.....	140
<b>Figure 20 :</b> Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	148
<b>Figure 21 :</b> Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	149
<b>Figure 22 :</b> Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 ( $\blacktriangle$ : fin de phase de latence; $\blacksquare$ : phase exponentielle et $\triangle$ : phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.....	150
<b>Figure 23:</b> Modélisation des courbes de croissance sous différentes $a_w$ à l'aide de l'équation de Gompertz (lignes continues) chez <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 ( $\blacklozenge$ : 0.999, $\blacksquare$ : 0.9928, $\blacktriangle$ : 0.9866, $\blacklozenge$ : 0.9804, et $\square$ : 0.969 d' $a_w$ ), <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 et <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 ( $\blacklozenge$ : 0.999, $\blacksquare$ : 0.996, $\blacktriangle$ : 0.990, $\blacklozenge$ : 0.984, $\square$ : 0.969).....	159
<b>Figure 24:</b> Evolution du degré d'insaturation des A.G.(s) lors de la croissance à différentes $a_w$ (s) chez <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 ( $\blacksquare$ ), <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011( $\blacklozenge$ ) et <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 ( $\blacktriangle$ ). .....	164



---



---

## Liste des illustrations (tableaux)

---



---

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques principales des rhizobia à croissance rapide et lente .....	5
<b>Tableau 2:</b> Caractéristiques des deux espèces <i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	9
<b>Tableau 3:</b> Classification des genres et espèces chez les <i>Rhizobiaceae</i> et leurs principales légumineuses hôtes d'après MARTINEZ-ROMERO et CABALLERO-MELLADO (1996) .....	11
<b>Tableau 4:</b> Liste des genres et espèces chez les <i>Rhizobiaceae</i> d'après YOUNG et HAUKKA (1996).....	12
<b>Tableau 5:</b> $a_w$ minimale de croissance des micro-organismes associés aux aliments d'après LEISTNER et RÖDEL .....	43
<b>Tableau 6:</b> Solutés compatibles récemment rapportés chez les procaryotes d'après CSONKA et HANSON (1991). .....	49
<b>Tableau 7:</b> Composition en Acides.Gras <sup>(a)</sup> . de différentes espèces du genre <i>Rhizobium</i> (JARVIS et TIGHE, 1994). .....	54
<b>Tableau 8:</b> Composition en Acides Gras <sup>(a)</sup> de différentes espèces du genre <i>Bradyrhizobium</i> (GRAHAM <i>et al.</i> , 1995). .....	55
<b>Tableau 9:</b> Activité de l'eau des solutions saturées pour trois températures. Collationne d'après les données les plus sûres de la littérature (selon BIZOT et al., 1978). .....	77
<b>Tableau 10:</b> Sels retenus pour obtenir les H.R.(s) voulues à 30°C. Quantités nécessaires à l'obtention des solutions saturées en g/100 ml d'eau distillée à 50°C.....	78
<b>Tableau 11:</b> Temps nécessaires à l'obtention des équilibres de déshydratation dans les enceintes aux différentes H.R.(s) étudiées .....	79
<b>Tableau 12:</b>	
<b>Tableau 13:</b> Concentrations en glycérol et NaCl, exprimées en %, pour obtenir des baisses d' $a_w$ (s) données .....	81
<b>Tableau 14:</b> Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à balayage selon Mc COWAN <i>et al.</i> (1978).....	88

<b>Tableau 15:</b> Profil de résistance aux antibiotiques de neuf souches de <i>Bradyrhizobium</i> et appartenance aux espèces <i>japonicum</i> ou <i>elkanii</i> d'après les travaux de KUYKENDALL <i>et al.</i> (1988 et 1992). .....	90
<b>Tableau 16:</b> Composition qualitative et quantitative des acides gras (exprimée en pourcentage des acides gras totaux détectés) de <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011 <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 et <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2 après culture en milieu gélosé (Y.E.M.). Comparaison avec les profils d'acides gras de ces genres et espèces décrits dans la littérature.....	92
<b>Tableau 17:</b> Degrés d'insaturation des A.G.(s) des souches de (brady)rhizobia pour les trois phases de croissance retenues .....	102
<b>Tableau 18:</b> Comparaison des taux de survie après déshydratation à différentes H.R.(s) selon l'âge physiologique chez <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i> .....	104
<b>Tableau 19:</b> Effet de l'âge physiologique sur les taux de survie de <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i> juste après dessiccation à différentes H.R.(s). .....	106
<b>Tableau 20:</b> Evolution des degrés d'insaturation des A.G.(s) de cellules de (brady)rhizobia après déshydratations: effet des H.R.(s) et des âges physiologiques .....	113
<b>Tableau 21:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>R. meliloti</i> RCR 2011 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05. ....	116
<b>Tableau 22:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>R. meliloti</i> RCR 2011 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	117
<b>Tableau 23:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>R. meliloti</i> RCR 2011 prélevées en phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05. ....	118
<b>Tableau 24:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. elkanii</i> USDA 120 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05. ....	119
<b>Tableau 25:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. elkanii</i> USDA 120 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	120
<b>Tableau 26:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. elkanii</i> USDA 120 prélevées en	

phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions $\pm$ écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	121
<b>Tableau 27:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. japonicum</i> 3-2 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions $\pm$ écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	122
<b>Tableau 28:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. japonicum</i> 3-2 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions $\pm$ écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	123
<b>Tableau 29:</b> Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de <i>B. japonicum</i> 3-2 prélevées en phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions $\pm$ écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.....	124
<b>Tableau 30:</b> Coefficients des équations de mortalité des (brady)rhizobia lors de la conservation à 30°C sous différentes H.R.(s) ( $k_1$ et $k_2$ coefficients observés pour la première et la seconde phase de décroissance respectivement).....	136
<b>Tableau 31:</b> Evolution des degrés d'insaturation après 40 jours de conservation à différentes H.R.(s). Comparaison avec les degrés d'insaturation observés juste après dessiccation.....	146
<b>Tableau 32:</b> Paramètres de croissance de <i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011, <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120 et <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2. à différentes $a_w$ : les valeurs sont établies à partir des équations modélisées de GOMPERTZ.....	161

# Introduction

Au même titre que l'eau, l'azote est considéré comme un facteur limitant pour le développement des plantes. La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le processus d'apport d'azote assimilable chez nombreux végétaux. Elle consiste en une réduction de l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ) par l'intermédiaire de réactions enzymatiques. Ce phénomène est uniquement bactérien. Les plantes qui utilisent l'azote atmosphérique doivent établir une association avec ces bactéries. A côté des micro-organismes fixateurs libres d'azote comme *Azotobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azospirillum*..., le sol abrite des microorganismes fixateurs d'azote symbiotiques, capables de vivre en association avec certaines plantes.

Ces bactéries appartiennent principalement aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* (famille des *Rhizobiaceae*), *Frankia* (actinomycètes), *Anabaena* et *Nostoc* (cyanobactéries). Une grande variété de plantes légumineuses et autres peuvent ainsi obtenir indirectement leur azote de l'air. En retour, la plante fournit aux bactéries les sources carbonées nécessaires à leur survie.

La fixation globale d'azote atmosphérique est estimée à 175 millions de tonnes par an. Les symbioses (brady) rhizobia - légumineuses assurent approximativement 40% de cette fixation biologique. En conditions de culture optimales, des fixations de 234, 208, 200 et 170 kg d'azote par hectare et par an sont rapportées pour le soja, la luzerne, le trèfle et le lupin respectivement (BROCKWELL et BOTTOMLEY, 1995).

En raison de la distribution naturelle et (ou) de l'introduction de la culture des légumineuses, les rhizobia et bradyrhizobia sont géographiquement largement répandus dans de nombreux sols (MARTINEZ-ROMERO et CABALLERO-MELLADO, 1996). Cependant, certains sols sont dépourvus de (brady) rhizobia suffisamment efficaces ou totalement exempts de l'hôte bactérien spécifiques de la légumineuse dont la culture est envisagée.

A titre d'exemple, *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sont totalement absents des sols somaliens (CIANI et DIRIYE, 1995). Il est donc souvent nécessaire d'avoir recours à l'inoculation artificielle des légumineuses par les (brady) rhizobia. L'utilisation de cette technique constitue une pratique agronomique moins coûteuse et généralement plus efficace que l'application d'engrais azoté notamment pour les pays en voie de développement (MARUFU *et al.*, 1995).

Parmi les souches indigènes, un certain nombre de caractères dont l'infectivité, l'efficacité, la compétitivité et la tolérance aux facteurs chimiques, physiques et biologiques du sol sont sélectionnés pour produire des inocula de qualité. De telles souches offrent en effet les meilleures chances de réussite lors d'une réintroduction massive au milieu d'origine par inoculation artificielle (STREETER, 1994; BROCKWELL et BOTTOMLEY, 1995). Une bonne survie des (brady) rhizobia durant la conservation des inocula, pendant les différentes étapes de l'inoculation puis une multiplication sur ou à proximité de la graine sont évidemment souhaitables (SMITH, 1992).

Parmi les facteurs physiques et chimiques, la dessiccation, la salinité et la température affectent la symbiose en général et plus particulièrement la survie et la multiplication de ces bactéries au cours des différentes étapes d'inoculation (BOTTOMLEY, 1992; GRAHAM, 1992; SCHUBERT, 1995).

Une analyse de la bibliographie, montre que de nombreuses controverses persistent quant au comportement des rhizobia à croissance rapide (*Rhizobium*) et lente (*Bradyrhizobium*) vis à vis de la dessiccation. De même, l'influence de l'âge physiologique des cellules de (brady) rhizobia sur leur tolérance à la dessiccation fait l'objet de nombreuses discussions. Le maintien de l'intégrité et de la fluidité des membranes cytoplasmique et externe et par voie de conséquence la composition en acides gras cellulaires doivent être de première importance dans la tolérance à la

dessiccation. Or la composition en acides gras des rhizobia diffère de celle des bradyrhizobia (JARVIS et TIGHE, 1994; GRAHAM *et al.*, 1995) et leurs compositions en acides gras varient en fonction de l'âge physiologique (MACKENZIE *et al.*, 1979; HUBAC *et al.*, 1992).

Nous nous proposons donc d'étudier l'influence de l'âge physiologique sur la survie de *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* après dessiccation et conservation prolongée à cinq Humidités Relatives (H.R.). Les activités de l'eau (aw) minimales de croissance ont été déterminées pour ces souches. Une analyse de l'évolution des acides gras cellulaires au cours de ces stress de dessiccation a été menée afin d'établir une éventuelle corrélation entre degré d'insaturation des acides gras et tolérance à la dessiccation.

# Généralités



## I- EVOLUTIONS TAXONOMIQUES AU SEIN DE LA FAMILLE DES *Rhizobiaceae*

Les premières recherches, menées en 1888, sur l'assimilation de l'azote atmosphérique au sein des nodules racinaires des légumineuses ont conduit à l'isolement et la culture d'une bactérie qui fut dans un premier temps dénommée *Bacillus radicolica*. Un an plus tard, les noms de genre et espèce, *Rhizobium leguminosarum* lui furent attribués.

Ce n'est qu'en 1932, qu'une première classification, basée sur des groupes d'inoculation croisée plantes/bactéries, a été décrite. Six espèces étaient alors reconnues: *Rhizobium leguminosarum* (nodulant les légumineuses *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens*), *Rhizobium trifolii* (*Trifolium*), *Rhizobium phaseoli* (*Phaseolus*), *Rhizobium meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *Rhizobium japonicum* (*Glycine max*) et *Rhizobium lupini* (*Lupinus*).

Il est cependant devenu rapidement évident que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* sont très diverses, tant dans leurs spécificités d'hôtes (une même souche de rhizobia peut noduler plusieurs légumineuses) que dans leurs propriétés physiologiques. Une nouvelle classification basée sur d'autres critères que le concept d'inoculation croisée devenait nécessaire pour rendre compte de la diversité de ces bactéries.

La vitesse de croissance *in vitro* fait partie de ces critères et permet de diviser les *Rhizobiaceae* en rhizobia à croissance rapide (*Rhizobium*) et rhizobia à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Les principales caractéristiques de ces deux genres sont rapportées dans le Tableau 1.

**Tableau 1:** Caractéristiques principales des rhizobia à croissance rapide et lente

Caractéristiques	Croissance rapide: <i>Rhizobium</i>	Croissance lente: <i>Bradyrhizobium</i>
Temps moyen de génération	< 6h	> 6h
Utilisation des hydrates de carbone	pentoses, hexoses, mono, di et trisaccharides	pentoses et hexoses uniquement
Voies métaboliques	EMP - faible activité ED - voie principale TCA - forte activité PP - présente	EMP - faible activité ED - voie principale TCA - forte activité cycle des hexoses
Type d'insertion des flagelles	péritriche	monotriche
Localisation des gènes symbiotiques	plasmides et chromosome	chromosome

EMP: voie Embden-Meyerhof-Parnas

ED : voie Entner-Doudoroff

TCA : cycle des acides tricarboxiliques

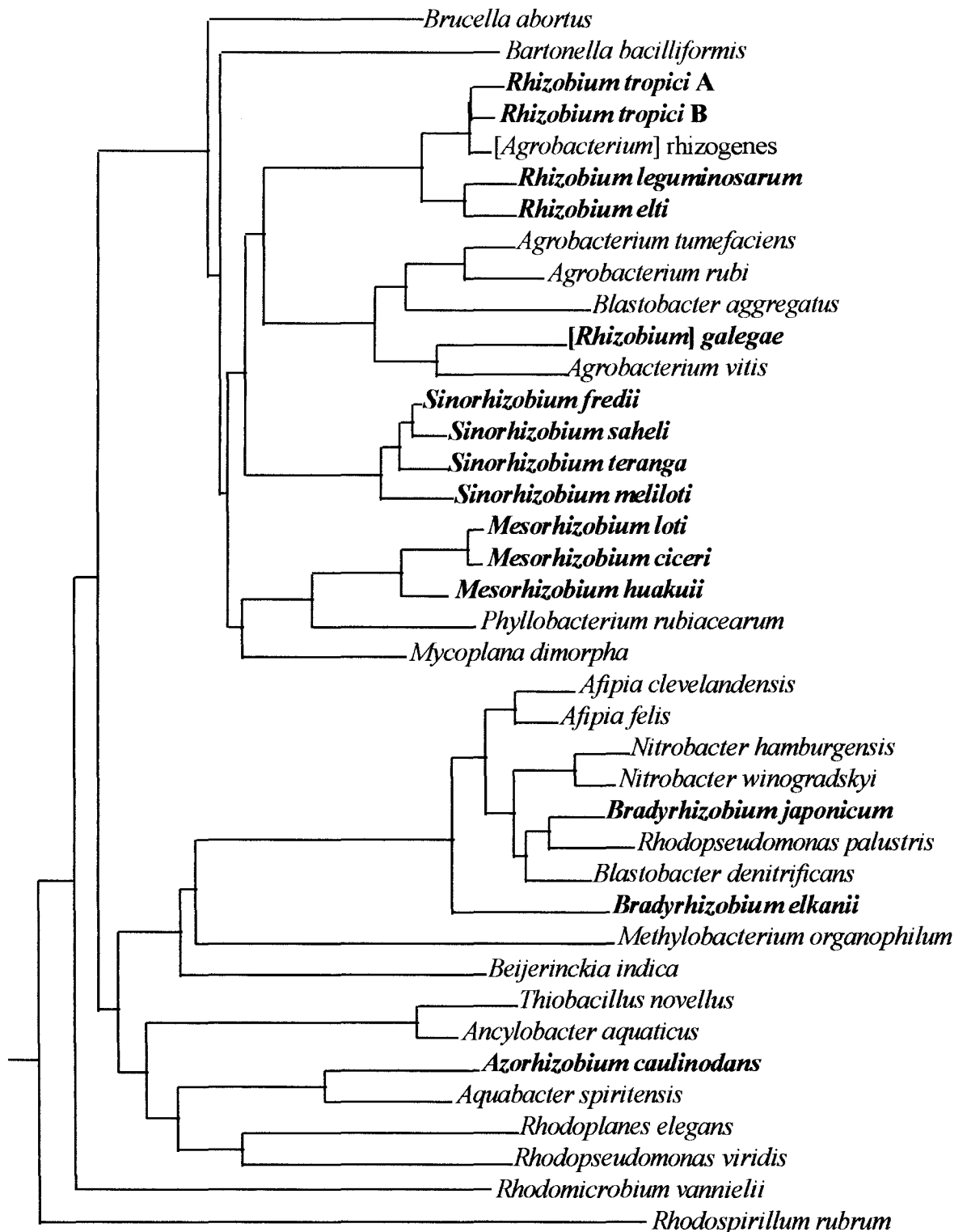
PP : voie des pentoses phosphate

D'autres méthodes permettent maintenant de bien les différencier. Elles regroupent la détermination du mol G+C pour cent de l'ADN, des études d'hybridations d'acides nucléiques, l'analyse des protéines par SDS-PAGE, les profils métaboliques, la composition chimique des polysaccharides extracellulaires, les spécificités sérologiques, la sensibilité aux antibiotiques...(JORDAN, 1984). Certaines espèces en attente de classification peuvent être rattachées à l'un ou l'autre de ces deux genres. JORDAN (1984) propose de les désigner *Rhizobium* sp. ou *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom de l'espèce végétale nodulée indiqué entre parenthèses [exemple: *R.* sp. (*Acacia*, *Leucaena*, *Prosopis*); *R.* sp. (*Neptunia*); *R.* sp. NGR 234; *B.* sp. (*Lupinus*); *B.* sp. (*Vigna*); *B.* sp. (*Lotus*); *B.* sp. (*Acacia*)].

Depuis 1991, les séquences des gènes codant pour les ARNr 16S de nombreuses espèces appartenant aux *Rhizobiaceae* ont été déterminées. L'analyse de ces séquences a permis de mieux appréhender la phylogénie de ces bactéries et aboutit à une division en trois genres principaux: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (YOUNG et HAUKKA, 1996; Figure 1)

*Azorhizobium caulinodans* est la seule espèce du genre *Azorhizobium*, et présente la particularité de noduler les tiges et les racines de *Sesbania rostrata*. Il s'agit d'une bactérie à croissance rapide mais incapable d'utiliser la plupart des hydrates de carbone et possédant un flagelle latéral contrairement au genre *Rhizobium*.

Les premières études, portant sur l'hétérogénéité de l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* ont été rapportées dès 1981 par HOLLIS *et al.* (1981). Ces auteurs ont classé les souches en deux groupes d'homologie d'ADN (I ou Ia et II). Ces groupes ont ensuite été différenciés par la composition des polysaccharides excrétés, l'expression d'une activité nitrogénasique ex-planta (HUBER *et al.*, 1984), la résistance aux antibiotiques et la composition des acides gras membranaires (KUYKENDALL *et al.*, 1988).



**Figure 1:** Arbre phylogénétique, basé sur les séquences de la petite sous unité 16S de l'ARNr des *Rhizobiaceae* et de quelques bactéries proches (YOUNG et HAUKKA, 1996)

KUYKENDALL *et al.*(1992) ont proposé de classer les souches appartenant au groupe d'homologie II (et IIa) dans une nouvelle espèce: *Bradyrhizobium elkanii*. L'espèce *B. elkanii* est reconnue depuis avril 1993 (Int. J. Syst. Bacteriol. **43**: 398-399). Les caractéristiques des deux espèces *B. japonicum* et *B. elkanii* sont regroupées dans le tableau 2.

Des études menées au sein de notre laboratoire ont par ailleurs montré que ces deux espèces bactériennes diffèrent également par leur comportement d'adhésion sur racines de *Glycine max* (L.) Merr. (DOLHEM-BIREMON *et al.*, 1993) et l'expression d'un récepteur bactérien de type lectinique spécifique du galactose (DOLHEM-BIREMON *et al.*, 1995).

Récemment, l'espèce *Bradyrhizobium liaoningense* a été proposée sur des critères d'hybridation ADN-ADN et un taux de croissance exceptionnellement lent pour un bradyrhizobia. La séquence des gènes codant pour l'ARNr 16S n'étant que partiellement décrite, cette espèce n'a pas été répertoriée dans l'arbre phylogénétique (Figure 1) établi par YOUNG et HAUKKA (1996).

Il existe également de nombreuses souches appartenant au genre *Bradyrhizobium* mais ne nodulant pas le soja. Aucun nom d'espèce ne leur a été affecté. Elles sont connues sous le nom *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom de la légumineuse nodulée entre parenthèses. Elles seront éventuellement rattachées aux espèces *japonicum*, *elkanii* ou une nouvelle espèce sur la base de leurs caractères génétiques. Il est en effet non satisfaisant de les exclure a priori sur la base de la spécificité d'hôte seulement.

L'analyse de l'arbre phylogénétique (Figure 1) montre très clairement que le genre *Rhizobium* pris dans son acceptation actuelle regroupe en fait au moins quatre genres différents. Les chefs de file sont *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium loti* et *Rhizobium galegae*.

**Tableau 2:** Caractéristiques des deux espèces *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*

Caractéristiques	<i>B. japonicum</i>	<i>B. elkanii</i>
Groupes d'homologie d'ADN (HOLLIS <i>et al.</i> , 1981)	Groupe I et Ia	Groupe II et IIa
Composition des EPS (HUBER <i>et al.</i> , 1984)	Glc, Man, GalUA, Gal (4-O-Me-Gal)	Rha, 4-O-Me-GlcUA
Activité nitrogénasique ex-planta (HUBER <i>et al.</i> , 1984)	non	oui
Composition des acides gras membranaires (KUYKENDALL <i>et al.</i> , 1988)	3,6 % de C16:1C 8,8 % de C16:0 1,2 % de C19:0 cyclopropane 81,2 % de C18:1 1,3 % de C16:1 <i>cis</i> 9	0,5 % de C16:1 11,1 % de C16:0 24,7 % de C19:0 cyclopropane 62,3 % de C18:1 0,8 % de C17:0 cyclopropane
Sensibilité ou résistance aux antibiotiques (en µg/ml):		
Rifampicine (500)		
Tétracycline (100)		
Streptomycine (100)	Sensible à ces concentrations	Résistante à ces concentrations <sup>a</sup>
Chloramphénicol (500)		
Erythromycine (250)		
Carbénicilline (500)		
Acide nalidixique (50)		
(KUYKENDALL <i>et al.</i> , 1988)		

<sup>a</sup>: sauf les 2 souches du groupe IIa USDA 94 et USDA 119 qui sont car<sup>s</sup> et nal<sup>s</sup>.

Les espèces *R. leguminosarum*, *R. tropici* et *R. elti* forment un groupe homogène et conserveront la dénomination *Rhizobium*. *Agrobacterium rhizogènes* appartient sans conteste à ce groupe et sera fort probablement transféré dans le genre *Rhizobium*.

DE LAJUDIE *et al.* (1994) ont proposé de transférer *R. meliloti* et *R. fredii* dans le genre *Sinorhizobium* à côté des espèces *S. teranga* et *S. saheli*.

Depuis longtemps, *Rhizobium loti* est considéré comme étant tout à fait distinct des autres rhizobia à croissance rapide. *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri* mais également *Rhizobium tianshanense* et *Rhizobium mediterraneum* appartiennent au groupe *R. loti*. Il semble exister actuellement un consensus pour attribuer un nouveau nom de genre à ce groupe. Le genre « *Mesorhizobium* » a été proposé en raison du taux de croissance intermédiaire (entre celui des rhizobia et des bradyrhizobia) observé chez les souches de ce groupe.

*Rhizobium galegae* semble marginal au sein des *Rhizobium* et serait plus en rapport avec certaines espèces d'*Agrobacterium*. La similitude des séquences n'est cependant pas suffisamment étroite pour transférer *R. galegae* dans le genre *Agrobacterium*. Cette espèce reste en attente de classification.

Une Classification des rhizobia et de leurs principales légumineuses hôtes est présentée dans le Tableau 3 (MARTINEZ-ROMERO et CABALLERO-MELLADO, 1996). Les principaux changements et/ou propositions de changements taxonomiques sont rapportés dans le Tableau 4 (YOUNG et HAUKKA, 1996).

En conclusion, les rhizobia ne forment pas un groupe phylogénétique unique. L'aptitude à établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec les légumineuses semble être le seul dénominateur commun à l'appartenance à la famille des *Rhizobiaceae*. L'espèce *Rhizobium* sp. NGR 234 constitue à ce titre une exception car il s'agit de la seule espèce capable de noduler *Parasponia* un genre végétal n'appartenant pas à la famille des légumineuses.

**Tableau 3:** Classification des genres et espèces chez les *Rhizobiaceae* et leurs principales légumineuses hôtes d'après MARTINEZ-ROMERO et CABALLERO-MELLADO (1996)

Espèces <sup>a</sup>	Légumineuse hôtes principale
<i>Rhizobium meliloti</i> <sup>b</sup>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>R. fredii</i> <sup>b</sup>	<i>Glycine max</i> et <i>G. soja</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i> <sup>b</sup>	<i>Acacia</i> et <i>Sesbania</i>
<i>S. teranga</i> <sup>b</sup>	<i>Acacia</i> et <i>Sesbania</i>
<i>R. leguminosarum</i>	
bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia</i> et <i>Pisum</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> et <i>Leucaena</i>
<i>R. elti</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> et <i>G. orientalis</i>
<i>R. loti</i> <sup>c</sup>	<i>Lotus</i> spp.
<i>R. huakuii</i> <sup>c</sup>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>G. max</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>

<sup>a</sup> D'autres espèces sont décrites: *R. ciceri* nodulant *Cicer arietinum* et « *R. tianshanense* » nodulant *Glycine max*.

<sup>b</sup> Le genre proposé *Sinorhizobium* a été proposé pour rassembler *R. meliloti*, *R. fredii* et les espèces *S. teranga* et *S. saheli*.

<sup>c</sup> Il a été proposé de transférer les espèces *R. loti* et *R. huakuii* dans un nouveau genre (« *Mesorhizobium* »).



**Tableau 4:** Liste des genres et espèces chez les *Rhizobiaceae* d'après YOUNG et HAUKKA (1996).

---

***Rhizobium***

*R. leguminosarum*

*R. tropici*

*R. elti*

***Sinorhizobium***

*S. meliloti*

*S. fredii*

*S. saheli*

*S. teranga*

**« *Mesorhizobium* »**

[*Rhizobium*] *loti*

[*Rhizobium*] *huakuii*

[*Rhizobium*] *ciceri*

[*Rhizobium*] *tianshanense*

[*Rhizobium*] *mediterraneum*

**Autre genre**

[*Rhizobium*] *galegae*

***Bradyrhizobium***

*B. japonicum*

*B. elkanii*

*B. liaoningense*

***Azorhizobium***

*A. caulinodans*

---

## II- PROPRIETES DES SOLUTIONS AQUEUSES ET ACTIVITE DE L'EAU

L'eau possède des propriétés très spécifiques qui la distinguent et la rendent le solvant le plus répandu dans la nature. Elle possède une chaleur de vaporisation élevée, une haute conductivité thermique, et un pouvoir de solvation unique due à sa petite taille. Son caractère polaire facilite la diffusion et l'interaction avec des substances polaires. Comme sa constante diélectrique est élevée, les ions sont mieux dissous. A 20°C la constante diélectrique de l'eau est de 80,2 alors que pour l'hexane elle est de 1,87 (la force attractive entre les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  est donc 43 fois supérieure dans l'hexane, entraînant ainsi une faible dissolution de ces ions).

### 1- Activité de l'eau ( $a_w$ ) et potentiel chimique ( $\mu_w$ )

L'activité de l'eau est définie par:

$$a_w = \gamma_w N_w \quad (1)$$

ou  $N_w$  est la fraction molaire de l'eau dans la solution et  $\gamma_w$  le coefficient d'activité. Le potentiel chimique ( $\mu_w$ ) est définie en thermodynamique par:

$$\mu_w = \mu_w^* + RT \ln a_w + \bar{V}_w P \quad (2)$$

ou  $\mu_w^*$  représente le potentiel standard de l'eau, R la constante des gaz parfaits, T la température,  $\bar{V}_w P$  représente l'effet de la pression sur le potentiel chimique,  $\bar{V}_w$  le volume molaire partiel (légèrement différent du volume molaire de l'eau à l'état pur) et P la pression hydrostatique.

### 2- Activité de l'eau et pression osmotique

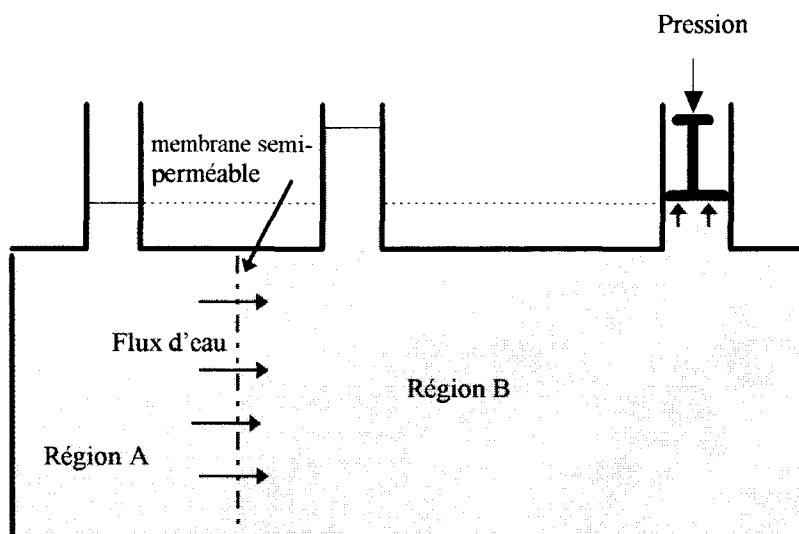
La présence de soluté dans une solution aqueuse diminue l'activité de l'eau et augmente la pression osmotique ( $\Pi$ ). Ces deux paramètres sont interdépendants:

$$RT \ln a_w = -\bar{V}_w \Pi \quad (3)$$

Dans (2) la substitution de  $RT \ln a_w$  par  $-\bar{V}_w \Pi$  donne:

$$\mu_w = \mu_w^* - \bar{V}_w \Pi + \bar{V}_w P \quad (4)$$

La mesure de la pression osmotique peut être réalisée à l'aide d'un osmomètre.



Ce schéma indique le principe d'un osmomètre: Il est composé d'une membrane semi-perméable (laisse passer seulement l'eau) qui sépare deux compartiments l'un contenant l'eau pure (Région A) l'autre contenant un soluté dissous (Région B). L'eau diffuse vers le compartiment où elle est la moins concentrée (de A vers B), ceci provoque un déplacement de la solution dans les deux colonnes de droite jusqu'à l'équilibre des pressions hydrostatiques (P) et osmotiques ( $\Pi$ ). La pression exercée sur la colonne de droite permettant de ramener la solution au même niveau que la colonne de gauche, sera égale à la pression osmotique.

L'ajout d'un soluté dans une solution entraîne un changement des propriétés colligatives de solvant. Son point de congélation et sa pression de vapeur sont abaissés, alors que le point d'ébullition et la pression osmotique vont croître, cette variation est due au changement dans le potentiel chimique du solvant ( $\mu$ ).

Dans l'expression de la pression osmotique, on peut remplacer l'activité de l'eau par la fraction molaire (l'activité de l'eau pure est égale à l'unité).

La fraction molaire d'un composé est le rapport du nombre de moles de ce composé par rapport au nombre total de moles de tous les composés dans

le système. La fraction molaire du solvant (eau) peut alors être exprimée de la façon suivante:

$$N_w = \frac{n_w}{n_w + \sum_j n_j} = 1 - \frac{\sum_j n_j}{n_w + \sum_j n_j} \quad (5)$$

$n_w$  est le nombre de moles d'eau et  $n_j$  le nombre de moles du soluté  $j$ .

Dans le cas des solutions diluées (solution idéale):

$$\ln a_w \cong \ln N_w = \ln \left( 1 - \frac{\sum_j n_j}{n_w + \sum_j n_j} \right) \quad (6)$$

$$\ln \left( 1 - \frac{\sum_j n_j}{n_w + \sum_j n_j} \right) \cong - \frac{\sum_j n_j}{n_w + \sum_j n_j} \cong - \frac{\sum_j n_j}{n_w} \quad (7)$$

Cette relation montre que quand  $\sum_j n_j \rightarrow 0$  (absence de soluté)  $\ln a_w \rightarrow 0$ .

c.-à-d.  $a_w \rightarrow 1$ .

L'incorporation de l'approximation (7) dans l'équation (3) donne:

$$\Pi_s \cong - \frac{RT}{V_w} \left( - \frac{\sum_j n_j}{n_w} \right) = RT \sum_j \frac{n_j}{V_w n_w} = RT \sum_j c_j \quad (8)$$

C'est ce qu'on appelle la relation de Van't Hoff,  $c_j$  représente la concentration de  $j$ . Cette relation n'est valable que dans le cas des solutions idéales ( $\gamma_w=1$ ).

### **3- Potentiel matriciel**

Le potentiel matriciel  $\tau$  est appelé aussi pression matricielle. Il concerne les interactions avec les surfaces. La présence de particules dans l'eau

entraîne une chute de l'activité de l'eau en plus de la baisse due au soluté dissous. La pression osmotique ( $\Pi$ ) s'écrit de la manière suivante.

$$\Pi = -\frac{RT}{\bar{V}_w} \ln \gamma_w N_w = -\frac{RT}{\bar{V}_w} \ln \gamma_w - \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln N_w = \tau + \Pi_s \quad (9)$$

ou  $\Pi_s$ : pression osmotique de tous les solutés.

#### **4- Potentiel de l'eau**

$(\mu_w - \mu_w^*)$  représente le travail nécessaire pour déplacer une mole d'eau d'un point du système (à pression et température constantes) vers un pool d'eau pure (dans les mêmes conditions de pression et de température).

La transformation de l'équation (4) qui donne:

$$(\mu_w - \mu_w^*) = \bar{V}_w (P - \Pi) \quad (10)$$

permet de définir le potentiel hydrique ( $\Psi$ ):

$$\Psi = \frac{\mu_w - \mu_w^*}{\bar{V}_w} = P - \Pi \quad (11)$$

Une augmentation de la pression hydrostatique ( $P$ ) augmente la valeur du potentiel hydrique, alors qu'une augmentation de la pression osmotique réduit celui-ci. On peut aussi écrire l'équation (11) sous la forme:

$$\Psi = \Psi_P + \Psi_{\Pi} \quad (12)$$

ou  $\Psi_P$  est appelé potentiel hydrostatique et  $\Psi_{\Pi}$  le potentiel osmotique.

#### **5- Potentiel chimique et hydrique de la vapeur d'eau**

On peut considérer que les molécules d'eau dans une solution aqueuse passent en continu dans la phase gazeuse environnante, et dans le même temps d'autres molécules d'eau se condensent pour passer dans la phase liquide: ces échanges dépendent de l'activité chimique de l'eau dans les deux phases. L'équilibre est atteint quand la différence de transition d'une phase à l'autre est nulle.

La pression partielle exercée à l'équilibre par la vapeur d'eau pure est appelée pression de vapeur saturante. La pression de vapeur dépend de la

température et de la nature de la solution, mais est indépendante de la quantité de liquide ou de vapeur.

Quand l'air ambiant est saturé de vapeur d'eau (humidité relative =100%), la phase gazeuse possède la pression de vapeur la plus élevée (à cette température). Des tables de valeurs (DUPRE) donne les pression de vapeur d'eau en fonction de la température. Par exemple la pression de vapeur qui est de 0,61 kPa à 0°C est de 7,38 kPa à la température 40°C.

Quand on ajoute un soluté dans une solution aqueuse les molécules d'eau auront moins tendance à passer en phase gazeuse: l' $a_w$  baisse de même que la pression de vapeur. Pour les solutions diluées, la pression partielle de vapeur d'eau ( $P_{wv}$ ) à l'équilibre est une fonction linéaire de la fraction molaire de l'eau ( $N_w$ ) en phase liquide. selon la loi de RAOULT pour l'eau pure  $N_w=1$ , et  $P_{wv}$  atteint sa valeur maximale appelée pression de vapeur saturante ( $P_{wv}^*$ ). Le potentiel chimique de l'eau peut s'écrire de la manière suivante:

$$\mu_{wv} = \mu_{wv}^* + RT \ln \frac{P_{wv}}{P_{wv}^*} \quad (13)$$

Si on considère que la vapeur d'eau n'est pas un gaz parfait, le concept de pression de vapeur ( $P_{wv}$ ) doit être remplacé par celui de fugacité ( $f_{wv}$ ) introduit par Lewis avec:

$$f_w = \gamma_{wv} P_{wv} \quad (14)$$

ou  $\gamma_w$  est le coefficient de fugacité (dans le cas des gaz parfait  $\gamma_{wv}=1$ ). En pratique courante on considère la vapeur d'eau comme un gaz parfait.

L'Humidité Relative d'un air humide est définie par la relation suivante:

$$HR(\%) = \frac{P_{wv}}{P_{wv}^*} 100 \quad (15)$$

Cette notion est très souvent remplacée par le degré hygrométrique (i)

$$i = \frac{P_{wv}}{P_{wv}^*} \quad (16)$$

L'établissement des courbes de sorption s'effectue à l'équilibre où on a  $a_w=i$  à une température donnée. Dans l'air humide le potentiel de vapeur d'eau est défini comme précédemment (éq 11) par:

$$\begin{aligned}\Psi_{wv} &= \frac{\mu_{wv} - \mu_{wv}^*}{\bar{V}_w} \quad (17) \\ &= \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln \frac{P_{wv}}{P_{wv}^*} = \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln \frac{HR(\%)}{100} \\ &= \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln i\end{aligned}$$

Les valeurs des constantes et des variables considérées comme constantes (SWEENEY et BEUCHAT, 1993) sont:

- la constante des gaz parfaits:  $R= 8,33905 \cdot 10^3$  litre.Pa/mol.K
- La température en Kelvin ( $0^\circ\text{C}= 273\text{K}$ )
- le volume molaire partiel de l'eau:  $\bar{V}_w= 0,01801$  litre/mol

Les conversions communément utilisées (SWEENEY et BEUCHAT, 1993) sont:

- le passage de l'activité de l'eau à l'osmolalité (mol/kg) ou l'H.R. (%):

$$\text{Osmolalité} = \frac{-\ln a_w}{\bar{V}_w} = \frac{-\ln a_w}{0,01801} \quad (\text{avec } a_w=HR/100)$$

- le passage de l'activité de l'eau à la pression osmotique (Pascal)

$$\Psi_{wv}(\text{MPa}) = \frac{RT(\text{K})}{\bar{V}_w} \ln a_w = 0,463T(\text{K}) \ln a_w$$

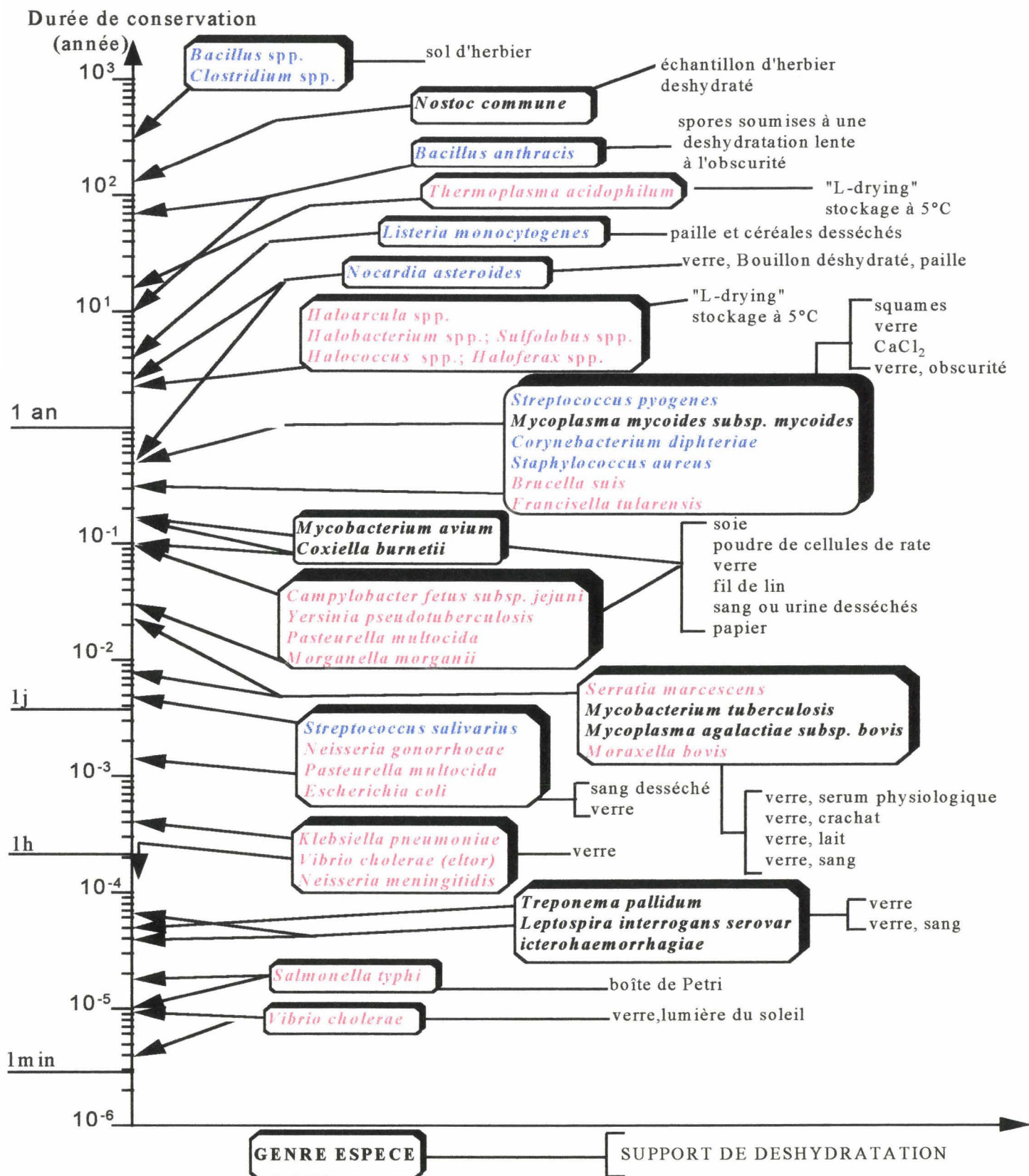
### III-TOLERANCE DES MICRO-ORGANISMES A LA DESSICCATION: ASPECTS GENERAUX

Les niveaux de tolérance à la dessiccation de micro-organismes phylogénétiquement éloignés ont été récemment relevés dans la littérature et compilés par POTTS (1994). Bien qu'il soit difficile de comparer la sensibilité des différents groupes ou genres de bactéries en raison de supports et de protocoles de dessiccation différents, l'étude des niveaux de sensibilité rapportés en figure 2 permet cependant de tirer quelques règles générales.

Les bactéries à GRAM négatif constituent le groupe le plus sensible à la dessiccation probablement en raison de la complexité de leurs enveloppes cellulaires (membrane cytoplasmique, peptidoglycane fin, espace périplasmique développé et membrane externe...) qui sont autant de cibles de la dessiccation. Il est certes rassurant de constater que de nombreuses bactéries à GRAM négatif pathogènes strictes pour l'homme (ex: *Vibrio*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Neisseria*...) ou pathogènes opportunistes (ex: *Enterobacteriaceae*) ne survivent pas plus de 10 jours en l'état déshydraté. La présence de matières organiques (sang, lait, crachat...) augmente de manière notable leur tolérance. Cette sensibilité à la dessiccation des bactéries à GRAM négatif peut par contre se révéler particulièrement gênante pour la préparation des inocula de (brady)rhizobia (SMITH, 1992) et leur survie dans les sols (STREETER, 1994). De nombreuses études récentes confirment la grande sensibilité à la dessiccation des bactéries à GRAM négatif (BALE *et al.*, 1993; THEUNISSEN *et al.*, 1993; JANNING *et al.*, 1994; HANDLEY et WEBSTER, 1995; HUGENHOLTZ *et al.*, 1995).

Les bactéries à GRAM positif de structure plus simple (membrane cytoplasmique, espace périplasmique très réduit et peptidoglycane épais...) sont généralement plus résistantes à la dessiccation (durée de survie supérieure à 120 jours).





**Figure 2:** Temps de survie de quelques espèces représentatives de procaryotes après séchage à l'air sur différents supports (d'après POTTS, 1994). L'échelle de temps est logarithmique (minute à 1000 ans).

Parmi les bactéries à GRAM positif et assimilées, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium*, présentent dans leurs parois des acides mycoliques (ou « corynemycoliques ») de 22 à 90 atomes de carbone ainsi que le « cord factor » ( $\alpha$  tréhalose 6, 6' dimycolate) qui est considéré comme un stabilisateur des membranes vis-à-vis de la dessiccation. Il n'est donc pas étonnant de trouver ces genres bactériens parmi les plus tolérants à la dessiccation (POTTS, 1994; HUTTER *et al.*, 1995). L'apparente sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* (fig. 2) résulte des conditions de dessiccation (aérosolisation à partir d'une suspension en sérum physiologique). En effet, en présence de poussière cette bactérie est capable de résister plus de 120 jours (POTTS, 1994).

Les cellules végétatives de plusieurs genres bactériens sont capables de se différencier en formes de résistance tels que les endospores (*Bacillus*, *Clostridium*...), les cystes (*Arthrobacter*...) et les akinètes et hétérocystes (cyanobactéries). Ces formes sont particulièrement résistantes à la dessiccation (Fig. 2). Chez *Nostoc commune*, la tolérance à la dessiccation serait plutôt due à la présence d'une gangue externe de glycane et la présence en forte proportion d'un acide gras « fluidifiant » (C20:3w3) dans la membrane cytoplasmique (POTTS, 1994).

Cette classification simple de la tolérance à la dessiccation en fonction de la complexité des enveloppes cellulaires et des formes de résistance comporte néanmoins de nombreuses exceptions. Ainsi *Pseudomonas aureofaciens* (GRAM négatif) et *Arthrobacter protophormiae* (GRAM positif susceptible de former des cystes) présentent tous deux une grande sensibilité à une dessiccation modérée de l'ordre de 90% d'H.R. (KIEFT *et al.*, 1994). De même, *Bacillus cereus* (GRAM<sup>+</sup> susceptible de sporuler) est aussi sensible qu'*Escherichia coli* (GRAM<sup>-</sup>) et certaines souches de *Methylobacterium* à GRAM négatif tolèrent aussi bien la dessiccation que *Dienococcus radiophilus* bactérie à GRAM positif (HUGENHOLTZ *et al.*, 1995). Dans ces deux dernières publications, il n'est cependant pas précisé si l'étude porte sur les formes végétatives de *Bacillus* et *Arthrobacter* ou les formes de résistance. BALE *et al.* (1993) et

JANNING *et al.* (1994) ne détectent aucune différence entre les serovars de *Salmonella enterica* subsp *enterica* (bactéries à GRAM négatif) et diverses espèces d'*Enterococcus* (GRAM positif) et classent ces deux genres bactériens parmi les plus résistants à la dessiccation. La longévité après dessiccation des archaebactéries GRAM négatif halophiles (*Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax* et *Halococcus*), thermophile (*Sulfolobus*) et thermoacidophile dépourvue de peptidoglycane (*Thermoplasma acidophilum*) rapportée dans les travaux de SAKANE *et al.* (1992) et en Fig. 2, est plus difficile à appréhender. La méthode de déshydratation (sous vide à partir d'une phase liquide) et la présence d'un support protecteur très élaboré (tampon phosphate, glutamate de Na, adonitol, sorbitol, thioglycollate de Na, NaCl et poudre de cellulose) sont probablement les raisons principales de ces bons taux de survie. La composition particulière en lipides polaires de ces bactéries et la possibilité de résistance croisée entre dessiccation/température-salinité ne sont cependant pas à écarter.

#### **IV- TOLERANCE A LA DESSICCATION CHEZ LES *Rhizobiaceae*: FACTEURS INHERENTS A LA BACTERIE**

##### **1- Tolérance à la dessiccation des (brady)rhizobia suivant les groupes d'inoculation et les souches**

BUSHBY et MARSHALL (1977a) démontrent que les espèces à croissance rapide, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sont plus sensibles à une dessiccation rapide et sévère (moins de 12 heures pour arriver à une H.R. de l'ordre de 5%) que les espèces à croissance lente telles *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

Lorsque la déshydratation est menée de manière plus lente (en 11 jours) peu de différences sont observées dans la tolérance à la dessiccation chez les espèces à croissance rapide et lente (PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979).

Cependant, VAN RENSBURG et STRIJDOM (1980) et ANTHEUNISSE *et al.* (1981) constatent que les espèces à croissance rapide survivent mieux que les espèces à croissance lente lorsqu'elles sont soumises à une déshydratation lente sous 31% d'H.R..

Une sensibilité croissante à la lyophilisation dans l'ordre *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*), *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* et enfin *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a été observée (DYE 1982). Des taux de survie élevés juste après lyophilisation ne sont cependant pas toujours indicatifs d'une bonne survie durant la phase de conservation. En effet *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (sensible à la phase de lyophilisation) et *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*), plus tolérant à la phase de lyophilisation, présentent tous deux la même « demi-durée de vie » de conservation (DYE, 1982).

Des études, menées à des niveaux de déshydratation moins drastiques (95% à 99% d'H.R.), mettent en évidence des interactions significatives mais complexes entre les genres, espèces ou souches de (brady)rhizobia X les différents potentiels matriciels X les supports (tourbes ou sols) X les durées d'incubations (GRIFFITH et ROUGHLEY, 1992; ISSA et WOOD, 1995). Dans ces conditions, peu de différences dans les tolérances à ces potentiels matriciels sont observées entre *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (GRIFFITH et ROUGHLEY, 1992) ou entre *Rhizobium* sp. (*Cicer*) et *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (ISSA et WOOD, 1995).

*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* est fréquemment rapporté comme l'espèce la plus sensible à la dessiccation parmi les (brady)rhizobia (PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979; ANTHEUNISSE *et al.*, 1981; DYE, 1982).

Les protocoles expérimentaux retenus au cours de ces différentes études étant radicalement différents, il nous est impossible de tirer une conclusion générale sur le comportement à la dessiccation et la survie en l'état déshydraté des différents groupes d'inoculation. Ces travaux

soulignent cependant l'importance des paramètres vitesse de déshydratation, support de dessiccation, H.R. et durée de conservation.

VAN RENSBURG et STRIJDOM (1980) et BOTTOMLEY (1992) suggèrent que des études sur les comportements de différentes souches de (brady)rhizobia à différentes H.R.(s) sont nécessaires avant de tirer des conclusions sur une éventuelle différence de tolérance à la dessiccation au sein des espèces à croissance lente ou rapide.

MUGNIER et JUNG (1985) montrent que *R. meliloti* est plus tolérant que *B. japonicum* à toutes les H.R.(s) testées tout au moins après 15 jours de conservation à 28°C dans un gel de polysaccharide (xanthane- gomme de caroube). Cependant ces auteurs ne testent qu'une seule souche de chaque espèce, il n'est donc pas possible de conclure si la différence de tolérance est caractéristique de la souche ou du genre et de l'espèce.

En effet, des différences notables de tolérance à divers stress de dessiccation ont été observées parmi différentes souches de *B. japonicum* (MAHLER et WOLLUM II 1980, AL-RASHIDI *et al.*, 1982; MARY *et al.*, 1994), *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (BOONKERD et WEAVER, 1982; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982b; HARTEL et ALEXANDER, 1984), *R. meliloti* (VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; MARY *et al.*, 1985), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; FUHRMANN *et al.*, 1986; TROTMAN et WEAVER, 1995), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (NECASEK *et al.*, 1993), *Rhizobium* sp. (*Cicer*) et *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (ISSA et WOOD, 1995). De même, NECASEK *et al.* (1993) démontrent qu'au sein d'une même souche de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, différentes colonies présentent des niveaux de tolérance à la dessiccation (40-60% d'H.R.) très différents.

Une étude comparative des cinétiques de survie de souches de *R. meliloti*, *B. japonicum* et *B. elkanii* lors de la conservation à cinq Humidités Relatives (3; 22; 43,6; 67,8 et 83,5% d'H.R.) montre l'existence de décroissances de type linéaires pour les bradyrhizobia et de décroissances biphasiques pour les rhizobia (sauf à 83,5% d'H.R.). Dans ces conditions, seules les souches de *R. meliloti* présentent des taux de survie acceptables après 100 jours de conservation à 22; 43,6 et 67,8% d'H.R.. Par contre,

les bradyrhizobia sont significativement plus tolérants à la conservation courte (inférieure à 41 jours), notamment sous des H.R. (s) de 3 et 83,5% (MARY *et al.*, 1994). Ces résultats sont conformes à ceux de VAN RENSBURG et STRIJDOM (1980) obtenus à 31% d'H.R. et élargissent les résultats de ces auteurs à une plus grande gamme d'H.R. (3% à 83,5% d'H.R.).

Si la tolérance à la dessiccation chez les *Rhizobiaceae* est en relation avec le taux de croissance, il est concevable que des différences dans la sensibilité à la dessiccation parmi les souches d'une même espèce le soit également. OSA-AFIANA et ALEXANDER (1982b) n'ont pas réussi à vérifier cette hypothèse chez différentes souches de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*).

Peu de résistance au passage des molécules d'eau est observée chez tous les genres et espèces de la famille des *Rhizobiaceae*, la vitesse des échanges d'eau ne peut donc expliquer les différences de tolérance à la dessiccation (BUSHBY et MARSHALL, 1977 c). L'étude des isothermes d'adsorption permet de constater que les rhizobia à croissance rapide retiennent des quantités d'eau supérieures à celles retenues par les bradyrhizobia à croissance lente et ce quelle que soit l'H.R. (BUSHBY et MARSHALL, 1977 c). De même les souches de *B. japonicum* sensibles à la dessiccation retiennent des quantités d'eau supérieures à celles retenues par les souches tolérantes (AL-RASHIDI *et al.*, 1982). Différents auteurs ont donc émis des hypothèses concernant le fonctionnement correct ou incorrect des enzymes en fonction des quantités d'eau retenues à différentes H.R. (VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; AL-RASHIDI *et al.*, 1982).

## **2- Influence de l'âge physiologique sur la tolérance des (brady)rhizobia à la dessiccation**

L'influence de l'âge physiologique sur la tolérance à la dessiccation reste une donnée expérimentale de laboratoire et peut difficilement expliquer

des différences de comportement à la dessiccation dans les sols. Cependant, ce paramètre se révèle particulièrement important pour assurer la stabilité des inocula déshydratés.

De nombreux auteurs utilisent des cultures prélevées en phase stationnaire de croissance lors de leurs essais de dessiccation des (brady)rhizobia (ANTHEUNISSE *et al.*, 1981; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982a et b; KREMER et PETERSON, 1983; MARY *et al.*, 1985; MUGNIER et JUNG, 1985; BISSONNETTE et LALANDE, 1988; JAUHRI *et al.*, 1988; JUWARKAR et REWARI, 1988; HOBEN *et al.*, 1991; BALE *et al.*, 1993; MARY *et al.*, 1993; JANSEN *et al.*, 1994; MARY *et al.*, 1994...). Il en va de même, lors de nombreuses études de dessiccation menées chez d'autres micro-organismes (RYZNAR et DRASIL, 1991; SIDYAKINA *et al.*, 1991; DANDURAND *et al.*, 1994; LOUIS *et al.*, 1994; BLANCHETTE *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1995; LESLIE *et al.*, 1995...)

ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN (1979) observent, après déshydratation et conservation, une meilleure tolérance des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance. L'étude des cinétiques de survie de *R. meliloti* lors de la conservation à différentes H.R. permet de vérifier une plus grande tolérance des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance et indique que la sensibilité des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance est d'autant plus accentuée que l'H.R. de conservation est élevée (MARY *et al.*, 1986).

Juste après déshydratation par atomisation, les cellules de *Lactobacillus bulgaricus* prélevées en phase stationnaire de croissance présentent des taux de survie nettement supérieurs ( $\cong 2$  Log) à ceux observés pour des cellules prélevées en phase exponentielle (TEIXEIRA *et al.*, 1995a). Des résultats similaires sont obtenus lors de l'aérosolisation de cellules de *Stenotrophomonas maltophilia* (HANDLEY et WEBSTER, 1995) et le séchage sur graine de *Pseudomonas fluorescens* (SLININGER *et al.*, 1996). Une meilleure tolérance au stress de congélation des cellules de *Lactobacillus acidophilus* en phase stationnaire de croissance est également observée. Cependant ce phénomène semble dépendre de la souche (BRASHEARS et GILLILAND, 1995).

La survie de (brady)rhizobia juste après lyophilisation n'est affectée ni par la concentration cellulaire initiale ni par l'âge physiologique (DYE, 1982). Remarquons cependant qu'au cours de cette étude les cellules sont cultivées sur tranches d'agar et prélevées à des temps qui correspondent fort probablement à différents moments de la phase stationnaire. Par ailleurs, l'influence de l'âge physiologique n'est pas rapportée pour une conservation prolongée. De même, la survie de *Pseudomonas* lors de la conservation dans des inocula secs (talc, 1% méthylcellulose) est largement indépendante de l'âge physiologique (CAESAR et BURR, 1991).

Les cellules de *Bradyrhizobium japonicum* prélevées en fin de phase exponentielle de croissance survivent aussi bien, si ce n'est mieux, à la dessiccation que les cellules en phase stationnaire de croissance (CLIQUET et CATROUX, 1994).

### **3- Production de polysaccharides extracellulaires et tolérance à la dessiccation**

Les polysaccharides extracellulaires (E.P.S.) et les polysaccharides capsulaires (C.P.S.) confèreraient aux bactéries qui les synthétisent un certain nombre d'avantages écologiques tels qu'une protection envers les prédateurs (bactériophages, *Bdellovibrio*, protozoaires...) et une absorption plus aisée des ions par la bactérie (SUTHERLAND, 1972). Notons cependant que l'influence des prédateurs sur la survie de *Rhizobium* dans les sols est sujette à controverse (BOTTOMLEY, 1992) ainsi que l'intervention des polysaccharides dans les mécanismes de protection envers les prédateurs (POSTMA *et al.*, 1991).

Les exopolysaccharides extracellulaires et plus particulièrement les polysaccharides capsulaires agiraient en tant que systèmes tampon prévenant une perte ou un gain en eau trop rapide qui causerait la destruction des cellules (SUTHERLAND, 1972; ROBERSON et FIRESTONE, 1992). D'autre part, ces E.P.S(s) seraient réutilisés comme



source de carbone par les bactéries lors de la réhydratation (ROBERSON et FIRESTONE, 1992).

L'analyse «in situ», en microscopie électronique à transmission, des transformations subies par les micro-organismes du sol (en particulier les bactéries à GRAM négatif), après dessiccation à l'air ambiant, confirme le rôle protecteur des E.P.S. (KILBERTUS *et al.*, 1979; ROBERSON et FIRESTONE, 1992). Des observations similaires ont été rapportées chez *Nitrosomonas* (ALLISON et PROSSER, 1991), *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Erwinia stewartii* (OPHIR et GUTNICK, 1994). Chez *Pseudomonas*, la synthèse d'E.P.S. et d'alginate est stimulée lors de la dessiccation ou en présence de fortes concentrations en NaCl (ROBERSON et FIRESTONE, 1992; SINGH *et al.*, 1992; SINGH et FETT, 1995). De même, différentes souches de *Rhizobium* sp. (*Acacia senegal* et *Prosopis chilensis*) synthétisent des LPS présentant des chaînes polysaccharidiques (Ag O) allongées lorsqu'elles sont confrontées à de faibles activités de l'eau (ZAHARAN *et al.*, 1994).

BUSHBY et MARSHALL (1977 a) attribuent un rôle secondaire à la production d'E.P.S. chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, les souches produisant le polymère seraient cependant légèrement plus tolérantes à la dessiccation que leurs mutants incapables de le faire. PENA-CABRIALES et ALEXANDER (1979) remarquent que des cellules de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en suspension dans leurs propres polysaccharides puis inoculées dans un sol soumis à la dessiccation survivent mieux que les mêmes cellules dépourvues du polymère qu'elles ont synthétisé. Par contre, DAVIDSON et REUSZER (1978) constatent que l'addition de polysaccharides de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* à des cellules de *B. japonicum* n'augmente pas la survie de ces dernières sur les graines de soja stockées à 50% d'H.R.. Les EPS sembleraient devoir être « attachés » fermement aux surfaces cellulaires bactériennes pour protéger efficacement de la dessiccation (OPHIR et GUTNICK, 1994; HUGENHOLTZ *et al.*, 1995).

OSA-AFIANA et ALEXANDER (1982b) démontrent l'existence d'une corrélation étroite entre la production d'E.P.S. chez *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) et la sensibilité à la dessiccation. Cependant, lors de ces travaux, les techniques d'inoculation (avec ou sans la quantité d'exopolysaccharides caractéristique des souches) n'étant pas clairement précisées, ces résultats ne sont pas nécessairement en contradiction avec les travaux précédents.

Lors d'expériences de stockage à Humidités Relatives contrôlées, les exopolysaccharides de *R. meliloti* améliorent la survie à 3% d'H.R. et se révèlent défavorables à la survie aux autres H.R. testées (MARY *et al.*, 1986). L'absence de protection des E.P.S. vis-à-vis de stress de dessiccation a été également rapportée pour *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (HARTEL et ALEXANDER, 1986) et *Bradyrhizobium japonicum* (CLIQUET et CATROUX, 1994)

Les E.P.S. et C.P.S. des (brady)rhizobia ne semblent donc pas en mesure de protéger ces bactéries de la dessiccation, bien qu'ils soient particulièrement importants dans la reconnaissance bactérie/hôte végétal. Par contre, les alginates et xanthanes protègent des stress de dessiccation les bactéries qui les synthétisent (ROBERSON et FIRESTONE, 1992; SINGH *et al.*, 1992). Les xanthanes, produits par *Xanthomonas compestris*, assurent une bonne survie de *R. meliloti* et *B. japonicum* lors de la conservation en l'état déshydraté (MUGNIER et JUNG, 1985). Les alginates produits par les algues diffèrent des alginates de *Pseudomonas*, de par leur comportement vis-à-vis des électrolytes (SUTHERLAND, 1994). Cependant, ces polymères d'alginate, protègent de manière efficace les bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (JUNG *et al.*, 1982), *Azospirillum* sp. (FAGES, 1990; PAUL *et al.*, 1994) et *Frankia* (SOUGOUFARA *et al.*, 1989; FRIONI *et al.*, 1994) des stress de dessiccation.

Les structures chimiques des différents polysaccharides bactériens affectent particulièrement leurs propriétés physiques (SUTHERLAND,

1994). Ces phénomènes pourraient rendre compte des différences de protection enregistrées.

#### **4- Formation de microcolonies et/ou de biofilms**

Il a été clairement démontré que l'attachement et (ou) « l'emprisonnement » des (brady)rhizobia, et des bactéries telluriques en général, aux particules, agrégats ou micropores (tailles comprises entre 10 et 50  $\mu\text{m}$ ) puis une multiplication représentent les premières réponses physiologiques favorables à la survie dans les sols (OZAWA et YAMAGUCHI, 1986; DIAB et SHILO, 1988; POSTMA *et al.*, 1989; POSTMA *et al.*, 1991; NISHIYAMA *et al.*, 1995).

PENA CABRIALES et ALEXANDER (1979) et CHAO et ALEXANDER (1982) observent qu'une croissance préalable des rhizobia dans les sols détermine chez ces bactéries une tolérance plus élevée à la dessiccation. De même, une prémultiplication des (brady)rhizobia (étape de « curing ») dans les supports d'inoculation permet une meilleure survie lors de l'application et du séchage sur la graine (MATERON et WEAVER, 1985; SMITH 1992).

Ce type de tolérance pourrait être en relation avec la formation de microcolonies noyées dans les polysaccharides extracellulaires qu'elles synthétisent (KILBERTUS *et al.*, 1979; ALLISON et PROSSER, 1991; ROBERSON et FIRESTONE, 1992; OPHIR et GUTNICK, 1994; NISHIYAMA *et al.*, 1995). Pour certains auteurs la résistance intrinsèque du micro-organisme reste cependant plus importante que la formation de biofilms (HUGENHOLTZ *et al.*, 1995).

D'autre part, il a été démontré que la longévité des inocula déshydratés par lyophilisation ou atomisation est améliorée lorsque la concentration cellulaire initiale est élevée (BOZOGLU *et al.*, 1987; MARY *et al.*, 1993; FU et ETZEL, 1995).

Les cellules mortes se comporteraient comme un support protecteur et permettraient de réduire les effets nocifs de l'oxygène sur les cellules déshydratées. Les cellules situées à l'intérieur de la microcolonie seraient protégées de la dessiccation de manière plus efficace que les cellules en périphérie ou les cellules isolées. Dans le cas des cellules inoculées dans le sol et soumises immédiatement à la dessiccation, ce mécanisme serait inexistant.

##### **5- Changement de morphologie et réponses physiologiques au stress de privations nutritionnelles : acquisition de résistance à différents stress**

La rhizosphère des légumineuses et des plantes en général constitue un pôle attractif riche en nutriments. Les (brady)rhizobia déjà présents ou attirés sélectivement par chimiotactisme dans la spermosphère et/ou la rhizosphère des légumineuses vont s'y multiplier activement (BARBOUR *et al.*, 1991; HARTWIG *et al.*, 1991).

L'influence d'une croissance dans la rhizosphère sur la survie ultérieure des micro-organismes dans les sols semble étroitement liée aux genres bactériens étudiés. Par exemple, l'absence d'effet sur la survie de *Pseudomonas fluorescens* (WESSENDORF et LINGENS, 1989) et des effets bénéfiques sur *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (JENSEN et SØRENSEN, 1987) et sur *Flavobacterium* sp. (MAWDSLEY et BURNS, 1994) ont été décrits.

En l'absence de culture de la plante hôte, les (brady)rhizobia sont capables de se maintenir dans les sols (CROZAT *et al.*, 1982; SANGINGA *et al.*, 1994). Cependant, les ressources nutritives sont limitées et la croissance est réduite voire complètement annulée. Chez ces bactéries, une transition de la forme bacillaire (morphologie classique des (brady)rhizobia en culture de laboratoire) vers la forme pseudococcoïde a souvent été observée après culture dans des milieux appauvris en éléments nutritifs. Ce changement de morphologie pourrait être responsable en partie de la survie des (brady)rhizobia dans les sols (CROZAT *et al.*, 1982; POSTMA *et al.*, 1988; POSTMA *et al.*, 1990). Des réductions de

taille plus importantes (passage à travers des filtres dont la taille des pores est de 0,4  $\mu\text{m}$ ), aboutissant à des volumes cellulaires de l'ordre de 0,07  $\mu\text{m}^3$ , ont été observées chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Ces cellules viables sont cependant non cultivables sur les milieux traditionnels et ne semblent pas être en mesure de noduler leur plante hôte (BOTTOMLEY et DUGHRI, 1989, BOTTOMLEY et MAGGARD, 1990).

La mise en évidence de ces bactéries viables mais non cultivables (Viable But Non Culturable: VBNC) requiert des techniques particulières. Des tests d'élongation cellulaire en l'absence de division bactérienne (KOGURE *et al.*, 1979; BARCINA *et al.*, 1995) et/ou l'observation d'un nombre limité de divisions (formation de microcolonies) par microscopie à épifluorescence (BINNERUP *et al.*, 1993; NYBROE, 1995) sont couramment utilisés. La mise en évidence des activités métaboliques ou physiologiques bactériennes par l'intermédiaire de fluorochromes permet actuellement de détecter rapidement les bactéries VBNC (RODRIGUEZ *et al.*, 1992; Mc FETERS *et al.*, 1995; NYBROE, 1995; TSUJI *et al.*, 1995).

De nombreux travaux ont été réalisés sur les réductions de taille et l'induction de protéines de stress chez des bactéries (notamment *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*...) soumises à des privations nutritionnelles. Ces modifications physiologiques s'accompagnent fréquemment d'une multirésistance aux stress de l'environnement (MATIN, 1990; NYSTRÖM *et al.*, 1990; SPECTOR, 1990; SIEGELE et KOLTER, 1992; KAPRELYANTS *et al.*, 1993; KJELLEBERG *et al.*, 1993; GIVSKOV *et al.*, 1994; VAN OVERBEEK *et al.*, 1995). Des acquisitions de résistances à l'autolyse, au chlorure de cadmium, aux rayonnements Ultra Violet, aux fortes et basses températures, aux agents oxydants, à l'éthanol, aux faibles activités de l'eau... ont ainsi été décrites.

La présence de bactéries Viables mais Non Cultivables a été démontrée après dessiccation d'*Enterobacter cloacae* et *Alcaligenes eutrophus* sous une H.R. de 10% (PEDERSEN et JACOBSEN, 1993). L'existence de telles cellules a également été suggérée pour expliquer les très faibles taux de survie (cellules viables et cultivables) de *Pseudomonas*

*aureofaciens* et *Arthrobacter protophormiae* après dessiccation sous 90% d'H.R. (KIEFT *et al.*, 1994). Par contre, WILSON et LINDOW (1992) ne détectent aucune cellule Viable mais Non Cultivable chez *Pseudomonas syringae* après dessiccation à 45-50% d'H.R.. De telles études seraient intéressantes à mener chez les (brady)rhizobia afin de préciser l'influence de ces réponses physiologiques aux stress nutritionnels sur la tolérance de ces micro-organismes à la dessiccation.

D'autre part, les techniques de mise en évidence des cellules Viable mais Non Cultivables présentent l'avantage de pouvoir être réalisées aux mêmes activités de l'eau que celles retenues lors des expériences en cours. De ce fait, les chocs hypo-osmotiques imposés par la technique classique de détermination du nombre de Colonies Formant Unités sont totalement évités (RAYNAL *et al.*, 1994).

## **V- CONDITIONS RENCONTREES DANS LES SOLS ET TOLERANCE A LA DESSICCATION CHEZ LES *Rhizobiaceae***

### **1- Aridité du site d'origine des souches de (brady)rhizobia**

OSA-AFIANA et ALEXANDER (1982 b) isolent dix-huit souches de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) de trois sites d'aridité croissante et concluent au manque de corrélation entre l'origine des souches isolées et la tolérance à une dessiccation rapide. ISSA et WOOD (1995) aboutissent aux mêmes conclusions en ce qui concerne le comportement de souches de *Rhizobium* sp. (*Cicer*) et *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

En condition de déshydratation moins drastique, HARTEL et ALEXANDER (1984) démontrent que les souches de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) provenant des régions chaudes et sèches sont plus tolérantes à la dessiccation et à la température que les souches des régions plus froides et humides. De même, TROTMAN et WEAVER (1995) démontrent que 20% des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolées des sols, et donc susceptibles d'avoir été confrontées aux stress de dessiccation, présentent un niveau de tolérance à ces stress (1% de survie

après 1 semaine) contre seulement 10% des souches d'inocula commerciaux.

## **2- Déshydratations et réhydratations cycliques**

Le sol constitue un habitat naturel fréquemment soumis à des périodes de déshydratation suivies de périodes de réhydratation. De nombreux auteurs ont donc cherché à voir les effets de tels cycles de déshydratation-réhydratation, avec ou sans subcultures intermédiaires, sur la tolérance des (brady)rhizobia à la dessiccation.

Un certain nombre d'auteurs (CHEN et ALEXANDER, 1973; BUSHBY et MARSHALL, 1977 a; PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979; MARY *et al.*, 1987; RYZNAR et DRASIL, 1991) rapportent que de tels cycles de déshydratation-réhydratation ne sélectionnent pas de bactéries plus tolérantes à la dessiccation.

Cependant OCHIN (1980) et DELIN (U.S. PATENT 3, 616, 236, Oct. 26, 1971) sélectionnent des souches de *Rhizobium meliloti* anhydro-tolérantes par de tels cycles. De même, la tolérance à la dessiccation de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* se trouve améliorée après un deuxième cycle de dessiccation (NECASEK *et al.*, 1993).

Ces résultats apparemment contradictoires pourraient s'expliquer par l'utilisation de protocoles expérimentaux différents. Il a été, en effet, démontré que le niveau de dessiccation, la durée de maintien en l'état déshydraté (CLEIN et SCHIMEL, 1994) et les conditions de réhydratation (SALEMA *et al.*, 1982; KOSANKE *et al.*, 1992) affectent directement la survie des micro-organismes.

## **3- Rapidité de la déshydratation et survie des (brady)rhizobia**

La déshydratation d'un sol s'effectue généralement de manière lente tout au moins dans les couches profondes.

Cependant, en surface et sous certaines conditions climatiques la déshydratation peut être beaucoup plus rapide et se produire en quelques heures seulement (DURAR *et al.*, 1995).

ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN (1979) montrent que les taux de survie des genres *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus* et *Saccharomyces* juste après dessiccation rapide ou lente (31% d'H.R. en 20 min. et 24 h. respectivement) sont identiques. Cependant, après conservation prolongée à cette H.R. les cellules déshydratées lentement présentent une meilleure stabilité que les cellules rapidement desséchées. Ces observations ont été élargies à *Rhizobium meliloti* (MARY *et al.*, 1985) et à *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (FUHRMANN *et al.*, 1986) soumis à différentes H.R.(s) de conservation.

Les concentrés cellulaires de *R. meliloti* cultivé en résidus de laiterie présentent des taux de survie, après dessiccation, supérieurs à ceux enregistrés pour des culots des mêmes cellules cultivées en milieu Y.E.M.. Hors, les culots cellulaires des rhizobia cultivés en résidus de laiterie se dessèchent beaucoup plus lentement (16 h vs. 4 h) que ceux issus des cellules cultivées en Y.E.M. (BISSONNETTE et LALANDE, 1988).

Des inocula de *Bradyrhizobium japonicum* à base de tourbe sont immédiatement desséchés et soumis à un potentiel hydrique aussi bas que -170 Mpa (31 % H.R.) lorsqu'ils sont mélangé avec des micro-granulés (à base de bentonite, calcite, dolomite, illite, smectite ou silice). La succion de l'eau exercée par les granulés soumet *B. japonicum* à une dessiccation rapide et entraîne une diminution significative ( $\cong 0,7$  Log) du nombre de cellules dans l'inoculum (FOUILLEUX *et al.*, 1994).

Les effets néfastes des dessiccations rapides ont également été rapportés pour des inocula d'*Azospirillum lipoferum* en billes d'alginate (FAGES, 1990).

Ce phénomène de mortalité de (brady)rhizobia induite par la rapidité de dessiccation constitue l'un des obstacles majeurs à la réalisation de semences de légumineuses pré-inoculées.



#### **4- Croissance en milieu de faible activité de l'eau ( $a_w$ ) et tolérance à la dessiccation**

Une faible pluviométrie et des températures élevées vont entraîner une déshydratation des sols. Une diminution significative de l' $a_w$ , par augmentation de la concentration en sels, constitue l'un des premiers stress (choc hyperosmotique) auquel la bactérie se trouve confrontée. Un certain nombre d'auteurs ont donc recherché une corrélation entre croissance en milieux de faibles  $a_w$ (s) et tolérance à la dessiccation.

CHEN et ALEXANDER (1973) constatent une corrélation étroite entre une pression osmotique interne élevée (concomitante à la capacité à croître en milieu de faible  $a_w$ ) et la tolérance à la dessiccation. Une légère augmentation de la tolérance à la déshydratation (31% H.R.) est observée pour une souche de *Rhizobium* sp. Il existe cependant des genres, espèces ou souches sensibles à la dessiccation qui montrent une aptitude à croître à faible  $a_w$  et inversement. Il semble donc que l'aptitude à se développer à faible  $a_w$  ne soit pas le seul facteur protégeant les cellules de la déshydratation. Cependant, l'importance de ce facteur est accréditée par le fait que toutes les souches sensibles deviennent plus tolérantes quand les cellules sont cultivées dans des milieux d' $a_w$ (s) plus faibles (CHEN et ALEXANDER, 1973).

Une légère augmentation de la tolérance à la dessiccation a été obtenue après culture de souches de (brady)rhizobia en milieux de faibles  $a_w$ (s). Différentes souches d'une même espèce ne semblent cependant pas répondre de manière identique, de même le soluté employé pour réduire l' $a_w$  du milieu semble jouer un rôle prépondérant (AL-RASHIDI *et al.*, 1982; MARY *et al.*, 1986). Des observations similaires ont été enregistrées chez *Escherichia coli* (BALE *et al.*, 1993), *Frankia* (BURLEIGH et DAWSON, 1994), *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus plantarum* (KETS *et al.*, 1996).

D'autres auteurs montrent l'absence de corrélation entre ces deux paramètres (BUSHBY et MARSHALL, 1977 a) voire même une

diminution de la tolérance à la dessiccation de deux souches de *Pseudomonas* après culture à faible  $a_w$  (CAESAR et BURR, 1991)

#### **5- Effet de la température sur la survie des (brady)rhizobia et leur tolérance à la dessiccation**

Les températures élevées (> à 35°C) limitent les processus de nodulation et de fixation de l'azote atmosphérique chez les légumineuses (GRAHAM, 1992).

Elles affectent également la survie des (brady)rhizobia dans les inocula et les sols.

Une exposition de 1 à 2 semaines à des températures de l'ordre de 40 à 45°C conduit à une réduction sévère ( $\cong$  3 à 5 Log) voire une disparition totale des populations de (brady)rhizobia dans les sols et les inocula (CHAO et ALEXANDER, 1984; EVANS *et al.*, 1993; MICHIELS *et al.*, 1994; ROUGHLEY *et al.*, 1995). Il en va de même pour *Pseudomonas putida* (HARTEL *et al.*, 1994).

Cependant, les inocula sont rarement exposés à de telles températures tout au moins pendant des durées aussi longues. ROUGHLEY *et al.* (1995) démontrent que des inocula de *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* à base de tourbe peuvent être distribués en toute sécurité dans les régions tropicales à partir d'un centre producteur centralisé. Le conditionnement doit cependant permettre d'éviter la dessiccation et une réincubation des inocula à 25°C (effectuée par le centre régional distributeur) est recommandée.

La conjonction de fortes températures ( $\geq$  30°C) et d'H.R.(s) de conservation élevées (> 60%) aboutit à des taux de survie très bas (JUWARKAR et REWARI, 1988; MARY *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 1995 b)

Les effets des fortes températures sur les inocula à faible H.R. (s) se révèlent un peu moins nocifs (DANSO et ALEXANDER, 1974; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982b; MARY *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 1995)

Des inocula lyophilisés de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* et *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) dispersés dans une phase lipidique présentent des taux de survie excellents lors de la conservation à 40°C et même 65°C (KREMER et PETERSON 1983).

Les souches de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna unguiculata*, *mungo* et *sinensis*) provenant des régions chaudes et sèches sont plus tolérantes à la température et à la dessiccation que les souches des régions plus froides (HARTEL et ALEXANDER, 1984; JUWARKAR et REWARI, 1988).

Récemment, TROTMAN et WEAVER (1995) ont démontré que parmi 150 isolats de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, 31 sont capables de maintenir au moins 1% de survivant après 1 semaine de dessiccation et 19 résistent pendant 1 semaine à 37°C. Six de ces isolats sont tolérants aux deux stress et seulement 3 restent infectifs et efficaces. A l'inverse, aucune perte d'infectivité n'est enregistrée chez *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) *R. meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* même après une conservation de 6 semaines à 40°C (ROUGHLEY *et al.*, 1995).

## **6- Nature et texture des sols et survie des (brady)rhizobia**

L'introduction de bactéries dans des sols à faible teneur en eau et sans couverture végétale aboutit souvent à une réduction du nombre de cellules viables. L'analyse des résultats, relevés dans la littérature, montre une dépendance entre le devenir des bactéries inoculées et la nature des sols (DANSO et ALEXANDER, 1974; PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979; MAHLER et WOLLUM II, 1980; CROZAT *et al.*, 1982; WESSENDORF et LINGENS, 1989; POSTMA *et al.*, 1990; VANDEPITTE *et al.*, 1995).

De nombreux travaux sur le comportement des (brady)rhizobia (et des bactéries telluriques en général) vis à vis de la dessiccation démontrent les effets protecteurs des argiles (BUSHBY et MARSHALL, 1977 a et c; KILBERTUS *et al.*, 1979; AL-RASHIDI *et al.*, 1982; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982a; CHAO et ALEXANDER, 1984; HARTEL et ALEXANDER, 1986; CAESAR et BURR, 1991; EVANS *et al.*, 1993; DANDURAND *et al.*, 1994; BASHAN *et al.*, 1995)

Cependant, l'absence de corrélation entre la présence d'argile et l'amélioration des taux de survie (BOONKERD et WEAVER, 1982; CHAO et ALEXANDER, 1982; ISSA et WOOD, 1995; VAN GESTEL *et al.*, 1996) voire même une corrélation négative chez *R. meliloti* (CHAO et ALEXANDER, 1982) ont également été décrites

Ces résultats apparemment contradictoires pourraient s'expliquer par les propriétés minéralogiques de ces argiles. Malheureusement, les caractéristiques minéralogiques des sols étudiés ne sont pas toujours rapportées dans les publications.

L'amendement des sols avec de la montmorillonite améliore la tolérance à la dessiccation des rhizobia à croissance rapide mais se révèle sans effet ou pire préjudiciable à la survie des bradyrhizobia (BUSHBY et MARSHALL, 1977 a). Un amendement sous forme de poudre procure une meilleure protection des rhizobia qu'un amendement sous forme de solution aqueuse.

La kaolinite et l'illite offrent une moindre protection aux (brady)rhizobia soumis à dessiccation (CHAO et ALEXANDER, 1982; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982a).

De même les argiles qui présentent une faible taille moyenne de particules et donc une grande surface d'échange (ex: montmorillonite) protègent de manière plus efficace les *Pseudomonas* de la dessiccation que les argiles à tailles moyennes de particules plus élevées telle la kaolinite (DANDURAND *et al.*, 1994). Les surfaces d'échange, déterminées par la méthode de BRUNAUER, EMMETT & TELLER (B.E.T.), de différentes argiles sont rapportées dans le tableau suivant (DANDURAND *et al.*, 1994)

Minéral	Surface d'échange m <sup>2</sup> /g
Kaolinite	9,6
Vermiculite	45,9
Talc	21,0
Pyrophyllite	1,6
Zeolite	45,7
Montmorillonite	90,5

Certains auteurs considèrent qu'une augmentation de la surface d'échange des argiles diminue la vitesse de déshydratation et de ce fait augmente le taux de survie (CHAO et ALEXANDER, 1984; HARTEL et ALEXANDER 1984 et 1986; FUHRMANN *et al.*, 1986). D'autres auteurs suggèrent que l'argile présente une plus grande affinité pour l'eau que les (brady)rhizobia. De ce fait, l'argile réduit la teneur en eau intracellulaire des rhizobia et leurs activités enzymatiques. Ces rhizobia en état de « resting cells » seraient capable de mieux tolérer la dessiccation (BUSHBY et MARSHALL, 1977 a et c; AL-RASHIDI *et al.*, 1982; OSA-AFIANA et ALEXANDER, 1982a).

Récemment, EVANS *et al.* (1993) ont démontré que les sols de  $\text{pH} > 5$ , avec une capacité totale de cations échangeables (t.e.c.) élevée et de fort taux en Magnésium constituent l'environnement le plus favorable pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* lors de la dessiccation et l'élévation de température.

Il est remarquable de constater que la montmorillonite (protecteur efficace) possède une t.e.c. de 2 à 7 fois supérieure à celle de l'illite (protecteur moins efficace) (KNAEBEL *et al.*, 1994).

La survie d'*Azospirillum brasilense* est positivement corrélée avec le pourcentage d'argile, le taux de matière organique et d'azote et la capacité de rétention en eau (BASHAN *et al.*, 1995).

Chez *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* et *B. japonicum*, une concentration de l'ordre de 2% en matière organique assure une survie optimale de ces bactéries lors de la dessiccation (PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979; CHAO et ALEXANDER, 1982).

En tout état de cause, les matières organiques, essentiellement apportées par les exsudats racinaires et (ou) la décomposition des racines des plantes, n'assurent le maintien des bactéries qu'à court terme (quelques semaines). Quand ces matières organiques sont épuisées, d'autres facteurs abiotiques déterminent le niveau de survie de ces micro-organismes (BASHAN *et al.*, 1995). De plus, la biodisponibilité des substrats se réduit fortement dès 97% d'H.R. (STARK et FIRESTONE, 1995).

## **VI- CROISSANCE SOUS ACTIVITE DE L'EAU ( $a_w$ ) REDUITE**

La croissance et l'activité métabolique de micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) dépendent essentiellement des possibilités d'échanges de la cellule avec son milieu extérieur et donc de l'eau disponible (exprimée en terme d' $a_w$ ).

L'addition de soluté ioniques ou non ioniques dans les milieux de culture permet d'abaisser l' $a_w$  et reste la méthode de choix pour étudier les effets du stress osmotique sur ces micro-organismes.

### **1- Activité de l'eau de croissance de quelques micro-organismes**

L'importance de l' $a_w$  dans la conservation et l'innocuité des aliments est à l'origine de nombreux travaux. Dans le tableau 5 ont été reportées les  $a_w$ (s) minimales de croissance d'un certain nombre de micro-organismes.

Il est à noter qu'une  $a_w$  inférieure à 0,95 inhibe la multiplication de la majorité des bactéries à GRAM négatif, des bactéries capables de former

des endospores (*Bacillus*, *Clostridium*) ainsi que la germination de ces spores.

Parmi les principaux germes responsables de Toxi Infections Alimentaires, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropathogènes et *Vibrio parahaemolyticus* sont inhibés à des  $a_w(s)$  inférieures à 0,95. Par contre, *Staphylococcus aureus* montre une remarquable tolérance aux  $a_w(s)$  réduites (0,91 à 0,86).

La croissance et la toxinogénèse chez *Clostridium botulinum* (producteur des toxines de type A et B) sont fortement dépendantes de l' $a_w$  et de l'acidité. Le temps nécessaire de la détection de ces deux toxines passe de 7 à plus de 35 jours lorsque l' $a_w$  est abaissée de 0,981 à 0,960 (sous un pH d'environ 5). La croissance est totalement inhibée en dessous de 0,960 d' $a_w$  quel que soit le pH (McCLURE *et al.*, 1994).

Cependant *Bacillus* est capable de supporter des concentrations en NaCl normalement inhibitrices lorsqu'il subit un traitement préalable à des concentrations plus faibles en sel (VÖLKER *et al.*, 1992).

Les bactéries à GRAM positif utilisées en industrie alimentaire posent également le problème de la maîtrise du facteur  $a_w$ . Un certain nombre de ces bactéries sont en effet impliquées dans les processus de fermentations ou d'acidification. De manière générale, les bactéries à GRAM positif tolèrent mieux les baisses d' $a_w(s)$  que les bactéries à GRAM négatif. Ainsi *Brevibacterium lactofermentum* et *Corynebacterium glutamicum* utilisées dans la production commerciale d'acide glutamique et de lysine sont capables de se développer à 0,947 d' $a_w$  (SKJERDAL *et al.*, 1995). On peut également noter que l' $a_w$  minimale de croissance peut aussi varier au sein d'un même genre bactérien. En effet, *Brevibacterium linens* est non seulement capable de se multiplier à 0,91 d' $a_w$  mais son taux de croissance est optimal entre 0,984 et 0,967 (BERNARD *et al.*, 1993). Par contre, la croissance de *Lactobacillus helveticus* (utilisé dans l'affinage des fromages) est inhibée lorsque l' $a_w$  imposée par le NaCl atteint 0,97 (VALIK et GÖRNER, 1995).

**Tableau 5:**  $a_w$  minimale de croissance des micro-organismes associés aux aliments d'après LEISTNER et RÔDEL

$a_w$	Bactéries	Levures	Moisissures
0,98	<i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i>	-	-
0,97	<i>Clostridium</i>	-	-
0,96	<i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	-	-
0,95	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>	-	-
0,94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Vibrio</i>	-	-
0,93	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>		<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i>
0,92	-	<i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>	
0,91	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	-	-
0,90	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Hansenula</i> , <i>Saccharomyces</i>	-
0,88	-	<i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Torulopsis</i>	<i>Cladosporium</i>
0,87	-	<i>Debaryomyces</i>	-
0,86	<i>Staphylococcus</i>	-	<i>Paecilomyces</i>
0,80	-	<i>Saccharomyces</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>
0,75	Bactéries halophiles	-	<i>Aspergillus</i>
0,70	-	-	<i>Eurotium</i>
0,62	-	<i>Saccharomyces</i>	<i>Eurotium</i>



Les levures et moisissures tolèrent les  $a_w(s)$  les plus basses de l'ordre de 0,93 à 0,62 (LESAGE *et al.*, 1993; RAYNAL *et al.*, 1994; SAJBIDOR *et al.*, 1994; YOSHIKAWA *et al.*, 1995).

## **2- Effet de l' $a_w$ sur les (brady)rhizobia**

La déshydratation des sols s'accompagne en général d'une augmentation de la concentration ionique. Le NaCl est l'un des composés les plus répandus et pose de nombreux problèmes en agriculture. En effet dans le monde,  $4 \times 10^7$  hectares des sols sont affectés directement par la salinité, et environ 40% des terres peuvent être considérées comme ayant un problème de salinité potentiel (LAL et KHANNA, 1994).

La réussite des cultures de légumineuses repose donc sur le choix de souches tolérantes aux sels, capables de se développer et de noduler leurs hôtes sous ces conditions. La plupart des souches de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont inhibées par 100 mM ( $\cong 0,995$  d' $a_w$ ), mais la croissance à des concentrations en NaCl supérieures à 300 mM ( $\cong 0,988$  d' $a_w$ ) ont été observées chez *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium fredii*, et *Rhizobium tropici* (GRAHAM, 1992; ATHAR et JOHNSON, 1996). Ces résultats sont confirmés par les travaux de FUJIHARA et YONEYAMA (1993) qui observent encore une croissance chez *R. fredii* à 400 mM ( $\cong 0,984$  d' $a_w$ ) alors que *Bradyrhizobium japonicum* est incapable de se développer à 150mM de NaCl (environ 0,994 d' $a_w$ ). D'autres auteurs ont isolé des souches de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* capables de se développer à des concentrations en NaCl de 1,88M ( $\cong 0,934$  d' $a_w$ ). Les souches provenant de sols affectés par les problèmes de salinité sont plus tolérantes au NaCl (NAIR *et al.*, 1993). LAL et KHANNA (1994) ont isolé deux souches de *Bradyrhizobium* tolérantes, capables de noduler et de fixer l'azote dans des sols salins. Cependant ces souches sont capables de croître à des concentrations de 850mM ( $\cong 0,968$  d' $a_w$ ), mais ne peuvent noduler leurs hôtes qu'à une concentration inférieure à 200mM ( $\cong 0,992$  d' $a_w$ ). Des résultats similaires ont été observés chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (LEUNG et BOTTOMLEY, 1994).

La nature du soluté est également un paramètre déterminant (POTTS, 1994). MARY *et al.* (1986) ont montré que pour une même activité d'eau, les composés ioniques (KCl, NaCl et LiCl) se révèlent plus toxiques pour *R. meliloti* que le glycérol. Les mêmes observations ont été réalisées chez d'autres bradyrhizobia (ELSHEIKH et WOOD, 1990), chez *Aeromonas hydrophila* (SANTOS *et al.*, 1994) et chez *Lactobacillus helveticus* (VALIK et GÖRNER, 1995).

## VII- QUELQUES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES POUVANT INTERVENIR DANS LA TOLERANCE A LA DESSICCATION

### 1- Osmorégulation de l'espace périplasmique chez les rhizobia

Les glucanes cycliques des *Rhizobiaceae* sont localisés dans l'espace périplasmique. Leur structure et leur degré de polymérisation (nombre de molécule de glucose par cycle) varient selon les espèces. Ces polysaccharides ressemblent de aux Membrane-Derived-Oligosaccharides (M.D.O.) d'*Escherichia coli*.

Les M.D.O. de *Pseudomonas* présentent une structure linéaire et non cyclique (TALAGA *et al.*, 1994).

Ces glucanes jouent un rôle important dans l'osmorégulation de l'espace périplasmique (CANGELOSI *et al.*, 1990; DYLAN *et al.*, 1990; TULLY *et al.*, 1990; COHEN et MILLER, 1991; TALAGA *et al.*, 1994).

A forte  $a_w$  des milieux de culture, un flux net d'eau vers le cytoplasme conduit à augmenter la pression de turgescence intracytoplasmique, les glucanes cycliques neutres et plus particulièrement anioniques contribuent à augmenter la pression de turgescence dans le périplasme et donc à équilibrer la pression osmotique dans ces deux compartiments séparés par la membrane cytoplasmique (BREEDVELD *et al.*, 1990).

*R. meliloti* synthétise des  $\beta(1-2)$  glucanes à D.P.: 17-40 (BREEDVELD et MILLER, 1994). La proportion de glucanes anioniques est de 93%, 73% des phosphodiesteres sont composés de phosphoglycérol et 36% des acides

organiques par l'acide succinique (MILLER *et al.*, 1988). Chez *Agrobacterium*, le D.P. dépend de la compétition entre l'élongation et la cyclisation (WILLIAMSON *et al.*, 1992). Ces polysaccharides sont synthétisés à forte concentration quel que soit le stade de croissance (en phase exponentielle de croissance 63% des glucanes sécrétés dans le milieu sont anioniques contre 3% pour des cultures prises en phase stationnaire). Les glucanes cycliques neutres, sont les précurseurs des  $\beta(1-2)$  glucanes anioniques retrouvés chez cette souche (GEIGER *et al.*, 1991). Les polysaccharides capsulaires ne sont jamais détectés dans les conditions habituelles de cultures (BREEDVELD *et al.*, 1990).

Les *Rhizobium leguminosarum* (bv. *trifolii*, *phaseoli* et *viciae*) produisent des  $\beta(1-2)$  glucanes (D.P.: 17-25; glucanes substitués pratiquement indécélabes) dont la concentration tend à diminuer progressivement au cours de la croissance (BREEDVELD *et al.*, 1990), dans le même temps ces bactéries élaborent une capsule d'abord polaire puis entourant tout le corps bactérien (SHERWOOD *et al.*, 1984).

Ce processus d'encapsulation est retrouvé chez *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (MODY *et al.*, 1990). *Bradyrhizobium japonicum* synthétise des  $\beta(1-6)$  et  $\beta(1-3)$  glucanes cycliques (D.P.: 10-13; généralement non substitués) (COHEN et MILLER, 1991; BREEDVELD et MILLER, 1994) et une capsule qui reste polaire quel que soit le stade de développement (VASSE *et al.*, 1984). Les souches de *Bradyrhizobium* sont incapables de synthétiser des  $\beta(1-2)$  glucanes (INON DE IANNINO et UGALDE, 1993).

Il apparaît donc que les rhizobia adoptent deux stratégies différentes pour maintenir leur intégrité à forte  $a_w$ :

- concentrations élevées et constantes de  $\beta(1-2)$  glucanes anioniques (chez *Agrobacterium* et *R. meliloti*)
- synthèse de  $\beta(1-2)$  glucanes en faible quantité ou de  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-6)$  glucanes (généralement neutres) combinées à la présence d'une capsule entourant complètement le corps bactérien ou en localisation polaire. Cette capsule forme un « gel » capable de contrebalancer la pression de turgescence cytoplasmique.

Au cours de chocs hyperosmotiques (diminution de l' $a_w$ ), les *Rhizobiaceae* mettent en jeu deux types de mécanismes d'adaptation radicalement différents.

*Rhizobium meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* accumulent du tréhalose au niveau cytoplasmique. La quantité des  $\beta(1-2)$  glucanes reste constante. Ils ne sont ni excrétés ni dégradés chez *R. meliloti* alors que *R. leguminosarum* continue à les synthétiser et à les excréter (DYLAN *et al.*, 1990; BREEDVELD *et al.*, 1993). Les  $\beta(1-2)$  glucanes sécrétés dans le milieu provoquent une rétroinhibition de leur synthèse chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (BREEDVELD *et al.*, 1992).

Chez *B. japonicum*, du tréhalose serait synthétisé, la synthèse de la capsule n'est pas affectée, par contre une inhibition totale de l'élaboration des glucanes périplasmiques est mise en évidence (TULLY *et al.*, 1990). Le même type de réponse est observé chez les rhizobia nodulant *Arachis hypogea* (GHITTONI et BUENO, 1995 et 1996).

La croissance en milieu de faible  $a_w$  conduit donc à l'accumulation de soluté compatible (ex: tréhalose) et à une modification de la synthèse des glucanes cycliques périplasmiques. La disparition de ces glucanes au cours du choc hyperosmotique, ainsi qu'une capsule polaire donc incomplète et incapable de jouer un rôle mécanique à l'encontre de la pression de turgescence, pourraient être en défaveur des cellules de *B. japonicum* lors de la réhydratation (choc hypoosmotique). Ce choc hypoosmotique se révèle être particulièrement défavorable à la survie des micro-organismes (KOSANKE *et al.*, 1992).

## **2- Accumulation de solutés compatibles**

Divers organismes, phylogénétiquement très éloignés (Eubactéries, Cyanobactéries, Algues, Champignons, Plantes vasculaires et même certains insectes et crustacés) accumulent en réponse directe à des stress hydriques (concentrations élevées en sels, dessiccation, gel...) des osmolytes intracellulaires (YANCEY *et al.*, 1982). Ces solutés assurent l'équilibre osmotique tout en restant compatibles avec le métabolisme

cellulaire. Ils sont généralement polaires, hautement solubles et ne sont pas chargés à pH physiologique. Certains d'entre eux sont des acides aminés (exemple: proline, acide glutamique ou glycine), et d'autres en dérivent (exemple: betaine, ectoine, N-acétylglutaminylglutamine). Ces solutés assurent la stabilité des molécules et permettent une protection contre les effets destructeurs des sels, de la congélation, et de la dessiccation. En biotechnologie on les utilise pour leur pouvoir protecteur dans l'industrie enzymatique et dans la conservation des micro-organismes (GALINSKI, 1993; LOUIS *et al.*, 1994). La nature et le mode d'accumulation de ces solutés compatibles varient suivant les micro-organismes (Tableau 6).

Un changement dans l'osmolarité du milieu est ressenti par les bactéries, cette information est convertie en un processus d'adaptation qui tend à restaurer la pression de turgescence. La réaction physiologique des cellules à l'encontre de ce changement du milieu est fortement coordonnée et varie selon le degré d'halotolérance des espèces bactériennes (WELSH et HERBERT, 1993 a). La perte d'eau déclenche un flux rapide d'ions  $K^+$  vers le cytoplasme (WELSH et HERBERT, 1993b) via un transporteur spécifique et la synthèse concomitante d'une contre charge, généralement du glutamate. Ceci est observé dans les milieux à osmolarité modérée. Sous une forte osmolarité, l'ion  $K^+$  et le glutamate sont insuffisants pour assurer la croissance.

Ces composés seront donc remplacés par d'autres moins nocifs (LUCHT et BREMER, 1994). Chez *R. meliloti* et *Pseudomonas* l'accumulation du N-acétylglutaminylglutamine amide (D'SOUZA-AULT *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1994b) semble provenir du métabolisme du glutamate activé par l'ion  $K^+$ . Chez ces deux genres bactériens, le tréhalose est accumulé à forte osmolarité (BREEDVELD *et al.*, 1993; D'SOUZA-AULT *et al.*, 1993, SMITH *et al.*, 1994b).

**Tableau 6:** Solutés compatibles récemment rapportés chez les procaryotes d'après CSONKA et HANSON (1991).

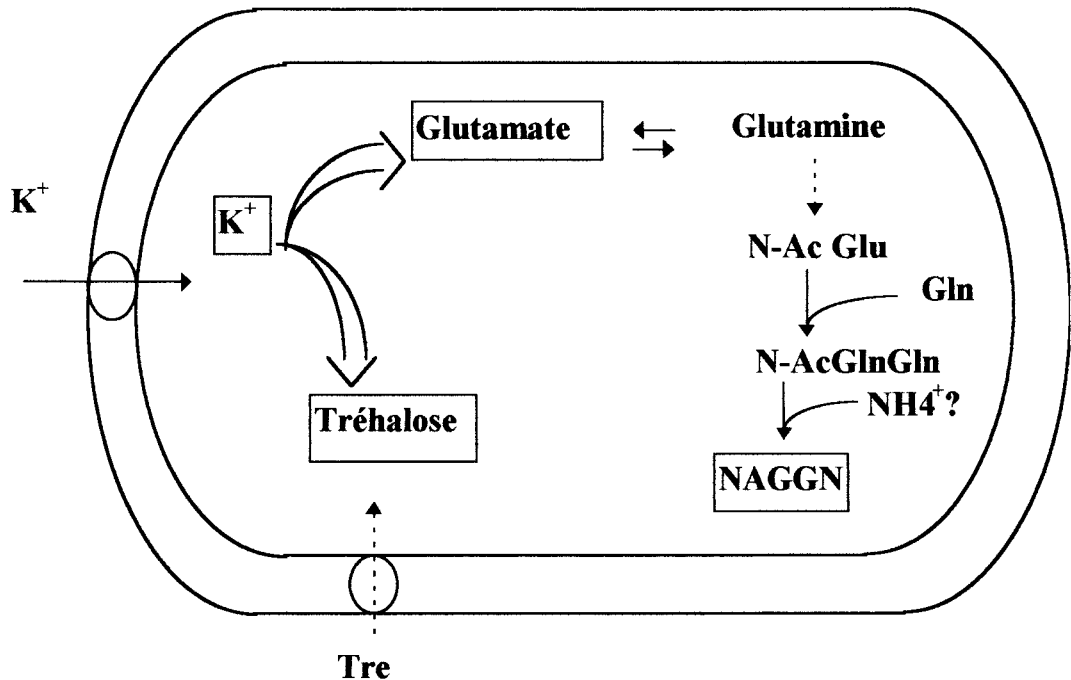
Soluté	Espèces bactériennes	Mode d'accumulation <sup>a</sup>
<b>K<sup>+</sup></b>	<i>Escherichia coli</i>	T
	<i>Rhizobium meliloti</i>	T
	<i>Listeria monocytogenes</i> (5)	T
<b>Amino-acides</b>		
Glycine	<i>L. monocytogenes</i> (5)	S, T
Glutamate	<i>Methanogenium anulus</i> ,	?
	<i>Methanogenium cariaci</i> ,	
	<i>Methanococcus igneus</i> ,	
	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> ,	
	<i>R. meliloti</i>	S, T
	<i>Rhizobium sp.</i>	T
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	S
	<i>Yersinia enterocolitica</i> (6)	S
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (8)	S
β-Glutamate (β-Aminoglutarate)	<i>M. anulus</i> ,	?
	<i>M. cariaci</i>	
	<i>M. igneus</i> ,	
	<i>Methanococcus jannaschii</i> ,	
	<i>M. thermolithotrophicus</i>	
Glutamine	<i>E. coli</i>	S, T
Proline	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	S
	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	T
	<i>Lactococcus lactis</i> (2)	T
	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	T
	<i>L. monocytogenes</i> (5)	S
	<i>C. glutamicum</i> (8)	S
<b>Disaccharides</b>		
Trehalose	<i>Ectothiorhodospira halochloris</i>	S
	<i>E. coli</i>	S
	<i>Myxococcus xanthus</i>	S
	<i>Rhizobium sp.</i>	S
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	?
	<i>P. aeruginosa</i> (1)	S
	<i>Salmonella manhattan</i> (7)	S
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	S
Mannosucrose (β-furanosyl-α-mannopyranoside)		
<b>N-methyl amino-acides</b>		
	<i>Azospirillum brasilense</i>	T
	<i>Vibrio costicola</i>	T
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> RCR 3407	T
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	T
	<i>Brevibacterium linens</i> (4)	T
	<i>E. halochloris</i>	T
	<i>M. anulus</i> ,	?
	<i>M. cariaci</i> ,	
	<i>Methanococcus voltae</i> ,	
	<i>Methanohalophilus mahii</i> ,	
	<i>Methanohalophilus zhilinae</i>	
	<i>Methanosarcina thermophila</i>	T
	<i>R. meliloti</i>	S <sup>b</sup> , T
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	S <sup>b</sup> , T
	<i>P. aeruginosa</i> (1)	T
	<i>L. lactis</i> (2)	T
	<i>S. aureus</i> (3)	T

	<i>L. monocytogenes</i> (5)	S, T
	<i>Y. enterocolitica</i> (6)	T
Proline betaine (Stachydrine)	<i>R. meliloti</i>	T
Taurine betaine	<i>Klebsiella pneumonia</i>	T
Acide $\gamma$ -Amino butyrique betaine	<i>K. pneumonia</i>	T
$\beta$ -Alanine betaine	<i>E. coli</i>	T
	<i>Salmonella typhimurium</i>	T
Carnitine	<i>E. coli</i>	T
	<i>Y. enterocolitica</i> (6)	T
Acide $\gamma$ -aminocrotonique betaine	<i>E. coli</i>	T
<b>Peptides</b>		
$\gamma$ -Glutamylglutamine Glutathione	<i>E. coli</i>	S
	<i>E. coli</i>	S
N-Acetylglutamylglutamine	<i>R. meliloti</i>	S
	<i>P. aeruginosa</i> (1)	S
<b>Autres</b>		
Ectoine (Acide 1,4,5,6- tetra-hydro-2-méthyl-4-pyrimidine carboxilique)	<i>V. costicola</i>	S
	<i>E. halochloris</i>	S
	<i>Deleya halophila,</i>	S
	<i>Halomonas elongata,</i>	
	<i>Halomonas halinophila</i>	
	<i>Brevibacterium linens</i> (4)	S
N-acetyl- $\beta$ -lysine	<i>M. thermophila</i> et autres bactéries méthanogènes	S
3-diméthylsulphoniopropionate	<i>K. pneumonia</i>	T
3-(N-Morpholino) propanesulphonate	<i>E. coli</i>	T
Choline	<i>B. linens</i> (4)	T
	<i>L. monocytogenes</i> (5)	T
Choline-O-sulphate	<i>K. pneumonia</i>	T
	<i>E. coli</i>	T
	<i>S. typhimurium</i>	T
Glucosylglycérol	<i>Pseudomonas mendocina</i> (9)	?

<sup>a</sup> S= synthétisé; T= transporté du milieu; ?= mécanisme inconnu. [<sup>b</sup> La synthèse de la glycine betaine se fait seulement à partir de la choline].

- 1 = D'SOUZA *et al.* (1993);  
2 = MOLENAAR *et al.* (1993)  
3 = BAE *et al.* (1993)  
4 = BERNARD *et al.* (1993)  
5 = PATCHETT *et al.* (1992)  
6 = PARK *et al.* (1995)  
7 = DUPRAY *et al.* (1995)  
8 = GUILLOUET et ENGASSER (1995)  
9 = POCARD *et al.* (1994)

Le schéma suivant résume bien les observations précédentes (SMITH *et al.*, 1994 a):



Une croissance préalable d'*E. coli* à une  $a_w$  modérée permet à cette bactérie de résister à un stress osmotique plus important (ISHIDA *et al.*, 1994). En effet une préculture dans un milieu à osmolarité modéré, active des ATPases membranaires, responsable de l'induction de synthèses ou d'accumulation de solutés compatibles (NISHI et YAGI, 1992).

L'osmorégulation chez *B. japonicum* reste encore imparfaitement étudiée en raison de la sensibilité de cette bactérie aux composés ioniques (MARY *et al.*, 1986; TULLY *et al.*, 1990; FUJIHARA et YONEYAMA, 1993) bien que l'intervention du tréhalose ait été invoquée (ELSHEIKH et WOOD, 1990; TULLY *et al.*, 1990). Ce disaccharide intervient au niveau de la membrane bactérienne en abaissant sa température de transition. Il remplace les molécules d'eau et protège les structures protéiques, et les cellules contre les effets de la lumière, de l'air et de la déshydratation (ELEUTHERIO *et al.*, 1993; ISRAELI *et al.*, 1993; LESLIE *et al.*, 1995). Donc l'accumulation du tréhalose par les rhizobia au cours de la croissance en milieu à faible  $a_w$  (DYLAN *et al.*, 1990; BREEDVELD *et*



*al.*, 1993) pourrait bien être une première étape d'adaptation à la dessiccation compte tenu du rôle indéniable que joue ce composé dans la tolérance à la dessiccation chez d'autres micro-organismes (HERSHKOVITZ *et al.*, 1991; ELEUTHERIO *et al.*, 1993; BURLEIGH et DAWSON, 1994). Les possibilité d'augmenter la concentration cellulaires en tréhalose par un choix judicieux du milieu de culture (STREETER, 1985; BURLEIGH et DAWSON, 1994), de l'oxygenation du milieu de culture (HOELZLE et STREETER, 1990; BREEDVELD *et al.*, 1993), ou par choc thermique (HOTTIGER *et al.*, 1987; NEVES *et al.*, 1991), pourraient présenter de nombreux intérêts pour la stabilisation des inocula déshydratés de (brady)rhizobia.

## **VIII- LES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES ET LEUR RÔLE DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE BACTERIENNE LORS DE STRESS POUVANT ETRE LIES DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT A LA DESSICCATION**

### **1- Structure et composition des lipides membranaires chez les *Rhizobiaceae***

#### **a- Les acides gras (A.G.)**

Les compositions qualitatives et quantitatives des acides gras (A.G.) des différentes espèces des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont rapportées dans les tableaux 7 et 8 (JARVIS et TIGHE, 1994; GRAHAM *et al.*, 1995).

Les espèces du genre *Rhizobium* montrent une plus grande diversité d'A.G.(s) ( $\cong$  12 à 15 A.G.(s) différents) que les espèces du genre *Bradyrhizobium* ( $\cong$  5 à 8 A.G.(s) différents).

Trois A.G.(s) majeurs sont systématiquement présents: le C16:0, le C19:0 cyclo 11-12 et le C18:1w7c.

Chez les bradyrhizobia, ces trois A.G.(s) représentent approximativement 95% des A.G.(s) détectés chez *B. japonicum*, 97% des A.G.(s) de *B. elkanii* et 98 à 99% des A.G.(s) des *Bradyrhizobium* sp. (KUYKENDALL *et al.*, 1988 et 1992; GRAHAM *et al.*, 1995).

Chez les rhizobia, ils constituent 78 à 85% des A.G.(s) totaux (JARVIS et TIGHE, 1994).

Les proportions relatives de chacun de ces A.G.(s) sont cependant très représentatives des genres et des espèces. Ainsi les bradyrhizobia contiennent plus de C18:1w7c (66% à 84%) que les rhizobia (21 à 62%) exception faite de *R. fredii* (70%). Par contre, ces mêmes bradyrhizobia affichent de 1,5 à 11% de C19:0 cyclo 11-12 (sauf *B. elkanii*: 20,5%) alors que les rhizobia en présentent de 14 à 52,5% (sauf *R. fredii*: 4,7%).

Il est remarquable de noter que *R. fredii*, espèce à croissance rapide, nodule le soja comme *B. japonicum*.

Les proportions relatives en ces trois A.G.(s) (notamment le % en C19:0 cyclo 11-12) rapprochent *B. elkanii* de *R. meliloti* plutôt que de *B. japonicum* (cf Tableau 7 et 8).

La présence d'A.G.(s) hydroxylés a été rapportée chez de nombreux genres appartenant aux *Rhizobiaceae* (WEIBGEN *et al.*, 1993; BHAT *et al.*, 1994, JARVIS et TIGHE, 1994). Ces A.G.(s) sont caractéristiques du lipide A des bactéries GRAM négative. La position de la fonction hydroxyle (3-OH ou 2-OH) et la longueur de la chaîne carbonée varient selon les espèces au sein du genre *Rhizobium* (JARVIS et TIGHE, 1994). La quantité varie également en fonction de la méthode d'extraction utilisée. Dans certains lipides A, une large proportion d'acides gras hydroxylés est liée aux sucres par des liaisons amides (URBANIK-SYPNIEWSKA *et al.*, 1989; BHAT et CARLSON, 1992; HARRATA *et al.*, 1993; BHAT *et al.*, 1994) et dans ce cas une hydrolyse acide est préférable pour rompre ces liaisons (MAYBERRY et LANE, 1993), notamment chez *Bradyrhizobium*.

**Tableau 7:** Composition en Acides.Gras<sup>(a)</sup>. de différentes espèces du genre *Rhizobium* (JARVIS et TIGHE, 1994).

Acide Gras	<i>R. fredii</i>	<i>R. galegae</i>	<i>R. leguminosarum</i>			<i>R. loti</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>R. tropici</i>
			bv. <i>phaseoli</i>	bv. <i>trifolii</i>	bv. <i>viceae</i>			
C12:0 3OH	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	0,40 ± 0,40	ND	ND
C13:0 iso 3OH	ND	ND	ND	ND	ND	1,39 ± 0,41	ND	ND
C16:1w7cis	0,79 ± 0,77	0,54 ± 0,34	0,63 ± 0,34	0,37 ± 0,36	0,51 ± 0,26	0,45 ± 0,57	0,34 ± 0,21	< 0,2
C16:0	5,52 ± 1,88	9,49 ± 1,78	4,74 ± 1,98	4,31 ± 1,31	3,37 ± 1,05	16,38 ± 2,21	4,94 ± 1,14	7,72 ± 2,26
C15:0 iso 3OH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,48 ± 0,50
C15:0 2OH	ND	ND	0,95 ± 0,53	0,83 ± 0,59	0,81 ± 0,59	ND	ND	ND
C15:0 3OH	ND	ND	<0,2	ND	0,20 ± 0,49	ND	ND	ND
C17:0 iso	ND	ND	ND	ND	ND	9,11 ± 2,27	ND	1,00 ± 0,27
C17:0 cyclo	0,27 ± 0,48	<0,2	<0,2	0,24 ± 0,36	<0,2	0,82 ± 0,54	0,75 ± 0,31	0,75 ± 0,50
C17:0	0,66 ± 0,47	0,44 ± 0,40	0,51 ± 0,65	0,31 ± 0,38	0,79 ± 1,13	0,59 ± 0,65	0,54 ± 0,24	<0,2
C16:0 3OH	0,50 ± 0,38	3,18 ± 0,63	1,23 ± 0,19	1,39 ± 0,22	1,46 ± 0,68	ND	0,68 ± 0,12	3,97 ± 0,26
C18:1w9cis	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,28 ± 0,50	0,38 ± 0,49	<0,2	ND
C18:0	4,72 ± 1,23	1,29 ± 0,52	8,26 ± 2,51	8,61 ± 2,04	8,19 ± 2,50	5,01 ± 1,40	2,70 ± 0,72	2,66 ± 1,21
C17:0 iso 3OH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,31 ± 0,24
C19:0 cyclo	4,68 ± 3,86	31,27 ± 9,12	14,29 ± 6,04	18,25 ± 6,43	13,48 ± 5,17	25,9 ± 9,19	22,56 ± 8,25	52,74 ± 9,63
C18:1 2OH	ND	ND	<0,2	ND	ND	0,50 ± 0,71	ND	0,98 ± 0,74
C19:0 10methyl	0,51 ± 0,51	2,24 ± 0,49	<0,2	ND	<0,2	1,37 ± 0,51	0,85 ± 0,26	ND
C20:3w6,9,12cis	3,34 ± 1,01	1,34 ± 0,43	2,32 ± 0,99	2,59 ± 0,35	2,27 ± 0,75	ND	2,94 ± 0,33	2,09 ± 0,64
C20:2w6,9cis	ND	<0,2	ND	ND	ND	<0,2	<0,2	0,50 ± 0,12
Summed feature 3 <sup>c</sup>	7,96 ± 2,63	4,88 ± 0,46	6,50 ± 1,25	6,56 ± 0,49	6,25 ± 0,82	ND	6,45 ± 0,70	2,48 ± 0,68
Summed feature 7 <sup>d</sup>	70,6 ± 5,53	44,91 ± 10,45	59,66 ± 6,20	56,45 ± 8,44	61,84 ± 6,38	37,56 ± 7,08	57,01 ± 8,27	21,13 ± 10,53

<sup>a</sup> % moyen ± écart-type

<sup>b</sup> ND: Non Détectable

<sup>c</sup> summed feature 3: C12:0 aldehyde (?), C16:1 iso, C14:0 3OH

<sup>d</sup> summed feature 7: C18:1w7c/w9t/w12t, C18:1w9c/w12t/w7c et C18:1wt/w9t/w7c

**Tableau 8:** Composition en Acides Gras<sup>(a)</sup> de différentes espèces du genre *Bradyrhizobium* (GRAHAM *et al.*, 1995).

Fatty acid	<i>B. japonicum</i>		<i>B. elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	
	Group IA	Group IB		Group 1	Group 2
C12:0 3OH	ND	ND	ND	ND	ND
C14:0	ND	ND	ND	ND	ND
C15:0	ND	ND	ND	ND	ND
C16:1w7c	0,88 ± 0,79	1,08 ± 0,73	0,41 ± 0,38	ND	0,81 ± 0,10
C16:1w5c	2,84 ± 1,76	ND	ND	ND	ND
C16:0	12,43 ± 2,59	11,88 ± 1,63	11,09 ± 2,39	9,89 ± 0,91	10,34 ± 0,92
C17:1w8c	0,48 ± 0,47	ND	ND	ND	ND
C17:1w6c	ND	ND	ND	ND	ND
C17:0 cyclo	ND	ND	0,97 ± 0,42	ND	0,68 ± 0,42
C17:0	ND	ND	ND	ND	ND
C18:1w5c	ND	ND	ND	ND	ND
C18:0	0,71 ± 0,47	0,58 ± 0,41	0,44 ± 0,28	ND	ND
C19:0 cyclo w8c	ND	1,44 ± 1,00	20,49 ± 3,86	10,87 ± 2,44	8,53 ± 1,43
C20:2w6,9c	ND	ND	ND	ND	ND
Sum feature 7 <sup>c</sup>	82,29 ± 3,72	83,42 ± 2,76	66,05 ± 5,10	78,73 ± 2,62	79,38 ± 2,08

<sup>a</sup> % moyen ± écart-type

<sup>b</sup> ND: Non Détectable

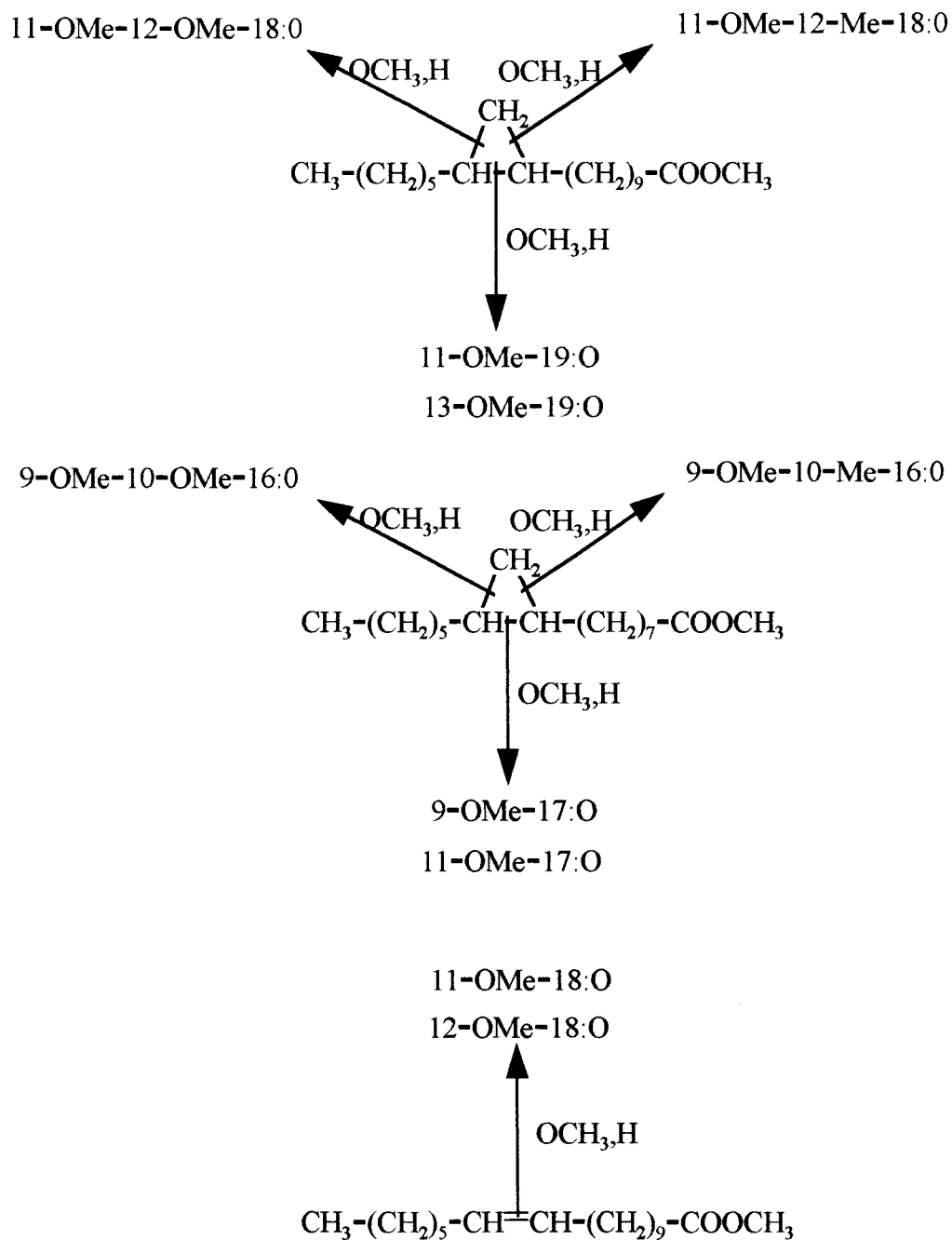
<sup>c</sup> summed feature 7: C18:1w7c/w9t/w12t, C18:1w9c/w12t/w7c et C18:1wt/w9t/w7c

En effet, ce n'est que dans ces conditions que les A.G.(s) hydroxylés ont été décelés chez *B. japonicum* (CARRION *et al.*, 1990). Cependant cette technique n'est pas totalement efficace. D'après BHAT et CARLSON (1992) une méthanolyse (2M HCL, 80°C, 18h) du lipide A de *R. leguminosarum* ne permet de rompre qu'une partie des liaisons amides. Des observations similaires ont été signalées chez *B. japonicum* (CARRION *et al.*, 1990).

Cependant, au cours de cette méthode d'extraction acide d'autres A.G.(s) peuvent être altérés. Dans ce cas on observe l'apparition d'A.G.(s) non naturels qui dérivent d'une altération chimique due à la méthode d'extraction utilisée. Ceci est le cas des dérivés méthylés et méthoxylés formés après hydrolyse acide des A.G.(s) cycliques (notamment l'acide lactobacillique, prépondérant chez de nombreuses espèces) et insaturées. ORGAMBIDE *et al.*(1993a) ont établi un mécanisme de formation de ces A.G.(s) méthylés et méthoxylés après une méthanolyse acide à partir d'A.G.(s) contenant un cyclopropane ou une insaturation (C19:0 cyclo, C17:0 cyclo et C18:1). Ce mécanisme a été étudié chez *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (figure 3). La formation de ces dérivés disparaît avec une méthanolyse alcaline, qui semble préserver les acides gras cycliques et insaturés contre ces réactions intermédiaires.

La synthèse des A.G. cycliques s'effectue par le remplacement d'une double liaison d'un A.G. *cis* insaturé (souvent un C16:1 et C18:1) par un groupement méthyle provenant du méthyle S-adenosyl methionine (CRONAN et ROCK, 1987). L'enzyme responsable est localisée dans le cytoplasme. Lors de la synthèse de ces A.G.(s), elle s'intercale entre les phospholipides en reconnaissant la position de l'insaturation à méthyler (WANG *et al.*, 1992).

La membrane cytoplasmique et la membrane externe de différentes souches de *R. meliloti* présentent une composition qualitative et quantitative en A.G.(s) identique (HUBAC *et al.*, 1992).



**Figure 3:** Représentation schématique de la formation des A.G.(s) méthylés et méthoxylés à partir de leurs précurseurs C19:0 cyclo, C17:0 cyclo et C18:1 (D'après ORGAMBIDE *et al.*, 1993 a)

## **b- Les phospholipides**

Les membranes cytoplasmique et externe de *Rhizobium meliloti* contiennent non seulement les trois phospholipides caractéristiques des bactéries à GRAM négatif, le phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG) et le diphosphatidylglycérol (DPG) mais également des quantités importantes de phosphatidylcholine (MILLER *et al.*, 1990; HUBAC *et al.*, 1992). Le phosphatidylcholine (PC) est probablement synthétisée par méthylation progressive de la PE. Les deux intermédiaires métaboliques (phosphatidyl-N-monométhyl-éthanolamine et phosphatidyl-N,N-diméthyléthanolamine) sont en effet retrouvés en quantités appréciables chez *R. meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (HUBAC *et al.*, 1992; ORGAMBIDE *et al.*, 1993b).

Deux lipides neutres (diglycéride et triglycéride), de la phosphatidylserine sont représentés (<à 4% chacun) ainsi que des traces de lysophospholipide (1%) (HUBAC *et al.*, 1990). Cependant ces composés ne sont pas détectés lors de travaux de MILLER *et al.* (1990), la technique de détection utilisée par ces auteurs est probablement la cause de ces résultats discordants.

Les deux membranes (cytoplasmique et externe) présentent des compositions quantitatives et qualitatives très proches. La seule différence notable réside en une concentration en diphosphatidylglycérol deux fois plus importante dans la membrane cytoplasmique (HUBAC *et al.*, 1992)

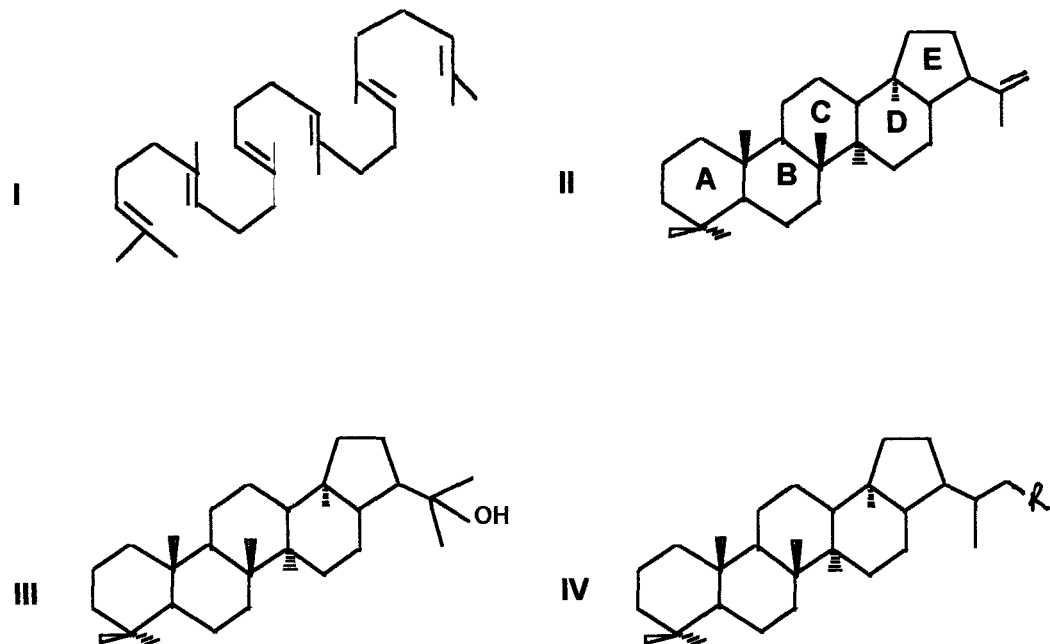
*Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium* sp.32H1 ne présentent pas les mêmes proportions en PC, PE et PG. Le profil (qualitatif et quantitatif) des phospholipides observés chez *Bradyrhizobium* sp. 32H1 est beaucoup plus proche de celui des *R. meliloti* que de celui de *B. japonicum* (MILLER *et al.*, 1990). *Bradyrhizobium japonicum* présente des quantités de 1,5 à 2 fois plus importantes en PC que celles observées chez *Bradyrhizobium* sp. et *R. meliloti* respectivement. Ce phospholipide n'est pas fréquemment rencontré en quantité importante chez les micro-

organismes néanmoins chez les *Rhizobiaceae*, il jouerait un rôle important lors de l'infection des légumineuses.

### c- Les hopanoides

Les hopanoides constituent une classe de lipides à structure de type triterpénoïde pentacyclique. Ils sont essentiellement isolés chez les bactéries (à GRAM positif et négatif) et sont considérés comme des stabilisateurs des membranes.

Les travaux de KANNENBERG *et al.* (1995) démontrent la présence de ces composés chez *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* et *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. L'hopène, le diploptérol, des dérivés d'hopanoïde à chaîne latérale et le squalène (précurseur biosynthétique de ces hopanoides) ont ainsi été détectés. Leurs structures chimiques sont rapportées en figure 4. Chez certaines souches de bradyrhizobia, les hopanoides représentent jusqu'à 40% de la fraction lipidique totale mais seulement 4% pour d'autres souches.



**Figure 4:** Structure des triterpénoïdes identifiés chez les bradyrhizobia. I, squalène; II, hopène; III, Diploptérol; IV hopanoïde substitué (R= polyol) (d'après KANNENBERG *et al.*, 1995).



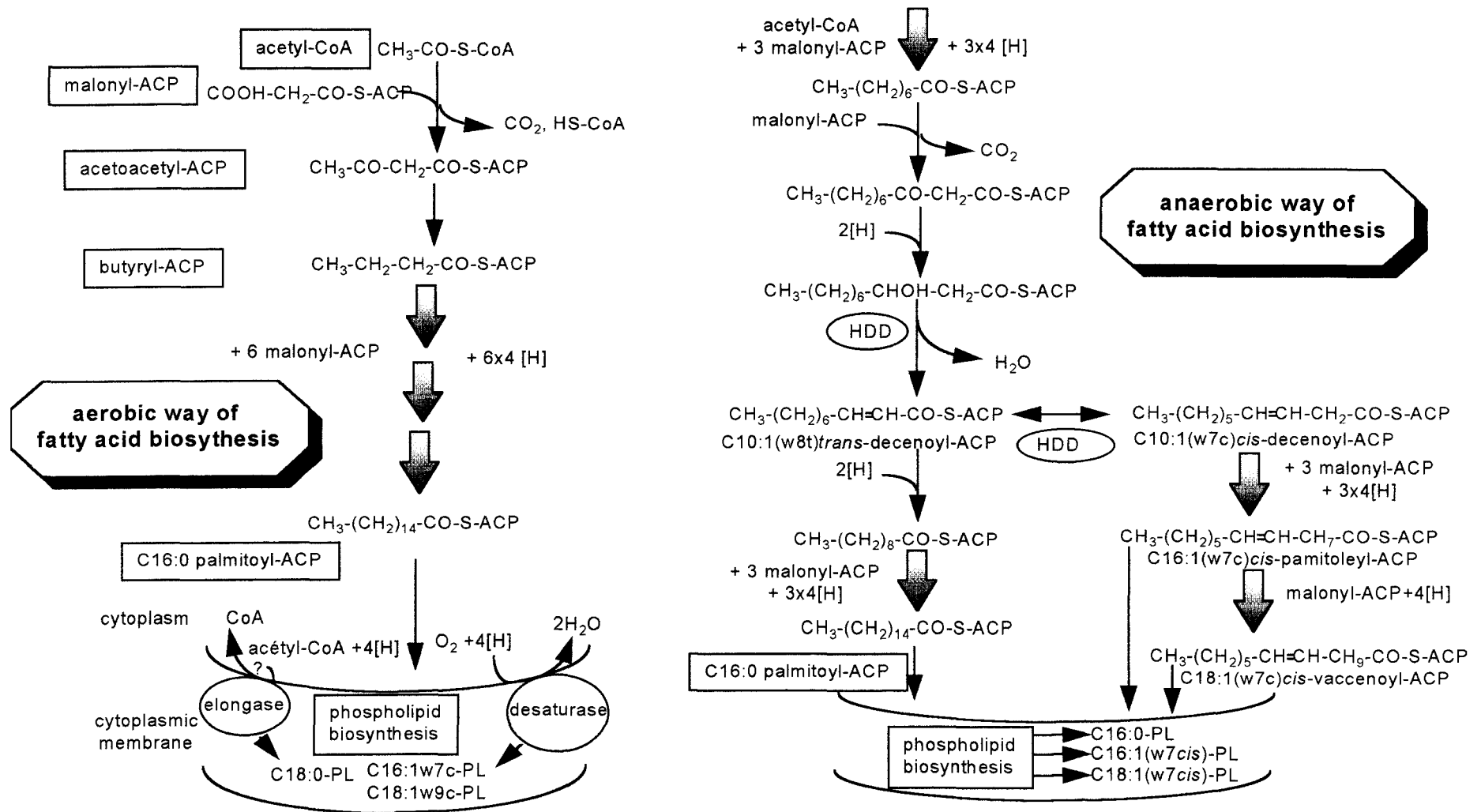
*Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et *Rhizobium fredii* sont totalement dépourvus de ces hopanoïdes (KANNENBERG *et al.*, 1995).

## **2- Quelques notions sur la synthèse des A.G. insaturés**

La synthèse des A.G.(s) insaturés chez les procaryotes se déroule selon deux voies métaboliques différentes. Une voie aérobie qui caractérise de nombreuses bactéries aérobies strictes et des cellules eucaryotes, et une voie anaérobie communément connue chez les procaryotes. Cette dernière voie a été largement décrite chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (CRONAN et ROCK, 1987). Elle caractérise les bactéries anaérobies, aéro-anaérobies facultatives et quelques bactéries aérobies strictes.

Pour la voie aérobie (figure 5), la synthèse des A.G.(s) insaturés est un processus totalement membranaire. La synthèse des A.G.(s) au niveau du cytoplasme s'arrête au C16:0-ACP (ACP pour Acyl Carrier Protein). Cet A.G. est ensuite intégré dans les phospholipides pour subir soit une élongation ou une désaturation qui aboutit au C16:1w7c (Ac. palmitique). Le C18:1w9c provient d'une désaturation du C18:0 lié aux phospholipides (après addition d'un acétate au C16:0) (KEWELOH et HEIPIEPER, 1996). Chez les cyanobactéries la synthèse des A.G. polyinsaturé semble emprunter cette voie (MURATA et WADA, 1995).

La synthèse des A.G. par voie anaérobie (figure 5) se produit exclusivement au niveau cytoplasmique. Les A.G.(s) sont ensuite intégrés au niveau des phospholipides. Les A.G.(s) insaturés empruntent une voie métabolique différente de celle des A.G.(s) saturés. Ces deux voies se séparent à partir du C10:0 3OH-ACP. Donc dans ce cas la synthèse des A.G.(s) insaturés est totalement indépendante des A.G. saturés. Il est aussi intéressant de noter que la synthèse de l'acide *cis* vaccinique (C18:1w7c) est caractéristique de la voie anaérobie (KEWELOH et HEIPIEPER, 1996).



**Figure 5:** Les voies aérobie et anaérobie de synthèse et d'incorporation des acides gras dans les phospholipides d'après KEWELOH et HEIPIEPER (1996). PL, phospholipides; ACP, acyl carrier protein; HDD,  $\beta$ -hydroxydecanoyl-ACP-déhydratase.

Certaines espèces notamment dans le genre *Pseudomonas*, sont capables d'utiliser les deux voies pour la synthèse des A.G. insaturés (WADA *et al.*, 1991).

### **3- Différents facteurs pouvant influencer l'état des lipides membranaires**

La membrane externe est la première barrière physiologique qui permet aux micro-organismes à GRAM négatif de supporter les conditions extrêmes rencontrées dans l'environnement. Elle est en effet la première structure en contact avec l'extérieur en dehors de certaines structures externes (capsule...).

Cette bicouche lipidique a une composition en A.G. très variable selon les genres et espèces. Récemment elle est devenue un outil taxonomique, dont l'atout principal est la rapidité d'obtention des résultats. En effet certains genres bactériens peuvent présenter des A.G(s). particuliers, comme les A.G.(s) polyinsaturés, rarement rencontrés chez les bactéries aérobies (WELSH, 1991), les A.G.(s) ramifiés rapportés à l'origine chez *Bacillus subtilis* (KANEDA, 1991) ou les A.G.(s) hydroxylés caractéristiques des bactéries GRAM négatif.

Les changements dans les conditions du milieu environnant entraînent une variation quantitative et/ou qualitative au niveau de ces composés. ces adaptations permettent aux micro-organismes de tolérer voire résister aux conditions extrêmes. Souvent ces changements en A.G. sont corrélés avec un changement de fluidité membranaire, qui peut être exprimé en terme de température de transition ou passage de l'état liquide cristallin à l'état de gel ou l'inverse selon les conditions du milieu.

Toute altération dans la composition des lipides membranaires peut avoir des répercussions importantes au niveau de la survie suite à un ou

plusieurs stress. Certains stress (ex:  $a_w$ , température, privation nutritionnelle...) peuvent entraîner des changements physiologiques et avoir des conséquences favorables (amélioration de la survie) quand les bactéries sont confrontées à un autre stress (ex: dessiccation).

#### **a- Age physiologique**

Au cours de la croissance bactérienne, les A.G.(s) subissent des variations quantitatives. De manière générale, les A.G.(s) mono-insaturés (C16:1w7c, C18:1w9c et C18:1w7c) sont progressivement transformés en A.G.(s) cycliques (C17:0 cyclo 9-10, C19:0 cyclo 9-10 ou C19:0 cyclo 11-12) et les C16:0 diminuent au cours de la croissance. Ce phénomène est d'autant plus accentué que la température d'incubation des cultures est élevée (> à 20°C) notamment chez les *Pseudomonas* (CULLEN *et al.*, 1971). Cette conversion est beaucoup plus rapide pendant la phase de décélération (CULLEN *et al.*, 1971; MAC KENZIE *et al.*, 1979).

D'autre part, chez *Pseudomonas putida*, le degré d'insaturation diminue fortement au cours de cette phase de décélération alors que le rapport *trans/cis* des A.G.(s) insaturés demeure constant pendant les différentes phases de la croissance (DIEFENBACH *et al.*, 1992).

*Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium elkanii* et *Rhizobium meliloti*, convertissent le C18:1 w7c en C19:0 cyclo 11-12 (MACKENZIE *et al.*, 1979; HUBAC *et al.*, 1992). Chez *Pseudomonas fluorescens*, la conversion se produit plutôt entre le C16:1w7c et le C17: cyclo 9-10 (CULLEN *et al.*, 1971).

Les bactéries à GRAM positif, tels *Lactobacillus fermentum* et *Leuconostoc oenos*, transforment le C18:1w9c en C19:0 cyclo 9-10 et en C19:0 cyclo 11-12 (SUUTARI et LAAKSO, 1992; DRICI-CACHON *et al.*, 1996).

Chez les *Thermus* spp., bactéries thermophiles à GRAM négatif, les concentrations en C15:0 iso, C17:0 iso et C16:0 iso augmentent avec l'âge de la culture chez les souches pigmentées en jaune. Chez les souches

à pigment rouge le C15:0 iso augmente et les C16:0 diminuent. La quantité d'A.G.(s) augmente avec l'âge de la culture (NORDSTRÖM, 1992).

Par ailleurs, deux autres constituants cellulaires, les polyamines et le tréhalose dont les concentrations peuvent varier en fonction du stade de croissance ont été impliqués dans la tolérance à la dessiccation et/ou aux chocs osmotiques. Ils agissent également au niveau de la membrane en abaissant la température de transition de phase.

En raison de ces quatre charges positives à pH physiologique, la spermine permet un pontage des charges négatives plus effectif et donc une stabilisation plus importante que la spermidine ou la putrescine (SOUZU, 1986). Chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, les polyamines sont concentrées préférentiellement dans la membrane externe où leur teneur est de 4 à 10 fois supérieure à celle observée dans la membrane cytoplasmique (KOSKI et VAARA, 1991). L'un des effets physiologiques des polyamines serait de stabiliser les membranes externes des micro-organismes.

Les *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et quelques souches d'*Agrobacterium* contiennent de la putrescine et surtout de l'homospermidine comme polyamines majeurs. La majorité des espèces d'*Agrobacterium* contiennent de la putrescine et surtout de la spermidine. Les concentrations en spermine chez *Rhizobium meliloti*, bien que très faibles, sont cependant de 3 à 30 fois supérieures à celles observées chez les autres *Rhizobiaceae* (HAMANA *et al.*, 1990).

Récemment, chez *Rhizobium fredii* la tolérance aux chocs osmotiques a été corrélée à la teneur intracellulaire en homospermidine (FUJIHARA et YONEYAMA, 1993).

La concentration en tréhalose, éventuel protecteur à l'encontre de la dessiccation (cf paragraphe VII-2) augmente avec l'âge physiologique, et

atteint son maximum en phase stationnaire de croissance chez les *Rhizobiaceae* (STREETER, 1985). D'autre part, chez *Saccharomyces*, les cellules prises en phase stationnaire tolèrent mieux la lyophilisation que les cellules prélevées en phase exponentielle de croissance. Hors, la concentration en tréhalose atteint un maximum de l'ordre de 86mg/g de poids sec cellulaire en phase stationnaire, contre 7mg/g en phase exponentielle. Ce tréhalose semblerait agir au niveau de la membrane, en abaissant sa température de transition. Une réhydratation au voisinage de cette température permettrait de réduire la perméabilité et les fuites membranaires (LESLIE *et al.*, 1994).

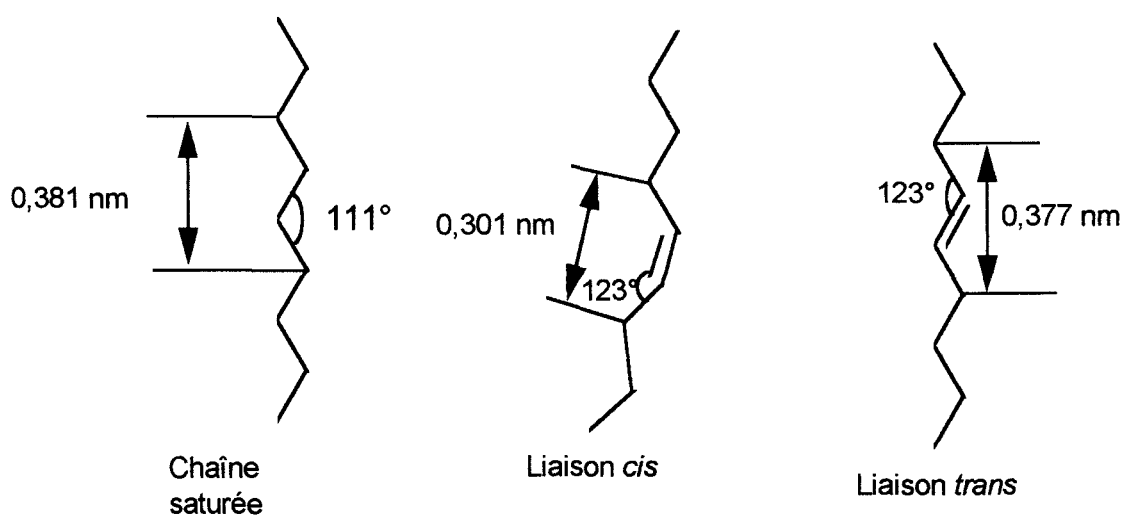
#### **b- Facteur nutritionnel**

Les bactéries confrontées à un environnement restreint en source de carbone et/ou d'azote vont réduire leur activité métabolique. Chez *Vibrio*, aucun polysome n'est observé et seulement 0,7% de protéines sont encore synthétisées après trois jours de privation nutritionnelle (LINDER et OLIVER, 1989; FLÄRDH *et al.*, 1992).

Sous ces conditions, les échanges avec le milieu extérieur sont réduits, et les bactéries vont avoir tendance à modifier leur structure membranaire, en agissant directement sur les acides gras et les phospholipides (OLIVER et STRINGER, 1984; LINDER et OLIVER, 1989). Ceci constitue une étape primordiale d'adaptation, permettant de réduire toute activité métabolique consommatrice d'énergie. STEWART et OLSON (1992) ont montré que chez *Klebsiella*, le degré de saturation est cinq fois supérieur quand cette bactérie est confrontée à des conditions oligotrophiques. Ce phénomène s'accompagne d'un développement de la résistance à la chloramine liée à une faible perméabilité membranaire.

Des remaniements post synthétiques au niveau des A.G.(s) sont observés chez certaines bactéries maintenues dans des conditions oligotrophiques. Les A.G.(s) *cis* sont alors transformés en A.G.(s) *trans* ( baisse de la

fluidité) ou en leurs isomères cycliques. Certains auteurs, considèrent les A.G.(s) *trans* comme des marqueurs de stress nutritionnels (GUCKERT *et al.*, 1986; MORITA *et al.*, 1993). En effet, l'absence de croissance du micro-organisme ou l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des A.G.(s) n'empêche pas la conversion des A.G.(s) *cis* en leurs isomères *trans* (HEIPIEPER et BONT, 1994). Les A.G.(s) insaturés à configuration *trans* ne sont pas considérés comme physiologiquement naturels. Leurs structures et leurs tailles les rapprochent beaucoup plus des A.G.(s) saturés que des A.G.(s) insaturées (figure 6).



**Figure 6:** Géométrie des doubles liaisons dans les acides gras

*Pseudomonas* reste l'un des rares genres bactériens à synthétiser des A.G.(s) *trans* en grande quantité, en présence d'acétate (GUCKERT *et al.*, 1987). WEBER *et al.* (1994) confirment ces observations en utilisant deux sources de carbone, le glucose et l'acétate. Ils constatent en effet que la proportion des A.G. *trans* est supérieure quand la source de carbone est l'acétate.

Les A.G.(s) *trans* sont localisés dans la membrane cytoplasmique, et leur conversion à partir des A.G.(s) *cis* nécessite la présence d'une enzyme localisée dans cette membrane (DIEFENBACH et KEWELOH, 1994).

### **c- Température**

Une augmentation ou une baisse de température par rapport à la température optimale de croissance des micro-organismes implique un changement au niveau de leurs A.G.(s) membranaires.

Aux basses températures, les A.G.(s) évoluent vers des composés plus insaturés (ADAMS et RUSSEL, 1992; LINDBERG et MOLIN, 1993; SUUTARI et LAAKSO, 1993; GRAU *et al.*, 1994; HAMAMOTO *et al.*, 1994, HEIPIEPER, 1996) et la longueur de chaîne moyenne diminue (ADAMS et RUSSEL, 1992; PÜTTMANN *et al.*, 1993; SUUTARI et LAAKSO, 1993). De même, une cyanobactérie (*Anacystis nidulans*) capable d'ajouter une seconde double liaison au niveau de l'acide palmitique et oléique, tolère mieux les basses températures. Par ailleurs, chez les cyanobactéries (*A. nidulans* et *Synechocystis*) les A.G.(s) polyinsaturés sont nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne photosynthétique à basse température (GOMBOS *et al.*, 1992; WADA *et al.*, 1994).

A l'inverse une augmentation de la température tend à augmenter le degré de saturation (A.G. sat/ A.G. insat) (HAMAMOTO *et al.*, 1994, JAHNKE, 1992, BODNARUK et GOLDEN, 1996).

La proportion des A.G. fluidifiants (qui augmentent le désordre) par rapport aux A.G. non fluidifiant ( qui diminuent ce désordre membranaire) au niveau de la membrane joue un rôle majeur dans le fonctionnement membranaire. L'incorporation des A.G.(s) insaturés au niveau des phospholipides diminue la température de transition nécessaire au passage de l'état ordonné à l'état désordonné, alors que l'incorporation des A.G.(s) saturés provoque l'effet inverse.



Les variations de température peuvent également affecter la nature des phospholipides. Par exemple, chez certaines espèces de *Vibrio*, une croissance à 5°C s'accompagne d'une augmentation notable de la proportion en phosphatidyléthanolamine (HENDERSON *et al.*, 1993).

Le méthyle stérol est rarement rencontré chez les procaryotes cependant il semble jouer un rôle important dans la régulation de la fluidité membranaire, tout au moins chez certains micro-organismes. Ainsi chez *Methylococcus capsulatus*, une diminution de la température de croissance (de 50°C à 30°C) s'accompagne d'une augmentation du degré d'insaturation et de la proportion en méthyle stérol (JAHNKE, 1992). En fonction de la température de transition de phase des A.G.(s) présents dans les phospholipides, le méthyle stérol pourrait se comporter comme un rigidifiant ou un fluidifiant des lipides membranaire (probablement en s'intercalant entre les têtes polaires des phospholipides).

De même, chez *Bradyrhizobium* la présence de structures de type hopanoïdes (KANNENBERG *et al.*, 1995) pourrait intervenir dans la régulation de la fluidité membranaire.

L'influence de la cinétique de variation de température sur la survie et la perméabilité membranaire de *Saccharomyces cerevisiae* a été étudiée récemment (GERVAIS et MARTINEZ de MARANON, 1995). Chez ce micro-organisme une augmentation rapide de la température de 25°C à 50°C se traduit par un faible taux de survie (1% de la population initiale) et une forte réduction des volumes cellulaires (22% du volume cellulaire initiale). A l'inverse, une augmentation graduelle de la température conduit à des taux de survie de 34% et des réductions des volumes cellulaires de 9% seulement. Les effets néfastes d'une augmentation rapide de température serait le reflet d'une augmentation de la perméabilité membranaire voire même d'une rupture de la membrane cytoplasmique. Lors d'une augmentation progressive de la température,

les cellules de *S. cerevisiae* auraient plus le temps de synthétiser et transformer leurs A.G.(s) et d'adapter de ce fait leur fluidité membranaire (GERVAIS et MARTINEZ de MARANON, 1995).

#### **d- Diminution de l' $a_w$ des milieux de culture et dessiccation**

Chez les champignons et les levures la baisse de l' $a_w$  a été corrélée avec un changement au niveau membranaire. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Eurotium chevalieri*, *Dipodascopsis* sp. et *Dipodascus* sp., le degré d'insaturation (rapport entre les A.G.(s) insaturés et les A.G.(s) saturés) décroît avec une baisse de l' $a_w$  (HILGE-ROTMANN et REHM, 1991; LESAGE *et al.*, 1993; SAJBIDOR *et al.*, 1994). Chez un mutant de *Zygosaccharomyces rouxii*, sensible au choc hyperosmotique, la perméabilité anormale (due à une faible extrusion des ion  $Na^+$ ) est en rapport avec la composition en A.G.(s) (YOSHIKAWA *et al.*, 1995). De même, une augmentation de la concentration en NaCl des milieux de culture aboutit à une diminution du degré d'insaturation des A.G.(s) de *Shewanella putrefaciens* (NICHOLS *et al.*, 1994). Chez *Pseudomonas putida* une diminution de l' $a_w$  du milieu de culture se traduit par une augmentation du rapport *trans/cis* des A.G.(s) insaturés, par contre le degré d'insaturation reste inchangé (HEIPIEPER *et al.*, 1996).

Si le critère de la fluidité membranaire est facilement perçu pour les cellules bactériennes ne possédant que des A.G.(s) linéaires, il ne l'est pas moins pour celles qui sont riches en A.G. (s) branchés (iso ou antéiso). Néanmoins, il semble que chez *Streptomyces cinnamonensis*, la proportion de ces A.G. branchés diminue en faveur des A.G.(s) linéaires à nombre de carbones paires après un stress hyperosmotique (POSPISIL et REZANKA, 1994).

ZIKMANIS *et al.* (1982) ont constaté que le taux de survie après dessiccation chez *Saccharomyces cerevisiae* est inversement corrélé avec le degré d'insaturation. Par contre, la tolérance à la congélation de

*Torulaspota delbrueckii* (anciennement *Saccharomyces rosei*) ne semble pas en rapport avec le degré d'insaturation des A.G.(s) mais plutôt avec la teneur en phospholipides et le ratio stérol/phospholipides (MURAKAMI *et al.*, 1995). Cependant, la dessiccation et la congélation sont deux stress radicalement différents (CROWE *et al.*, 1990): ces travaux ne sont donc pas nécessairement contradictoires.

Une oxydation des A.G.(s) insaturés membranaires (diminution du degré d'insaturation) lors de la conservation en l'état déshydraté a été observé chez *Pseudomonas aureofaciens* et *Lactobacillus bulgaricus* (KIEFT *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 1996).

Des cycles de déshydratation réhydratation induisent un changement de composition des acides gras de *Nostoc commune* (POTTS *et al.*, 1987).

## Matériels & Méthodes

## I- MATERIEL BACTERIEN ET TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

### 1- Origine des souches

Nous avons utilisé les souches suivantes:

Souche	Origine
-Bradyrhizobium japonicum*	
USDA 31, USDA 120, USDA 135, USDA 117	Collection de l'U.S. Department of Agriculture (Madison)
G49	Société Liphatech (Lyon, France)
3-1, 3-2, 3-32, J315	Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique)
<b><i>Rhizobium meliloti</i></b>	
RCR 2011	Laboratoire de Microbiologie (Université des Sciences et Technologies de Lille)

\*Ce groupe a été scindé en deux espèces distinctes (*japonicum* et *elkanii*), sur la base de leur appartenance à des groupes différents d'ADN définis par HOLLIS *et al.* (1981), leurs résistances aux antibiotiques et la composition de leurs A.G.(s) membranaires (KUYKENDALL *et al.*, 1988)

Ces souches sont conservées à -20°C en milieu Y.E.M. additionné de 20% de glycérol.

### 2- Milieux

#### a- Milieu Yeast Extract Mannitol (Y.E.M.)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Extrait de levure.....	1 g
Mannitol.....	10 g
Eau distillée q.s.p.....	1 litre

Le pH est ajusté à 7 et 15g/l d'agar sont additionnés pour obtenir le milieu solide. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

#### **b- Tampon de Non.Prolifération (T.N.P.)**

Sa composition est la suivante:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Eau distillée q.s.p.....	1 litre
autoclavage	105°C, 30 min.

Le pH est ajusté à 7.

Ce milieu sert à réaliser les dilutions bactériennes.

### **3- Cultures et dénombrements bactériens**

#### **a- Précultures**

Elles sont effectuées en tubes contenant 10 ml de milieu Y.E.M. liquide. Chaque tube est inoculé soit par 0,1 ml d'une suspension bactérienne concentrée (conservée à 4°C ou à -20°C dans le glycérol), soit à partir d'une colonie bactérienne issue d'un isolement. L'incubation se fait sur une table d'agitation horizontale à 120 saccades/min, à 30°C pendant 3 à 4 jours pour les souches à croissance lente et 24 h pour les souches à croissance rapide.

#### **b- Cultures**

Les quantités préparées varient en fonction des besoins. En général, elles sont réalisées en Erlenmeyer de 500 ml (fermé par une bourre de coton cardé entouré d'une gaze) contenant 200 ml de Y.E.M.. Le milieu est inoculé par 2 ml d'une préculture titrant 10<sup>9</sup> bactéries/ml. L'incubation à 30°C est réalisée à l'obscurité sur une table d'agitation rotative à 85 rotations/min (BIOLAFITTE MVS.3 excentrique 25 mm).

### **c- Dénombrements**

Une estimation de croissance est réalisée par mesure de la turbidité au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Le nombre de bactéries est exprimé en unité formant une colonie (u.f.c). Ceci est déterminé en réalisant des dilutions décimales à partir de la suspension bactérienne à dénombrer. Des volumes de 1 ml des dilutions les plus élevées sont déposés sur le fond d'une boîte de Pétri, puis environ 20 ml de milieu Y.E.M. gélosé en surfusion sont coulés et homogénéisés avec la suspension bactérienne. Le comptage des colonies se fait après 4 jours d'incubation à 30°C pour les souches à croissance rapide (*Rhizobium meliloti*) et 7 jours pour celle à croissance lente (*Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*).

## **II- METHODES DE DETERMINATION DES GROUPES D'HOMOLOGIE D'ADN DES SOUCHES DE *Bradyrhizobium japonicum***

La détermination des groupes d'homologie d'ADN est basée sur la résistance des souches de *B. japonicum* à différents antibiotiques (KUYKENDALL et al., 1988).

Les bactéries sont cultivées en milieu AE1 gélosé liquide jusqu'en phase stationnaire de croissance. Dix microlitres d'une suspension contenant 10<sup>9</sup> bactéries/ml sont étalés sur milieu A1E-HM (COLE et ELKAN, 1973; KUYKENDALL, 1979) additionné d'un antibiotique à concentration définie. Le milieu A1E-HM est composé de:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,125 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,25 g
NH <sub>4</sub> Cl.....	0,32 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0,18 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,004 g
H.E.P.S.....	1,3 g
M.E.S.....	1,1 g
Extrait de levure.....	1 g
Eau.....	q.s.p. 1 litre

pH est ajusté à 6,6 par NaOH (5N)

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 min. Quinze grammes d'agar /litre sont ajoutés pour obtenir un milieu gélosé. L'arabinose (à une concentration finale de 0,1%) et les antibiotiques (stérilisés par filtration) sont ajoutés à ce milieu gélosé juste avant de couler les boîtes.

Sept antibiotiques sont testés par KUYKENDALL et al. (1988) pour déterminer l'appartenance des souches de bradyrhizobia aux groupes d'homologie d'ADN I, Ia ou II. Parmi ces antibiotiques l'utilisation seulement de deux s'avère suffisante pour la détermination de ces groupes. Dans notre étude nous avons élargi notre choix à quatre antibiotiques.

La streptomycine (10 mg/ml) est préparé dans l'eau distillée. La tétracycline (10 mg/ml), l'érythromycine (25 mg/ml) et le chloramphénicol (50 mg/ml) sont préparés dans 50% d'éthanol. Un volume de 1 ml d'antibiotique est additionné à 100 ml de milieu A1E-HM.

Les souches appartenant au groupe d'homologie d'ADN I ou Ia (caractéristique de l'espèce japonicum) sont sensibles à ces concentrations d'antibiotiques, tandis que celles du groupe II ( caractéristique de l'espèce elkani) sont résistantes. Lorsqu'un tapis bactérien est visible après une semaine de croissance à 30°C, la souche est considérée comme résistante (résistance intrinsèque); Alors que lorsque aucune ou quelques colonies (résistance par mutation spontanée) apparaissent, la souche est dite sensible à l'antibiotique utilisé.

### **III- TEST DE NODULATION**

Les tests de nodulation sont réalisés sur la luzerne pour *Rhizobium meliloti* et sur soja pour les bradyrhizobia.

#### **1- Milieu de NICOL ET THORNTON**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g



FePO <sub>4</sub> .....	1 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	2 g
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O.....	0,01 g
Eau distillée q.s.p.....	1 litre

pH est ajusté à 7.

Stérilisation 105°C, 30 min.

Le nitrate de sodium (0,5g/litre) est ajouté dans une partie des témoins sans suspension bactérienne afin d'apprécier le développement de la plantule.

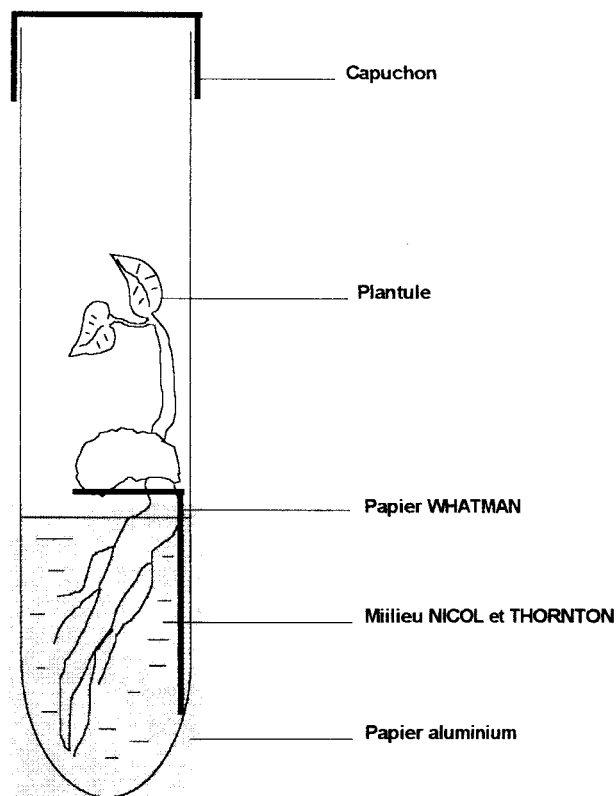
## **2- Culture aseptique de la luzerne et du soja**

### **a- Stérilisation et germination des graines**

Les graines sont stérilisées superficiellement par trempage pendant 5 min dans une solution de chlorure mercurique à 0,1% à laquelle on ajoute quelques gouttes de Teepol (agent dispersant). Les graines sont ensuite rincées cinq fois avec de l'eau distillée stérile avant d'être déposées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Y.E.M. gélosé. La germination se fait à 30 °C pendant 2 à 4 jours dans une étuve à l'abri de la lumière.

### **b- Culture en tube**

La culture est réalisée en tube de culture (220 x 22 mm) contenant 20 ml du milieu nutritif NICOL et THORNTON. Les plantules sont introduites dans les tubes à raison d'une plantule par tube. La partie cotylédonaire est déposée sur une languette de papier WHATMAN de sorte que la racine trempe dans la solution nutritive. La partie inférieure du tube est entourée par du papier aluminium afin de protéger la racine de la lumière (figure 6).



**Figure 6:** Schéma du procédé de culture des plantules

#### **IV- METHODES D'ETUDE DE LA DESSICCATION ET DE LA CROISSANCE SOUS $A_w(s)$ REDUITES**

##### **1- Solutions permettant l'obtention d'Humidités Relatives (H.R.(s)) fixes et constantes à une température donnée.**

Des solutions aqueuses saturées en sels permettent l'obtention des H.R.(s), ces solutions ont un excellent pouvoir tampon.

BIZOT *et al.* (1978) ont dressé un tableau comportant les sels les plus couramment utilisés permettant de réguler l'activité de l'eau (tableau 9). On peut constater que l' $a_w$  ( $a_w = H.R./100$ ) varie en fonction de la nature du sel et de la température.

Dans ces études nous avons choisi 4 sels qui permettent d'avoir une gamme d'H.R.(s) assez large (tableau 10) ainsi que du silicagel.

**Tableau 9:** Activité de l'eau des solutions saturées pour trois températures. Collationne d'après les données les plus sûres de la littérature (selon BIZOT et al., 1978).

Solution de	20°C	25°C	30°C
NaOH	0,0698	0,0695	0,0687
LiCl	0,1140	0,1115-0,1200	0,1116
KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (1,5 H <sub>2</sub> O)	0,2310	0,2260	0,2200
MgCl <sub>2</sub>	0,3030	0,3273-0,3320	0,3238
NaI	0,3918	0,3775	0,3625
CrO <sub>3</sub>	0,3860	0,3960	0,3990
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,4400	0,4380-0,4276	0,4360
Mg(NO <sub>3</sub> )	0,5447	0,5286	0,5133
Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,4580	0,5350	0,5200
NaBr	0,5870	0,5770	0,5630
CuCl <sub>2</sub>	0,6840	0,6860	0,6850
KI	0,6986	0,6876	0,6785
SrCl <sub>2</sub>	0,7253	0,7083	0,6911
NaNO <sub>3</sub>	0,7513	0,7379	0,7275
NaCl	0,7542	0,7532	0,7521
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8030	0,7997	0,7960
KBr	0,8177	0,8071	
KCl	0,8513	0,8432	0,8353
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8690	0,8595	0,8640
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	0,8660	0,8640	0,8630
BaCl <sub>2</sub>	0,9069	0,9026	
KNO <sub>3</sub>	0,9320	0,9200	0,9070
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9220	0,9270	0,9110
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,9720	0,9690	0,9660
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,9793	0,9800	0,9706

La saturation est obtenue dans des enceintes de 125 ml contenant 20 ml d'eau distillée auxquelles on ajoute des quantités de sels déterminées (tableau 10)

L'H.R. 3% est obtenue par des enceintes contenant du silicagel (JANSSEN CHIMICA, de granulométrie 2 à 5 mm et 2 nm de porosité) ayant séjourné pendant 24h dans une étuve à 120°C ( le silicagel régénéré a une couleur bleue).

Les enceintes contenant les solutions saturées sont stérilisées à 120°C pendant 20 minutes

Les souches utilisées lors de ses études sont les suivantes:

## **2- Protocole expérimental de la dessiccation**

Une aliquote est dénombrée à l'aide d'une cellule de THOMA afin d'apprécier le nombre initial de bactéries. La suspension est centrifugée (6500 tours/minute soit 7480g) pendant 20 minutes, le culot est repris dans du T.N.P., et une seconde centrifugation est réalisée.

**Tableau 10:** Sels retenus pour obtenir les H.R.(s) voulues à 30°C. Quantités nécessaires à l'obtention des solutions saturées en g/100 ml d'eau distillée à 50°C.

Sels	Concentration (g/100 ml)	H. R. à 30°C
KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (1,5 H <sub>2</sub> O)	337,3	22,00
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ,2H <sub>2</sub> O	121,2	43,60
KI	168	67,85
KCl	42,6	83,53

Le silicagel permet d'obtenir une H.R. de 3%.

La concentration bactérienne est ajustée à environ  $2 \cdot 10^9$  bactéries/ml par ajout d'un volume déterminé de T.N.P..

Des volumes d'un millilitre sont déposés sur des membranes filtrantes MILLIPORE (type GS de diamètre 25 mm et de porosité 0,22  $\mu$ m) ces dépôts doivent être pratiqués de sorte à former un film bactérien uniforme

(figure 7). Ces filtres sont ensuite déposés sur des disques de carton stériles (Dry Absorbent Pads) afin d'enlever l'eau qui imprègne la face inférieure.

Pour éviter tout contact entre les bactéries et la solution saturée, les membranes de filtration sont placées dans des tubes de 15 mm de diamètre et 100 mm de longueur.

Les enceintes sont bouchées hermétiquement par un opercule en caoutchouc et une capsule évidée à vis. La conservation se fait à 30°C à l'obscurité et pression atmosphérique pendant quelques jours voire quelques mois, selon l'étude envisagée.

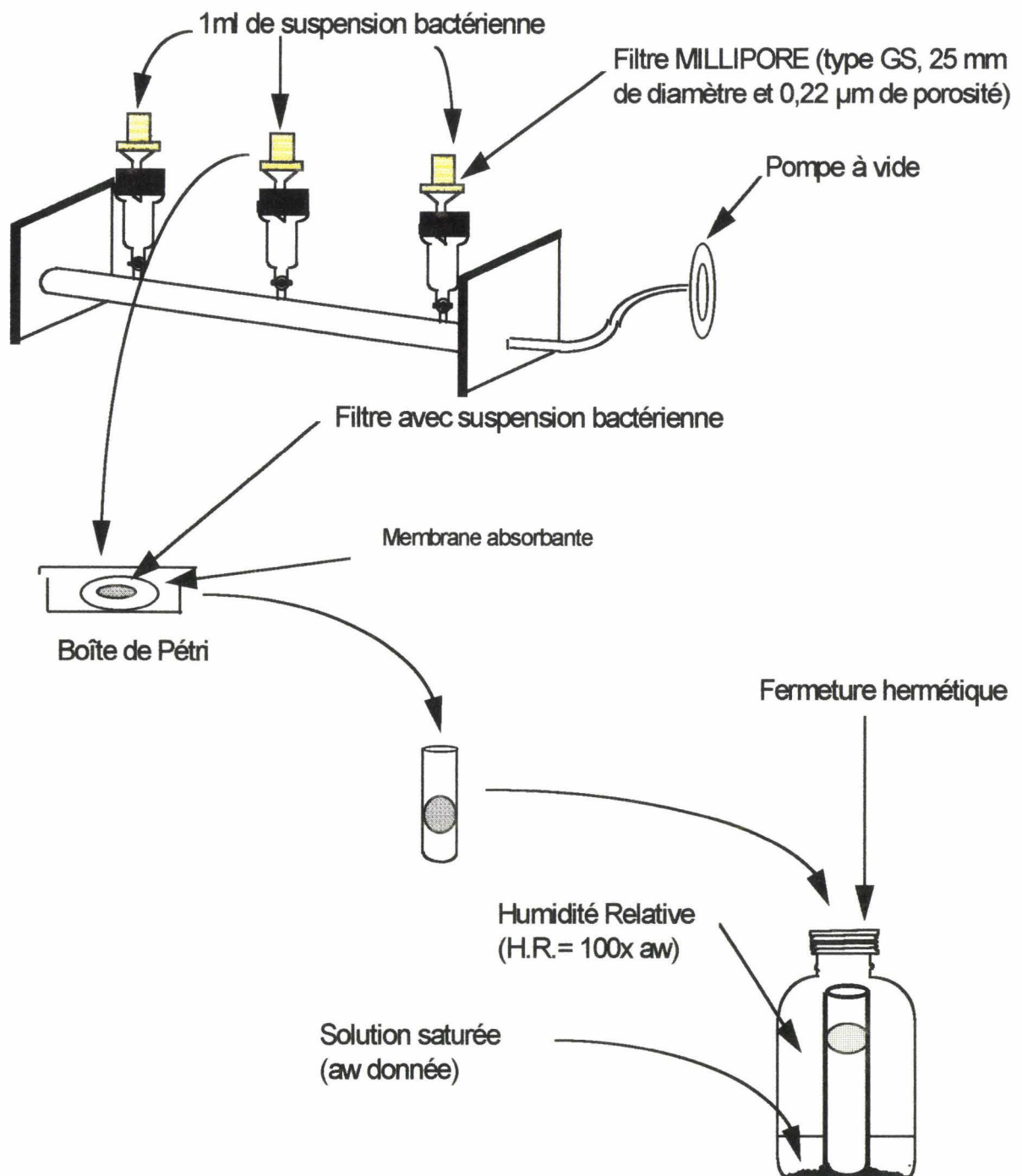
Pendant les premiers temps de conservation, on assiste à une baisse progressive en eau. Cette perte en eau se stabilise quand l'équilibre avec l'H.R. environnante est atteint. Ces durées varient avec la nature de l'H.R. ambiante (MARY *et al.*, 1985): Ces temps d'équilibre sont reportés dans le tableau 11

**Tableau 11:** Temps nécessaires à l'obtention des équilibres de déshydratation dans les enceintes aux différentes H.R.(s) étudiées

Humidité Relative de l'enceinte en %	Temps d'équilibre en heures
3,00	8
22,00	9
43,60	14
67,85	22
83,53	50

Après des durées de conservations déterminées, les filtres sont réhydratés par 2 ml de T.N.P. Une aliquote de 0,5 ml est prélevée pour le dénombrement. Sur la partie restante, est effectuée l'extraction des A.G. membranaires.

**Figure 7:** Protocole expérimental de dessiccation



#### 4- Réalisation des milieux pour l'étude de la croissance sous $a_w(s)$ réduites

La croissance est réalisée dans du milieu Y.E.M. additionné de glycérol ou de NaCl à des concentrations variables permettant d'obtenir des valeurs d' $a_w$  déterminées (tableau 13).

**Tableau 13:** Concentrations en glycérol et NaCl, exprimées en %, pour obtenir des baisses d' $a_w(s)$  données

Baisse d' $a_w$ Soluté (%)	0,003	0,0062	0,009	0,0124	0,015	0,0186	0,03
Glycérol	1		3		5		10
NaCl		1		2		3	5

L' $a_w$  du milieu Y.E.M. est égale à 0,999.

Ces milieux sont répartis dans des tubes de 16 x 160 à raison de 4,5 ml par tube. Une culture bactérienne issue de la phase stationnaire est lavée et reprise dans du T.N.P. avant d'être diluée au dixième. Des volumes de 0,5 ml de cette dilution sont répartis dans les tubes précédents, ce qui correspond à une concentration initiale d'environ  $10^7$  bactéries/ml. Ces tubes sont ensuite placés dans les puits du biophotomètre. Cet appareil permet de suivre la croissance bactérienne à une température, une longueur d'onde, et une vitesse d'agitation fixe. Il est aussi doté d'un module de communication qui permet d'exploiter les résultats par ordinateur. Lors de ses études la longueur d'onde est fixée 600 nm, la température à 30°C et la vitesse d'agitation à 500 rotation/min. Une mesure d'absorbance est réalisée toutes les 90 min.

## V- METHODE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ACIDES GRAS

La préparation des échantillons pour l'analyse des acides gras membranaires consiste à libérer les acides gras totaux sous forme de méthyl-esters d'A.G.(s) afin de les rendre volatils (MILLER et BERGER, 1985).

### 1- Préparation des réactifs

- Réactif de saponification = réactif 1

NaOH (PROLABO, R.P.Normapur).....45 g

Méthanol (MERCK, gradient grade).....150 ml

Eau U.H.Q.....150 ml

- Réactif de méthylation = réactif 2

HCl (PROLABO, R.P. Normapur) "6N".....325 ml

Méthanol.....275 ml

- Solvant d'extraction: Hexane/ Méthyle-tert Butyle Ether (M.T.B.E.) = réactif 3

Hexane (PROLABO, Chromanorm).....200 ml

M.T.B.E. (MERCK, Lichrosolv).....200 ml

- Solution de lavage = réactif 4

NaOH.....10,8 g

Eau U.H.Q.....900 ml

### 2- Procédures d'extraction (Fig. 8)

- La première étape (saponification) consiste en une hydrolyse alcaline permettant de libérer les acides gras des structures membranaires:

1 ml de suspension bactérienne est centrifugé à 7480g pendant 20 min., le culot est récupéré par 1 ml de réactif 1 dans un tube en Pyrex (16 mm de diamètre et 100 mm de longueur).



Ce tube est mis dans un bain-marie à 100°C pendant 5 min., il est ensuite homogénéisé au vortex pendant 5 secondes puis remis dans le bain-marie durant 25 min..

Avant de procéder à l'étape suivante on laisse refroidir à température ambiante.

- La méthylation qui est la deuxième étape du procédé permet de transformer les sels d'acides gras sous la forme estérifiée (volatile):

On ajoute au tube préalablement refroidi 2 ml du réactif 2, une brève agitation de 5 secondes suivie de 10 min. de passage dans un bain Marie à 80°C avant de les plonger dans de la glace.

- L'étape suivante qui est l'extraction va permettre de séparer les acides gras de la phase aqueuse en les récupérant par une phase hydrophobe:

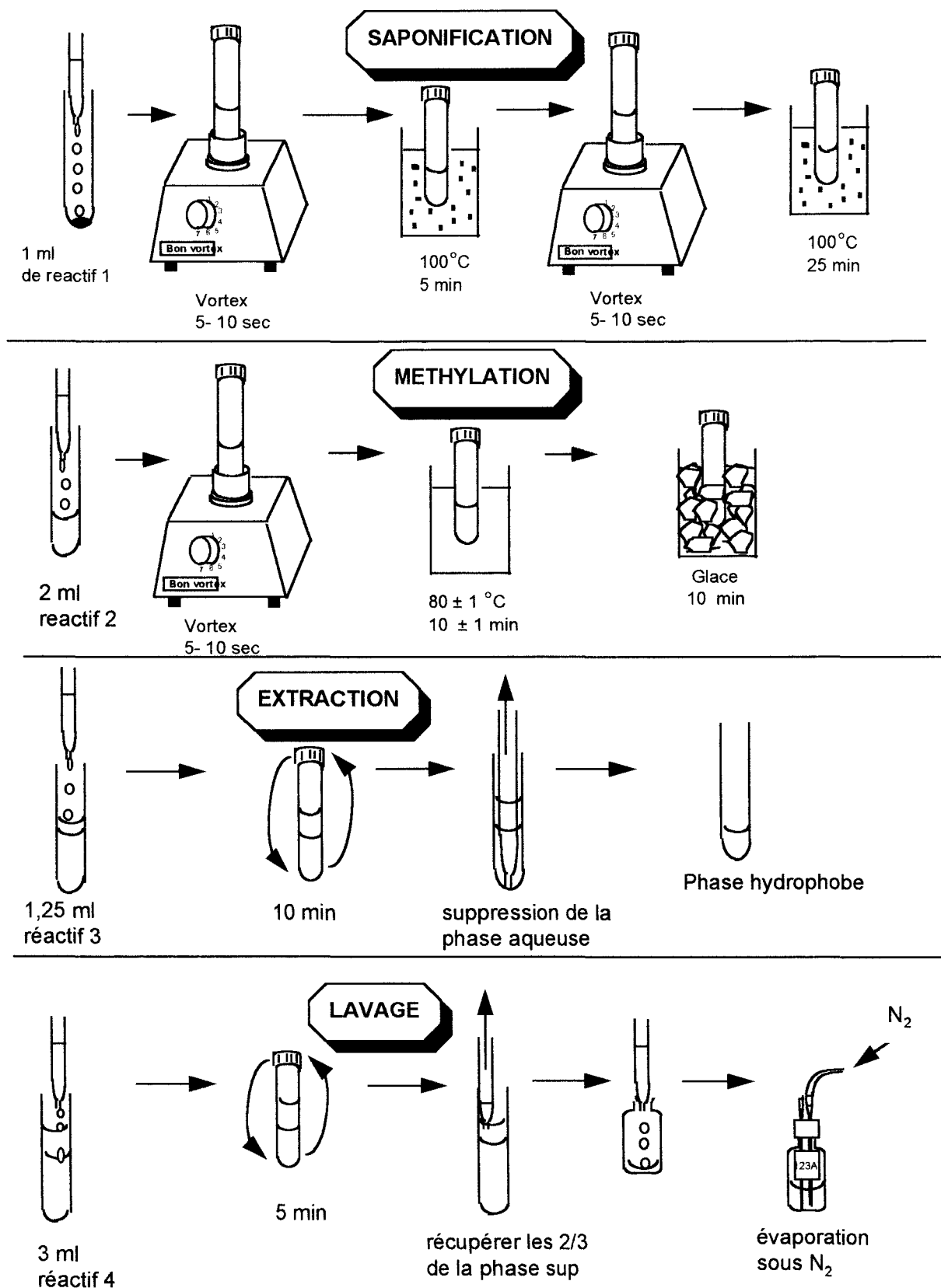
On ajoute 1,25 ml de réactif 3 au mélange précédent et on place le tube dans un appareil permettant de mélanger les deux phases par un système rotatif a température ambiante pendant 10 min..

- Lavage (permet de débarrasser la partie hydrophobe des résidus organiques et des A.G.(s) libres):

Avec une pipette Pasteur on enlève la phase aqueuse, et 3 ml de réactif 4 sont ajoutés. On mélange les deux phases pendant 5 min. (voir précédemment). Les deux tiers de la phase lipidique sont récupérés dans des tubes à Silyler de 2 ml avec bouchon en Bakélite et pastille en Téflon.

La quantité bactérienne sur laquelle a été faite l'extraction est relativement faible. De ce fait, l'extrait est concentré systématiquement afin de mettre en évidence les A.G.(s) présents en petites quantités. Tout d'abord on effectue une évaporation totale du solvant sous flux d'azote, et juste avant l'injection dans la C.P.G. on ajoute des quantités d'hexane déterminées afin d'obtenir une concentration en A.G.(s) suffisante pour l'analyse.

**Figure 8:** Protocole d'extraction des acides gras



Les extraits ainsi préparés peuvent être conservés pendant plusieurs jours à -20°C. La qualité des A.G. reste inchangée durant la conservation.

### **3- Analyse chromatographique des A.G.(s)**

#### **a- Caractéristiques de l'appareil utilisé**

L'analyse des esters méthyliques d'acides gras est effectuée en chromatographie phase gazeuse. L'appareil utilisé est un SHIMADZU modèle GC-17A, équipé d'un module de communication CBM-101 permettant la traduction de l'information vers un logiciel d'exploitation CLASS-CR10 IBM PC compatible.

Cet appareil est muni:

- d'une colonne capillaire (QUADREX, OV-225, 30 m x 0,32 mm x 1µm), la phase stationnaire est composée de 25% cyanopropyle et 25% de phényle méthyle silicone qui la rend polaire,
- d'un détecteur à ionisation de flamme (F.I.D.).

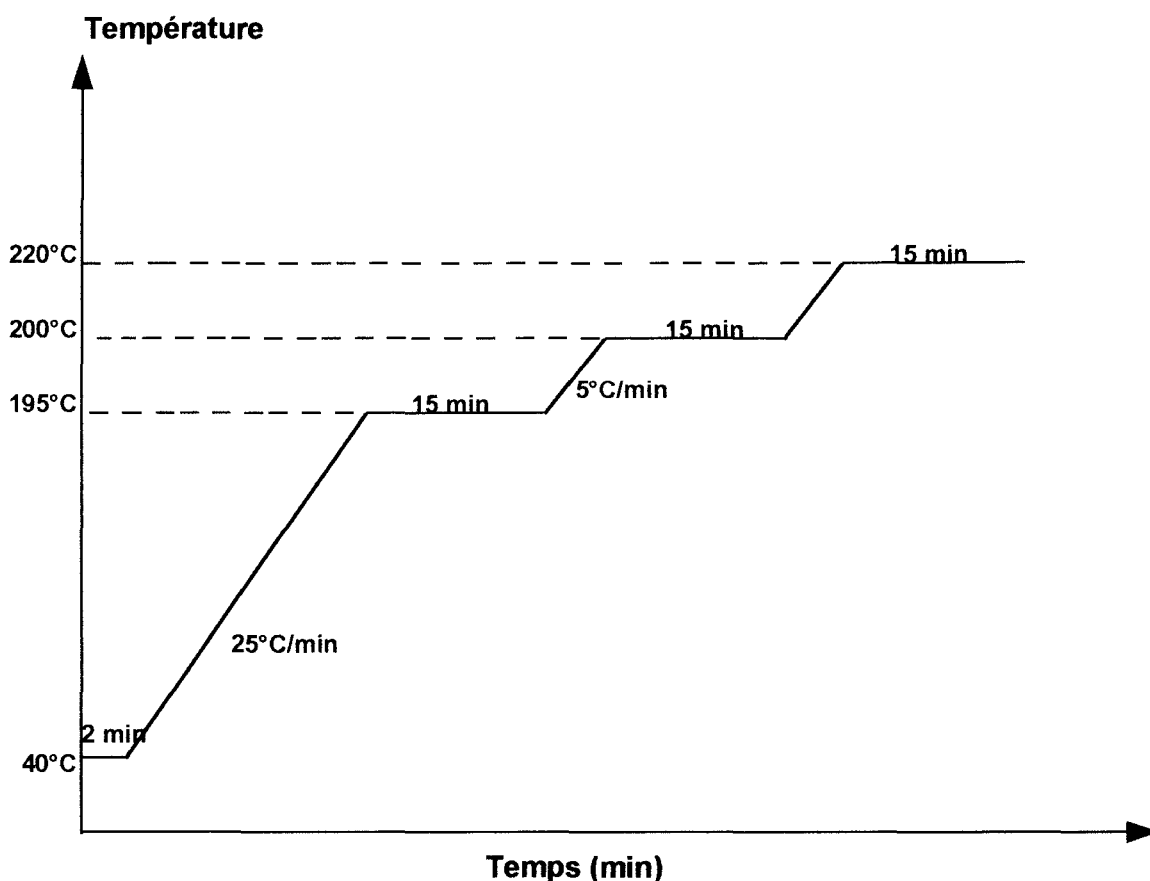
#### **b- Conditions opérationnelles**

Le gaz vecteur utilisé est de l'hydrogène ultrapur (N55, AIR LIQUIDE, FRANCE).

Les volumes injectés sont de 1µl. Pour injecter le maximum d'extrait dans la colonne on utilise de la technique de « splitless » (qui consiste à garder la « fuite fermé » pendant un temps fixé). Le temps de fermeture de la fuite est de 2 min et le rapport de split à l'ouverture de 1/20.

La pression d'hydrogène est de 60 kPa, la pression de l'air au niveau du détecteur est de 40 kPa. La température au niveau de l'injecteur est portée à 220°C, celle du détecteur est de 240°C.

Le programme de température du four est le suivant:



Des témoins sont préparés, en suivant les mêmes procédures d'extraction mais sans contenir au départ de culot bactérien. Ces témoins sont injectés toutes les dix d'analyses juste avant le passage du standard, afin d'avoir une idée sur la pureté des réactifs et s'assurer de la propreté de la colonne.

Les profils d'A.G. sont exploités à l'aide de mélange de standards qui a permis de déterminer préalablement le temps de rétention et l'ordre de sortie des différents esters méthyliques d'A.G..

La concentration est calculée en fonction de la surface des pics, les résultats sont donnés sous forme de pourcentage.

Remarque:

Des analyses préalables ont été menées sur un Chromatographe H.P. (Hewlett-Packard) modèle 5890 série II (U.S.A.) développé par: Hewlett-

Packard Company et Microbial ID, Inc., Newark, Del. Cet appareil est muni d'un système d'identification microbienne (M.I.S. pour Microbial Identification System), permettant d'identifier les bactéries grâce à leurs profils en acides gras.

Le choix des standard qui ont servis à faire l'étalonnage de notre appareil consiste en deux sortes de mélange d'acides gras sous forme de méthyle ester (mélange référencé 4-7080 et 47885 de SUPELCO).

#### **VI- METHODE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE**

Les échantillons sont préparés suivant la méthode de Mc COWAN *et al.* (1978). Le protocole de préparation est rapporté en tableau 14.

Les observations sont effectuées au microscope électronique JEOL 120 CX (équipé du système ASID-4D) à 40 kV.

NB: le degré d'insaturation = Acides gras insaturés/saturés

**Tableau 14:** Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à balayage selon Mc COWAN *et al.* (1978).

Les membranes de filtration portant les bactéries sont immergées successivement dans les préparations suivantes:	
Traitement	Temps d'incubation
<u>1<sup>er</sup> jour</u>	
- pré-fixation dans 0,5% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2 + 0,05% de rouge de ruthénium	30 min
- 5% de glutaraldéhyde dans le tampon cacodylate + 0,05% de rouge de ruthénium	2 h
- 5 lavages dans le tampon cacodylate	30 min x 5
<u>2<sup>ème</sup> jour</u>	
- post-fixation dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate	2 h
- 5 lavages dans le tampon cacodylate	30 min x 5
- 1% de thiocarbohydrazide	30 min
- 6 lavages par l'eau distillée	15 min x 6
- 1% de tétr oxyde d'osmium	2 h 30
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min x 6
<u>3<sup>ème</sup> jour</u>	
- thiocarbohydrazide 1%	30 min
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min x 6
- 1% tétr oxyde d'osmium	2 h 30
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min x 6
- déshydratations successives par de l'éthanol concentré à 10, 20, 30, 50, 70, 80, 95, 100, 100%	30 min x 9
Les échantillons peuvent alors être conservés dans l'éthanol absolu avant d'être coupés par fragments de 1 cm et collés sur des pontons pour subir une déshydratation au point critique puis une métallisation or/paladium.	

## Résultats & Discussion

## I- IDENTIFICATION DES SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA

### 1- Identification des souches de *Bradyrhizobium* par le profil des résistances aux antibiotiques

Récemment, l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* a été subdivisée en deux espèces, *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* (International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, **43**: 398-399.)

Parmi les différentes méthodes permettant de séparer ces deux espèces (cf. Généralités Chap I), la recherche des résistances aux antibiotiques s'avère être une technique rapide et efficace (KUYKENDALL *et al.*, 1988; KUYKENDALL *et al.*, 1992). D'après ces auteurs, sept antibiotiques peuvent être retenus à cet effet. Cependant, l'étude du profil de résistance à trois de ces antibiotiques semble suffisante pour séparer efficacement ces deux espèces. Nous en avons retenu quatre: la tétracycline, la streptomycine, l'érythromycine et le chloramphénicol (à 100, 100, 250 et 500 µg/ml respectivement).

Les résultats obtenus (Tableau 15) montrent que quatre souches des *Bradyrhizobium* testés, au cours de notre étude (souches USDA 31, 117, 120 et 135), présentent une résistance aux quatre antibiotiques choisis. D'après les travaux de KUYKENDALL *et al.* (1988 et 1992), la résistance à ces antibiotiques est caractéristique de l'espèce *B. elkanii*. Ces auteurs ont par ailleurs déjà classé les souches USDA 31 et 117 dans l'espèce *B. elkanii*. La méthode utilisée est donc tout à fait fiable et reproductible.

Les cinq autres souches (3-1, J315, 3-2, 3-32 et G49) sont sensibles à ces antibiotiques et appartiennent donc à l'espèce *B. japonicum*. La souche G49 montre cependant une résistance intrinsèque à la tétracycline. L'existence de telles souches, présentant une résistance isolée à l'un des antibiotiques testés, a déjà été signalée par KUYKENDALL *et al.* (1988). Les souches 3-1, 3-2 et G49 présentent quelques mutants spontanés résistants à l'érythromycine.



**Tableau 15:** Profil de résistance aux antibiotiques de neuf souches de *Bradyrhizobium* et appartenance aux espèces *japonicum* ou *elkanii* d'après les travaux de KUYKENDALL *et al.* (1988 et 1992).

Souches étudiées	Résistance (r) ou sensibilité (s) aux antibiotiques*				espèce
	ery	tet	str	chl	
USDA 31	r	r	r	r	<i>B. elkanii</i>
USDA 117	r	r	r	r	<i>B. elkanii</i>
USDA 120	r	r	r	r	<i>B. elkanii</i>
USDA 135	r	r	r	r	<i>B. elkanii</i>
3-1	s**	s	s	s	<i>B. japonicum</i>
3-2	s**	s	s	s	<i>B. japonicum</i>
3-32	s	s	s	s	<i>B. japonicum</i>
G49	s**	r	s	s	<i>B. japonicum</i>
J315	s	s	s	s	<i>B. japonicum</i>

\* ery, érythromycine (250 µg/ml); tet, tétracycline (100 µg/ml); str, streptomycine (100 µg/ml) et chl, chloramphénicol (500 µg/ml).

\*\* apparition de quelques mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

La fréquence d'apparition des colonies résistantes (  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  ) est en effet compatible avec une fréquence de mutation spontanée à un antibiotique.

## **2- Identification des souches de *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* par les profils des acides gras cellulaires**

Les souches de *R. meliloti* RCR 2011, *B. japonicum* 3-2 et *B. elkanii* USDA 120 ont été retenues pour la suite de nos travaux.

Les cellules ont été cultivées à 30° C, en milieu Y.E.M. gélosé pendant 4 jours pour *R. meliloti* RCR 2011 et 7 jours pour *B. elkanii* USDA 120 et *B. japonicum* 3-2. L'extraction des A.G.(s) a été réalisée selon la technique de MILLER et BERGER (1985).

Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

L'analyse des résultats montre que les différents A.G.(s) détectés chez nos souches sont identiques à ceux décrits dans la littérature pour ces genres et espèces bactériennes. Par contre, les compositions quantitatives ne sont pas rigoureusement identiques à celles décrites. En effet, dans nos travaux les pourcentages relatifs en C16:0, C18:1w9c, C20:2w6,9c et C19:0 cyclo sont systématiquement supérieurs, alors que les pourcentages de C18:1w7c sont inférieurs à ceux décrits par JARVIS et TIGHE (1994) et GRAHAM *et al.* (1995). Des pourcentages élevés en C16:0 (20 à 17% pour les bradyrhizobia et 17 à 11% pour les rhizobia) ont été rapportés par SO *et al.* (1994). Il est remarquable que SO *et al.* (1994) utilisent le même milieu que celui utilisé au cours de nos travaux (Y.E.M.), alors que JARVIS et TIGHE (1994) et GRAHAM *et al.* (1995) utilisent le milieu T.Y. Un effet milieu de culture est donc probable comme l'a déjà souligné WELSH (1991). Les différences observées au niveau des pourcentages relatifs en C18:1w7c et C19:0 cyclo pourraient s'expliquer par l'âge des cultures. Nous avons, en effet, réalisé nos extractions sur des cultures prises en phase stationnaire tardive (4j dans nos travaux contre 2j pour *R. meliloti* et 7j contre 5j pour les bradyrhizobia).

**Tableau 16:** Composition qualitative et quantitative des acides gras (exprimée en pourcentage des acides gras totaux détectés) de *Rhizobium meliloti* RCR 2011 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 après culture en milieu gélosé (Y.E.M.). Comparaison avec les profils d'acides gras de ces genres et espèces décrits dans la littérature.

Acides gras	<i>R. meliloti</i> RCR 2011 <sup>d</sup>	<i>R. meliloti</i> <sup>a</sup>	<i>B. elkanii</i> USDA 120 <sup>d</sup>	<i>B. elkanii</i> <sup>b</sup>	<i>B. japonicum</i> 3-2 <sup>d</sup>	<i>B. japonicum</i> IB <sup>c</sup>
C14:0,3OH	5,77 ± 0,07	6,45 ± 0,70	ND	ND	ND	ND
C16:0	9,02 ± 0,16	4,94 ± 1,14	15,10 ± 0,25	11,09 ± 2,39	17,63 ± 0,43	11,88 ± 1,63
C16:1w7c	0,44 ± 0,03	0,34 ± 0,21	0,17 ± 0,01	0,41 ± 0,38	0,39 ± 0,02	1,08 ± 0,73
C16:0,3OH	0,74 ± 0,04	0,68 ± 0,12	ND	ND	ND	ND
C17:0	0,34 ± 0,03	0,54 ± 0,24	ND	ND	ND	ND
C17:0 cyclo	1,51 ± 0,04	0,75 ± 0,31	0,59 ± 0,02	0,97 ± 0,42	ND	ND
C18:0	2,04 ± 0,04	2,70 ± 0,72	1,00 ± 0,11	0,44 ± 0,28	2,52 ± 0,10	0,58 ± 0,41
C18:1w9c	1,83 ± 0,24	< 0,2	2,65 ± 0,43	ND	1,27 ± 0,39	ND
C18:1w7c	35,86 ± 1,44	57,01 ± 8,27	49,11 ± 0,36	66,05 ± 5,10	72,68 ± 0,68	83,42 ± 2,76
C19:0 cyclo	39,28 ± 0,98	22,56 ± 8,25	30,05 ± 0,72	20,49 ± 3,86	5,50 ± 0,82	1,44 ± 1,00
C20:2w6,9c	0,81 ± 0,14	< 0,2	1,33 ± 0,30	ND	ND	ND
C20:3w6,9,12c	2,36 ± 0,23	2,94 ± 0,33	ND	ND	ND	ND
Degré insaturation	4,59 ± 0,03 (B*)	5,46	5,27 ± 0,13 (A*)	7,62	3,84 ± 0,13 (C*)	6,89

(a) : Moyenne ± écart-type pour 21 souches de *Rhizobium meliloti* cultivées 48 heures sur milieu gélosé T.Y. (JARVIS et TIGHE, 1994)

(b, c) : Moyenne ± écart-type pour 15 souches de *Bradyrhizobium elkanii* (b) et 38 souches de *Bradyrhizobium japonicum* (c) cultivées 5 jours sur milieu gélosé T.Y. (GRAHAM *et al.*, 1995).

(d) : Moyenne sur 3 répétitions ± écart-type

ND : Non détectable

(\*) : Comparaison des degrés d'insaturation d'après le test de NEWMAN-KEULS (P = 0,05)

L'identification au niveau du genre ne pose guère de problème.

En effet, nous avons observé chez le genre *Rhizobium* une plus grande variété d'A.G(s) que chez le genre *Bradyrhizobium*. Le C14:0 3OH, le C16:0 3OH (caractéristiques des L.P.S), le C17:0 et le C20:3w6,9,12c ne sont pas détectés chez les bradyrhizobia. Nos résultats sont conformes aux travaux de JARVIS et TIGHE, 1994; SO *et al.*, 1994 et GRAHAM *et al.*, 1995. L'absence de détection des A.G(s) hydroxylés chez les bradyrhizobia est probablement due à la méthode d'extraction utilisée. En effet, chez le genre *Bradyrhizobium*, les A.G(s) hydroxylés, présents dans les LPS, sont liés aux sucres par des liaisons amides. (CARRION *et al.*, 1990). Dans ce cas, une méthanolyse acide est préférable.

L'identification au niveau de l'espèce semble moins aisée.

Cependant, l'absence du C15:0 iso 3OH, C17:0 iso 3OH (A.G(s) caractéristiques de *Rhizobium tropici*), du C12:0 3OH, C13:0 iso 3OH (caractéristiques de *Rhizobium loti*), du C15:0 2OH, C15:0 3OH (caractéristiques des trois biovars de *Rhizobium leguminosarum*) permet de distinguer *Rhizobium meliloti* de ces trois espèces. *Rhizobium fredii* présente peu de C19:0 cyclo et par contre beaucoup plus de C18:1w7c que *R. meliloti* (4,68 et 70,6% respectivement contre 22,5 et 57 % voire 39,28 et 35,86% dans notre cas). Enfin, *Rhizobium galegae* présente 4 à 5 fois plus de C16:0 3OH que *R. meliloti* (3,18% vs 0,68%). La souche RCR 2011 est donc bien une souche de *R. meliloti*. Par ailleurs, les tests de nodulation sur luzerne confirment sans ambiguïté l'appartenance à l'espèce *R. meliloti*.

Les souches USDA 120 et 3-2 nodulent le soja, ce qui signe l'appartenance au genre *Bradyrhizobium* (espèce *japonicum* ou *elkanii*). L'identification au niveau de l'espèce au sein du genre *Bradyrhizobium* est aisée. En effet, *Bradyrhizobium japonicum* présente beaucoup moins de C19:0 cyclo que *Bradyrhizobium elkanii*. De plus, le C17:0 cyclo n'est jamais détecté chez *B. japonicum*.

Ces trois souches présentent des degrés d'insaturation (A.G.(s) insaturés/ A.G.(s) saturés) différents selon le test de NEWMAN-KEULS. Ainsi les degrés d'insaturation les plus élevés sont observés chez *B. elkanii* puis chez *R. meliloti*. *Bradyrhizobium japonicum* montre le degré le moins élevé parmi les souches testées.

Il est à noter que ces valeurs sont relatives, en effet les A.G.(s) hydroxylés à liaisons amides ne sont pas détectés. Ces A.G.(s) sont toujours rencontrés chez les bradyrhizobia (CARRION *et al.*, 1990) mais entrent également dans la composition des A.G.(s) du lipide A de *R. meliloti* (URBANIK-SYPNIEWSKA *et al.*, 1989).

## **II- EVOLUTION DES A.G.(S) LORS DE LA CROISSANCE EN MILIEU LIQUIDE DES (BRADY)RHIZOBIA**

La croissance des 3 souches a été réalisée en milieu Y.E.M. liquide à la température de 30°C. Dix millilitres d'une préculture, prise en phase stationnaire de croissance, sont inoculés dans 190 ml de milieu Y.E.M. Dans ces conditions, *B. japonicum* 3-2 produit des polysaccharides capsulaires notamment en phase exponentielle de croissance (DOLHEM-BIREMON *et al.*, 1993 et 1995). Ces polysaccharides capsulaires sont éliminés après deux à trois séries de lavage-agitation-centrifugation. Chez *B. elkanii* USDA120, aucune synthèse polysaccharidique n'a été observée. *Rhizobium meliloti* RCR 2011 produit des polysaccharides extracellulaires facilement éliminés par lavages et centrifugations successives.

Les premières extractions des A.G.(s) ont été réalisées après 2h. de croissance chez *R. meliloti* et 6 à 8 h. chez *B. japonicum* et *B. elkanii*. Ces temps ont été retenus afin de permettre aux bactéries d'initier la synthèse de leurs A.G.(s) et correspondent à peu près aux temps de génération de ces genres bactériens. Les autres extractions ont été effectuées à intervalles réguliers pendant la croissance.

## 1- Croissance et degré d'insaturation

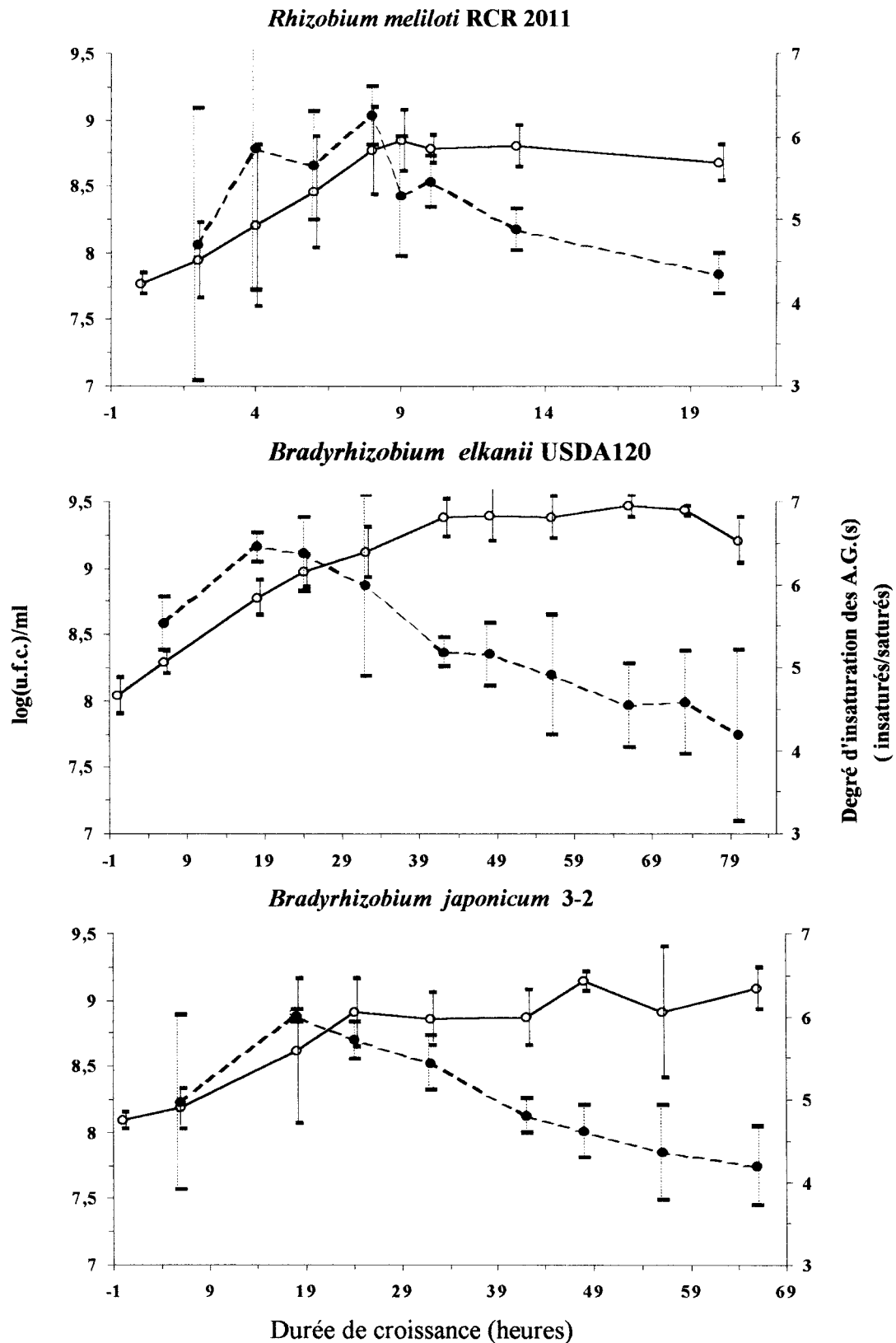
La croissance des 3 souches (exprimée en log du nombre d'unités formant colonies) et l'évolution de leur degré d'insaturation sont représentées en figure 9.

Le degré d'insaturation augmente au cours de la croissance pour atteindre une valeur maximale en phase exponentielle. Ce phénomène est particulièrement marqué chez les bradyrhizobia. La non homogénéité des démarrages des cultures de *R. meliloti* et dans une moindre mesure de *B. japonicum* entraîne des intervalles de confiance relativement élevés pour les valeurs de leur degré d'insaturation. La chute de ce degré coïncide avec l'entrée en phase stationnaire de croissance. Au cours de cette phase, le degré d'insaturation continue à baisser et ce de manière pratiquement linéaire.

Nos résultats sont conformes aux travaux de DIEFENBACH *et al.* (1992) sur l'influence de l'âge physiologique sur le degré d'insaturation des A.G.(s) de *Pseudomonas putida*. De même, MACKENZIE *et al.* (1979) et HUBAC *et al.* (1992) décrivent des évolutions similaires des degrés d'insaturation des A.G.(s) de souches (brady)rhizobia au cours de la croissance. La comparaison avec ces derniers travaux reste cependant malaisée car ces auteurs ne détectent pas les A.G.(s) hydroxylés même chez les rhizobia.

De manière générale, les bactéries à GRAM positifs réagissent de manière similaire (SUUTARI et LAASKO, 1992; DRICI-CACHON *et al.*, 1996). Cependant chez *Leuconostoc oenos*, le degré d'insaturation maximal est obtenu en début de phase exponentielle de croissance (DRICI-CACHON *et al.*, 1996).

L'augmentation du degré d'insaturation au cours de la phase exponentielle de croissance pourrait être la conséquence d'une activité métabolique intense, nécessitant des échanges actifs avec le milieu extérieur, et de ce fait une membrane plus fluide.



**Figure 9** : Evolution du degré d'insaturation (●) au cours de la croissance (○) des (brady)rhizobia. Moyenne sur 3 répétitions  $\pm$  l'intervalle de confiance (P = 0,05).

## **2- Croissance et évolution quantitative des acides gras prépondérants**

Même si le degré d'insaturation est un bon indicateur de l'état physiologique membranaire des micro-organismes, l'analyse des profils des A.G.(s) reste nécessaire pour appréhender les différents mécanismes synthétiques.

Les évolutions des pourcentages des A.G.(s) prédominants (> à 5% des A.G.(s) totaux) chez *R. meliloti*, *B. japonicum* et *B. elkanii* au cours de la croissance sont rapportées en figure 10.

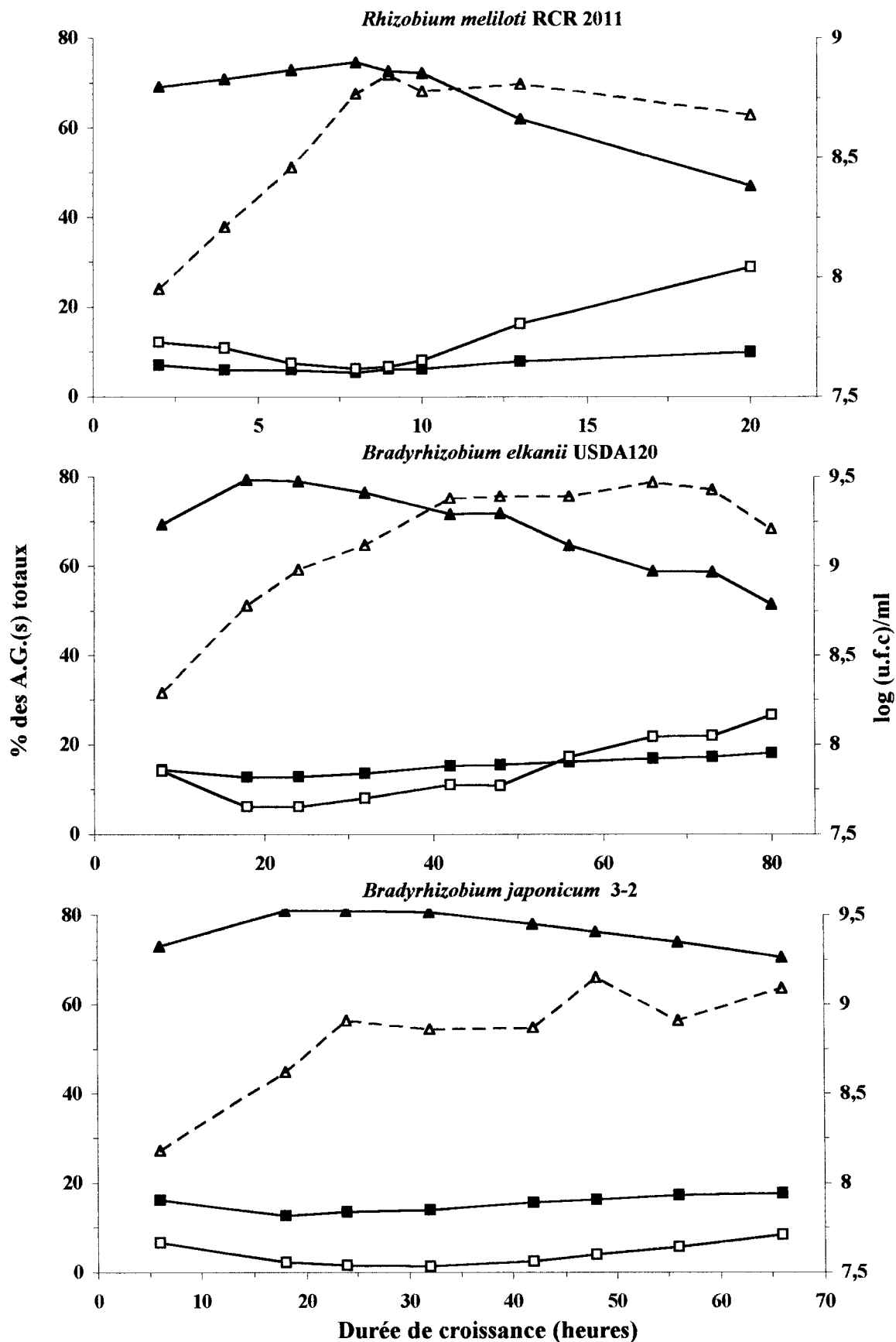
Au cours de la croissance, les pourcentages des différents A.G.(s) évoluent de manière tout à fait similaire chez les trois souches étudiées.

Ainsi, le % de C18:1w7c augmente au cours de la phase exponentielle pour diminuer ensuite au cours des phases de décélération et stationnaire de croissance. Les % de C16:0 et de C19:0 cyclo 11-12 suivent des évolutions rigoureusement inverses, de sorte qu'un comportement en image de miroir est observé (surtout entre le C18:1w7c et le C19:0 cyclo 11-12). Ce phénomène apparaît cependant moins marqué chez *B. japonicum*. La somme des pourcentages de ces deux A.G.(s) reste constante (de l'ordre de 80 %) au cours de la croissance. Les autres A.G.(s) détectés n'évoluent pas de manière significative.

De part ses propriétés physiques, le C19:0 cyclo 11-12 est souvent considéré comme un insaturé (GUCKERT *et al.*, 1986; JAHNKE, 1992; JOHNSON *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1996 ...). L'évolution du degré d'insaturation observé chez nos souches est donc essentiellement liée aux variations du C16:0.

Nos résultats sont en accord avec de nombreux travaux publiés tant sur les (brady)rhizobia (MACKENZIE *et al.*, 1979; HUBAC *et al.*, 1992) que sur d'autres micro-organismes tels *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus fermentum* et *Leuconostoc oenos*. Quelques différences mineures sont cependant observées.





**Figure 10:** Evolution des A.G.(s) majeurs (■: C16:0; ▲: C18:1; □: C19:0 cyclo) au cours de la croissance (Δ) des (brady)rhizobia.

Ainsi, le genre *Pseudomonas* présente une faible quantité de C18:1w7c (STEAD, 1992) et dans ce cas c'est le C16:1w7c qui est transformé en C17:0 cyclo 9-10 (CULLEN *et al.*, 1971). Chez *L. fermentum* et *L. oenos* le C18:1w9c est modifié en C19:0 cyclo 9-10 et C19:0 cyclo 11-12 (SUUTARI et LAASKO, 1992; DRICI-CACHON *et al.*, 1996).

Dans tous les cas, la transformation des A.G.(s) *cis* insaturés en A.G.(s) cyclo coïncide avec la phase de ralentissement ou l'entrée en phase stationnaire de croissance. Certains auteurs attribuent à cette transformation un rôle de protection de la double liaison ou l'assimilent à un mécanisme de survie permettant le maintien de l'intégrité membranaire durant une privation nutritionnelle (GUCKERT *et al.*, 1986).

Cependant une souche mutante d'*Escherichia coli* incapable de synthétiser des A.G.(s) cyclo montre les mêmes taux de survie durant la phase stationnaire de croissance ou après différents stress alors que la souche sauvage est capable de réaliser cette conversion (GROGAN et CRONAN, 1986).

Notons également que chez certains genres bactériens (*Shewanella putrefaciens* et *Thermus* spp.), l'entrée en phase stationnaire n'implique pas de conversion d'A.G.(s) monoinsaturés en A.G.(s) cycliques, d'autant plus que ces bactéries n'en synthétisent pas (NICHOLS *et al.*, 1994; NORDSRÖM, 1992).

**BU**  
**UILLE**

### III- DEGRES D'INSATURATION DES A.G.(S) DES SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA OBSERVES AVANT DESSICCATION ET TAUX DE SURVIE JUSTE APRES DESSICCATION: INFLUENCE DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE

Trois phases de croissance ont été retenues au cours de cette étude (fin de phase de latence, milieu de phase exponentielle et phase stationnaire tardive). Une détermination des degrés d'insaturation des A.G.(s) des cellules de *Rhizobium meliloti* RCR 2011, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 a été réalisée pour caractériser ces trois phases de croissance. Approximativement  $2 \times 10^9$  cellules, débarrassées de leurs exopolysaccharides et/ou polysaccharides capsulaires, sont filtrées sur membranes (25mm de diamètre et 0,22  $\mu$ m de porosité) de manière à obtenir au maximum une à deux couches de cellules et éviter d'éventuels effets protecteurs des polysaccharides. Les ensembles bactéries/filtres sont alors soumis à des déshydratations lentes (de 8h à 50h) à différentes H.R.(s). Les taux de survie sont estimés juste après la phase de dessiccation (=  $t_0$  phase de conservation).

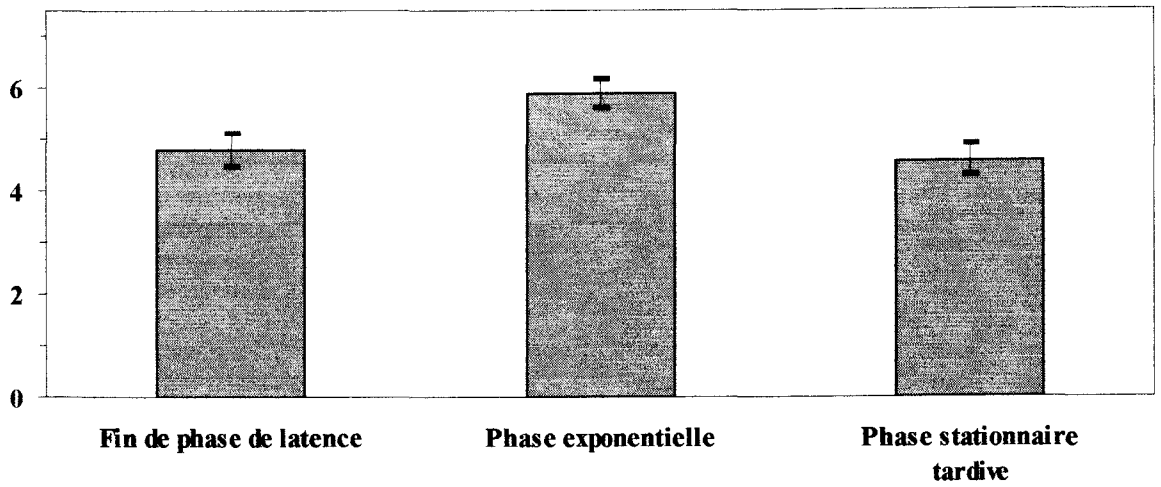
#### **1- Degrés d'insaturation des A.G.(s) des souches de (brady)rhizobia observés aux trois phases de croissances retenues**

Les résultats obtenus sont rapportés en figure 11 et dans le tableau 17.

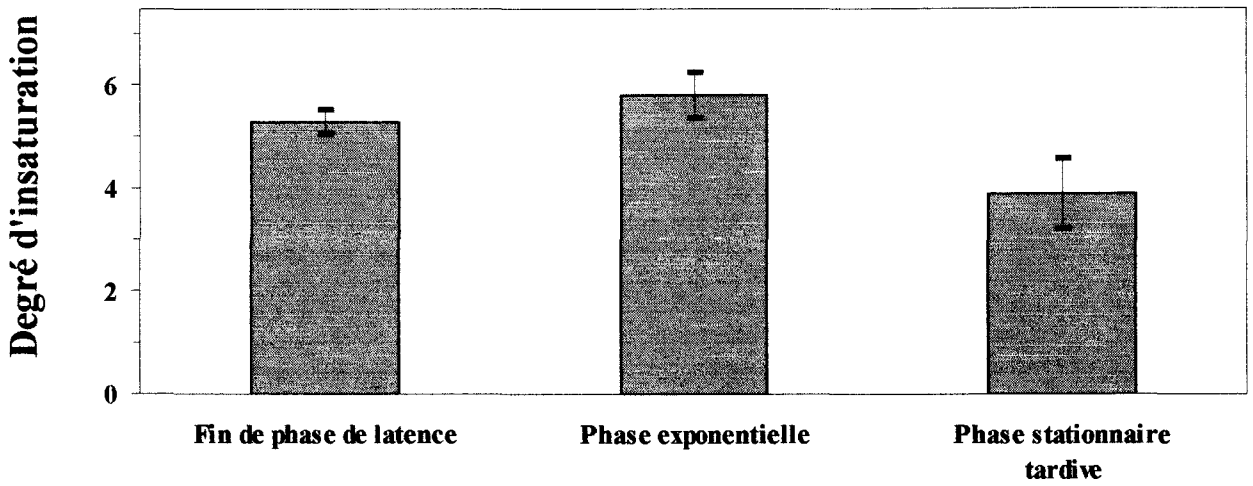
Quelles que soient les souches, les degrés d'insaturation les plus élevés (5,7 à 5,9) sont observés en milieu de phase exponentielle de croissance.

Pour *R. meliloti* RCR 2011 et *B. japonicum* 3-2 les degrés d'insaturation relevés en fin de phase de latence et en phase stationnaire de croissance ne sont pas significativement différents. Ces résultats ne sont guère surprenants compte tenu de notre protocole d'inoculation (des précultures prises en phase stationnaire de croissance sont inoculées dans des milieux neufs). Cependant, chez *B. elkanii* les degrés d'insaturation sont significativement différents pour les trois phases de croissances.

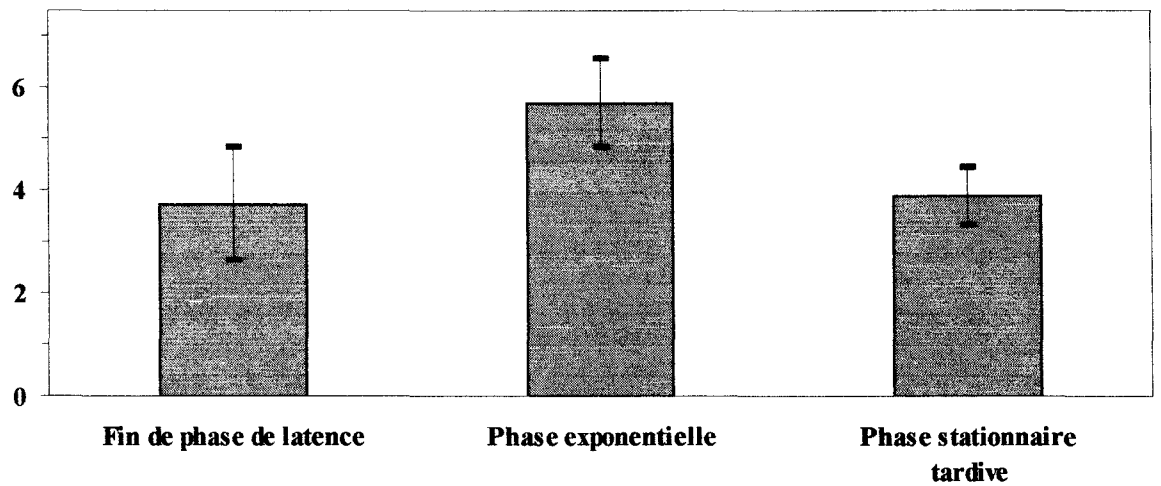
*Rhizobium meliloti* RCR 2011



*Bradyrhizobium elkanii* USDA 120



*Bradyrhizobium japonicum* 3-2



**Figure 11:** Degrés d'insaturation chez les trois souches de (brady)rhizobia observés pour trois phases de croissances. Moyenne sur trois répétitions  $\pm$  intervalle de confiance ( $P = 0.05$ ).

**Tableau 17:** Degrés d'insaturation des A.G.(s) des souches de (brady)rhizobia pour les trois phases de croissance retenues

Souches	Phase de Croissance	Degré d'insaturation *
<i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011	Fin de phase de latence	4,80 B
	Phase exponentielle	5,88 A
	Phase stationnaire tardive	4,59 B
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120	Fin de phase de latence	5,28 B
	Phase exponentielle	5,80 A
	Phase stationnaire tardive	3,88 C
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2	Fin de phase de latence	3,75 B
	Phase exponentielle	5,71 A
	Phase stationnaire tardive	3,88 B

\* pour une souche donnée, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de NEWMAN-KEULS (P = 0,05).

Des valeurs croissantes des degrés d'insaturations sont observées dans l'ordre phase stationnaire, de latence et phase exponentielle de croissance.

L'ensemble de ces résultats confirment les travaux précédents (cf. Résultats II-1)

## **2- Taux de survie des (brady)rhizobia après dessiccation sous différentes H.R.(s)**

### **a- Effet de la dessiccation sous différentes H.R.(s) sur la survie des souches de (brady)rhizobia**

Les résultats rapportés dans le tableau 18 montrent que pour *R. meliloti* RCR 2011 et *B. elkanii* USDA 120, la dessiccation sous les cinq H.R.(s) testées n'affecte pas de manière significative la survie des cellules. Cette constatation est vérifiée quel que soit l'âge physiologique des cellules (à l'exception de *R. meliloti* prélevée en phase stationnaire et soumise à une dessiccation de 3 et 43,6% d'H.R.).

Il en va de même pour les cellules de *B. japonicum* 3-2 prélevées en phase exponentielle ou stationnaire de croissance (à l'exception de la phase stationnaire à 22%). Cependant cette souche prélevée en fin de phase de latence présente une sensibilité significative lors de la déshydratation sous les H.R.(s) les plus basses (3, 22 et 43,6%). Notons cependant que dans ce cas, la dessiccation porte sur un nombre de cellules de 2 à 5 fois moins important que pour les autres essais. Un « effet inoculum » pourrait donc expliquer ces résultats (cf. Généralités IV-4).

L'absence de sensibilité de souches de (brady)rhizobia, enregistrée au cours de notre étude est en accord avec les observations de MARY *et al.*, (1994) sur d'autres souches de *R. meliloti* et de HUGENHOLTZ *et al.* (1995) sur *Methylobacterium* spp.. De même, d'autres genres bactériens (notamment à GRAM positif) tels *Micrococcus denitrificans*, *Mycobacterium phlei* (ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN, 1979) et *Lactococcus lactis* (FU et ETZEL, 1995) ne sont pas significativement affectés par l'étape de dessiccation.

**Tableau 18:** Comparaison des taux de survie après déshydratation à différentes H.R.(s) selon l'âge physiologique chez *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Phase de croissance	Humidité Relative	log du nombre de cellules survivantes * chez		
		<i>R. meliloti</i> RCR 2011	<i>B. elkanii</i> USDA 120	<i>B. japonicum</i> 3-2
Fin de phase de latence	Avant dessiccation	9,37 ± 0,12 A**	9,18 ± 0,03 A	8,60 ± 0,19 A
	3%	9,03 ± 0,21 A	9,01 ± 0,14 A	7,70 ± 0,06 B
	22%	9,04 ± 0,31 A	9,11 ± 0,01 A	7,69 ± 0,12 B
	43%	9,11 ± 0,12 A	9,03 ± 0,20 A	7,75 ± 0,04 B
	68%	9,08 ± 0,32 A	9,20 ± 0,08 A	8,40 ± 0,19 A
	83%	9,38 ± 0,08 A	9,25 ± 0,06 A	8,54 ± 0,05 A
Phase exponentielle	Avant dessiccation	9,45 ± 0,10 A	9,44 ± 0,00 A	9,03 ± 0,07 A
	3%	8,80 ± 0,21 A	9,47 ± 0,01 A	9,11 ± 0,06 A
	22%	8,97 ± 0,16 A	9,49 ± 0,04 A	8,97 ± 0,08 A
	43%	8,96 ± 0,06 A	9,33 ± 0,07 A	9,03 ± 0,07 A
	68%	9,08 ± 0,32 A	9,54 ± 0,03 A	9,17 ± 0,30 A
	83%	9,38 ± 0,08 A	9,49 ± 0,04 A	9,22 ± 0,04 A
Phase stationnaire tardive	Avant dessiccation	9,31 ± 0,02 A	9,28 ± 0,01 A	9,17 ± 0,04 A
	3%	8,93 ± 0,19 B	9,09 ± 0,28 A	8,59 ± 0,17 AB
	22%	9,11 ± 0,04 AB	8,78 ± 0,76 A	8,15 ± 0,49 B
	43%	8,93 ± 0,06 B	9,22 ± 0,13 A	8,65 ± 0,06 AB
	68%	9,25 ± 0,06 AB	9,15 ± 0,05 A	8,67 ± 0,13 AB
	83%	9,11 ± 0,06 AB	8,74 ± 0,37 A	8,41 ± 0,04 AB

\* Moyenne sur deux répétitions ± écart-type

\*\* Pour une souche et une phase de croissance données, les valeurs du logarithme du nombre de cellules survivantes suivies d'une même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de NEWMAN-KEULS (P= 0,05)

Par contre, d'autres bactéries à GRAM négatif, notamment *Escherichia coli* (RYZNAR et DRASIL, 1991; LOUIS *et al.*, 1994; LESLIE *et al.*, 1995...), *Pseudomonas fluorescens* (ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN, 1979; BALE *et al.*, 1993; DANDURAND *et al.*, 1994), *Alcaligenes paradoxus* et *Sphingomonas paucimobilis* (HUGENHOLTZ *et al.*, 1995) présentent une sensibilité importante à différents stress de dessiccation (dessiccation à l'air libre, sous 31% d'H.R. ou lyophilisation). Parmi les *Bradyrhizobium*, *B. japonicum* G49 (seule souche autorisée pour la préparation d'inocula en France) a été décrite comme sensible à la dessiccation (CLIQUET et CATROUX, 1994; FOUILLEUX *et al.*, 1994; MARY *et al.*, 1994). Chez les rhizobia, *R. leguminosarum* bv. *viciae* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* présentent également une sensibilité à la dessiccation à l'air libre (BALE *et al.*, 1993). Il est vrai qu'au sein du genre *Rhizobium*, les biovars de *R. leguminosarum* sont fréquemment rapportés comme les plus sensibles à la dessiccation (cf. Généralités IV-1).

#### **b- Effet de l'âge physiologique sur la survie de souches de (brady)rhizobia juste après dessiccation sous différentes H.R.(s)**

Les résultats sont présentés dans le tableau 19.

Chez *R. meliloti* RCR 2011 et *B. elkanii* USDA 120, les cellules prélevées aux trois âges physiologiques testés ne présentent pas de différences significatives dans leurs pourcentages de survie juste après dessiccation et ce quelles que soient les H.R.(s). Cependant, chez *B. japonicum* 3-2, les cellules prélevées en phase exponentielle sont plus tolérantes à la dessiccation à différentes H.R.(s) que les cellules prélevées dans les deux autres phases. Pour les cellules prises dans cette phase exponentielle, le nombre de cellules survivantes est paradoxalement supérieur au nombre de cellules initiales. Ce phénomène est parfois observé chez des cocci à GRAM positif formant des chaînettes, des grappes ou des tétrades.



**Tableau 19:** Effet de l'âge physiologique sur les taux de survie de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* juste après dessiccation à différentes H.R.(s):

Souche et phase de croissance	Pourcentage de survie * juste après dessiccation aux H.R.(s) suivantes				
	3%	22%	43%	68%	83%
<b><i>R. meliloti</i></b>					
<b>RCR 2011</b>					
Fin de phase de latence	46,15 ± 8,96 (A)**	49,62 ± 21,14 (A)	54,95 ± 0,00 (A)	53,97 ± 23,79 (A)	102,58 ± 10,01 (A)
Phase exponentielle	22,46 ± 5,43 (A)	32,91 ± 4,81 (A)	33,12 ± 12,12 (A)	52,28 ± 43,7 (A)	87,65 ± 34,7 (A)
Phase stationnaire tardive	44,20 ± 20,77 (A)	63,36 ± 8,23 (A)	42,24 ± 3,44 (A)	88,26 ± 7,18 (A)	63,94 ± 5,20 (A)
<b><i>B. elkanii</i></b>					
<b>USDA 120</b>					
Fin de phase de latence	68,76 ± 17,71 (A)	84,19 ± 4,12 (A)	75,66 ± 37,72 (A)	105,16 ± 13,66 (A)	117,45 ± 24,68 (A)
Phase exponentielle	107,18 ± 3,49 (A)	112,47 ± 10,97 (A)	78,14 ± 12,67 (A)	126,03 ± 8,2 (A)	112,47 ± 10,97 (A)
Phase stationnaire tardive	69,71 ± 39,62 (A)	58,24 ± 69,17 (A)	88,63 ± 29,73 (A)	73,40 ± 5,97 (B)	33,76 ± 24,80 (A)
<b><i>B. japonicum</i></b>					
<b>3-2</b>					
Fin de phase de latence	13,04 ± 3,97 (B)	12,38 ± 2,01 (B)	15,10 ± 7,53 (C)	63,10 ± 0,00 (A)	89,42 ± 28,62 (B)
Phase exponentielle	118,86 ± 1,94 (A)	87,12 ± 2,84 (A)	100 ± 0,00 (A)	147,52 ± 73,56 (A)	155,05 ± 10,09 (A)
Phase stationnaire tardive	28,10 ± 12,80 (B)	13,49 ± 13,32 (B)	30,23 ± 1,97 (B)	31,12 ± 12,12 (A)	17,50 ± 2,84 (C)

\* Moyenne sur 2 répétitions ± écart-type.

\*\* Pour une souche et une H.R. donnée, les pourcentages de survie suivis d'une même lettre ne sont pas statistiquement différents d'après le test de NEWMAN KEULS (P=0,05)

L'augmentation du nombre d'unités formant colonies résulterait de la rupture de ces arrangements comme il a été suggéré pour *Dienococcus proteolyticus* et *Micrococcus luteus* après congélation-décongélation (RYZNAR et DRASIL, 1991).

Nous ne pouvons cependant pas invoquer un tel mécanisme, pour un bacille à GRAM négatif ne formant pas d'association. Cependant, *B. japonicum* 3-2 synthétise, en forte quantité, des polysaccharides capsulaires au cours de cette phase (DOLHEM-BIREMON *et al.*, 1993 et 1995). Une élimination incomplète de ces polysaccharides capsulaires au cours des lavages pourrait éventuellement aboutir à une coalescence entre certaines cellules. Une rupture de ces « associations artificielles » pourrait être induite au cours de la dessiccation et rendre compte d'une augmentation du nombre d'unités formant colonies.

Les résultats observés au cours de cette étude chez *R. meliloti* et *B. elkanii* sont conformes aux travaux de ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN (1979) sur *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*, de DYE (1982) sur *R. meliloti* et *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) et de CLIQUET et CATROUX (1994) sur *B. japonicum*. Ces auteurs montrent, en effet, que des cellules bactériennes prises en fin de phase exponentielle, début de phase stationnaire et/ou en phase stationnaire tardive présentent les mêmes taux de survie après dessiccation.

Par contre, chez les bactéries à GRAM positif (*Micrococcus* spp., *Lactobacillus bulgaricus*), *Mycobacterium phlei* et *Saccharomyces cerevisiae* les cellules prélevées en phase stationnaire de croissance tolèrent mieux la dessiccation que les cellules prélevées en fin de phase exponentielle de croissance (ANTHEUNISSE et ARKESTEIJN-DIJKSMAN, 1979; TEIXEIRA *et al.* 1995a).

Chez *Pseudomonas fluorescens*, des cellules prélevées en fin de phase exponentielle tolèrent mieux la dessiccation que les cellules en phase stationnaire. Dans ce cas le rôle protecteur du glucose résiduel, non encore assimilé par les cellules en phase exponentielle, a été invoqué (SLININGER *et al.*, 1996).

### **3- Recherche d'une éventuelle corrélation entre taux de survie juste après dessiccation et degré d'insaturation avant dessiccation**

*Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 présente des degrés d'insaturation de ses A.G.(s) significativement différents selon les âges physiologiques testés. Cependant, il n'existe pas de différence significative dans les taux de survie après dessiccation observés pour les cellules prélevées au cours de ces phases. Un comportement similaire est enregistré pour *R. meliloti* RCR 2011. Pour *B. japonicum* 3-2 des taux de survie élevés sont observés pour les cellules prélevées en phase exponentielle et coïncident avec un degré d'insaturation des A.G.(s) élevé.

Contrairement aux travaux de ZIKMANIS *et al.*(1982) sur *Saccharomyces cerevisiae*, il ne semble donc pas exister de corrélation nette entre degré d'insaturation avant dessiccation et taux de survie juste après dessiccation chez les (brady)rhizobia.

## **IV-DETERMINATION DES DEGRES D'INSATURATION ET PROFILS QUANTITATIF ET QUALITATIF DES A.G.(S) OBSERVES JUSTE APRES DESSICCATION DES (BRADY)RHIZOBIA: EFFET DE L'H.R. ET DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE**

### **1- Détermination des degrés d'insaturation des A.G.(s) de souches de (brady)rhizobia juste après dessiccation**

Une détermination des degrés d'insaturation a été réalisée juste après dessiccations lentes (opérations réalisées sur des périodes de 8 à 50h) à 5 humidités relatives (3; 22; 43; 68 et 83%) pour les cellules de *R. meliloti*, *B. japonicum* et *B. elkanii* prélevées à trois âges physiologiques différents.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 12, 13 et 14 et le tableau 20.

Quelles que soient les H.R.(s) et les phases de croissances étudiées (fig. 12), les cellules de *R. meliloti* RCR 2011 présentent des degrés d'insaturation de leurs A.G.(s) significativement plus faibles juste après dessiccation que ceux observés pour les témoins non déshydratés (tableau 20). Les diminutions des degrés d'insaturations après dessiccation semblent légèrement plus accentuées chez les cellules prélevées en phase exponentielle de croissance.

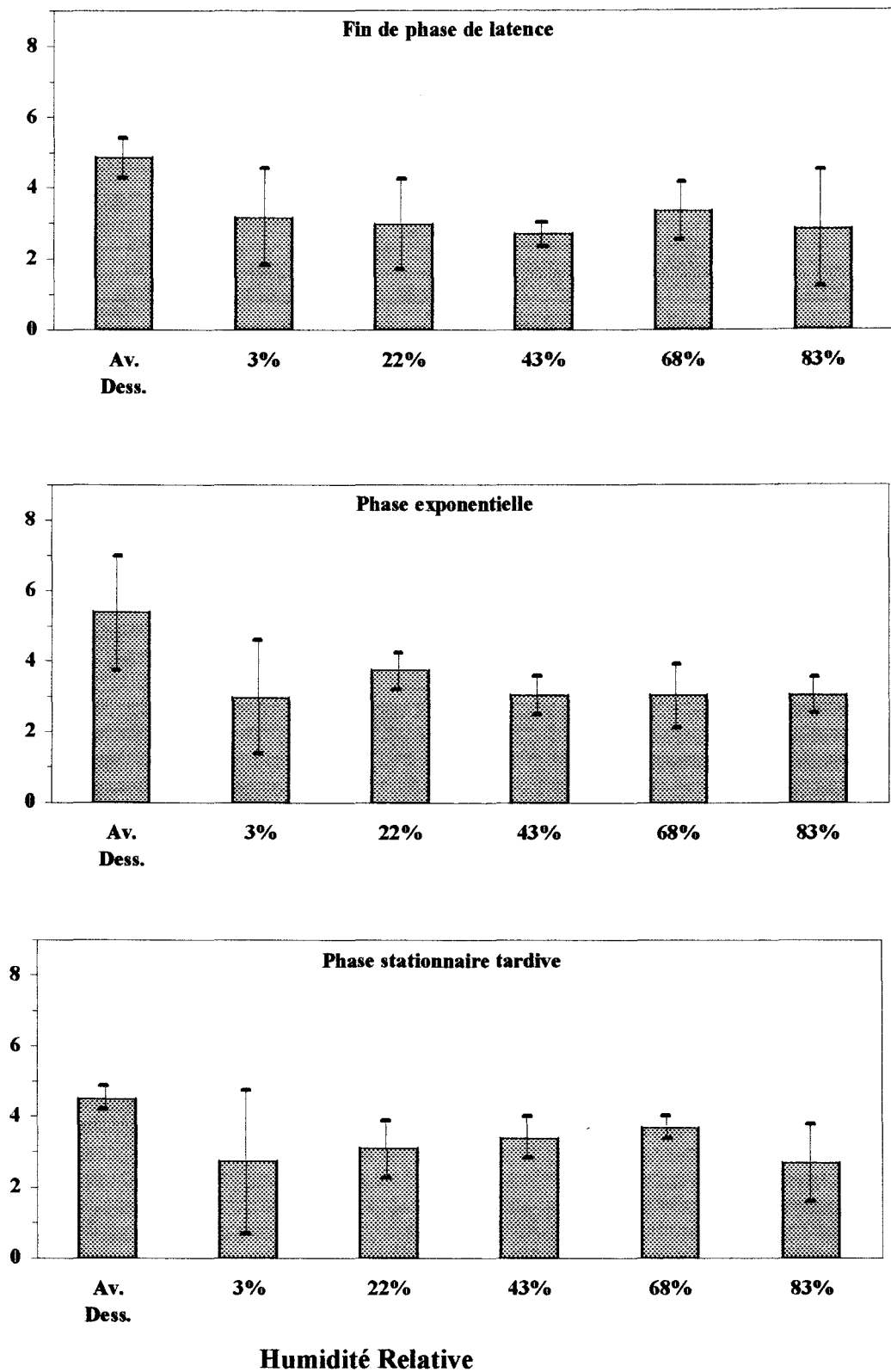
Les cellules de *B. elkanii* USDA 120 prélevées en phase stationnaire de croissance ne diminuent pas de manière significative leurs degrés d'insaturation après dessiccation par rapport aux témoins. Prise en fin de phase de latence ou en phase exponentielle de croissance, cette souche n'adapte significativement les degrés d'insaturation de ses A.G.(s) qu'au cours des dessiccations sous 3, 22 et 43% d'H.R.(s) voire également sous 68% et 83% pour les cellules prélevées en phase exponentielle. (fig. 13, tableau 20)

Chez *B. japonicum* 3-2, les cellules prélevées en phase exponentielle de croissance n'adaptent pas du tout leurs degrés d'insaturation quelles que soient les H.R.(s) testées (fig. 14). Suivant le test de NEWMAN-KEULS ( $P=0,05$ ), les cellules prélevées en fin de phase de latence et phase stationnaire de croissance présentent, après dessiccation à 3, 22, 43 et 68% d'H.R.(s), des degrés d'insaturation significativement inférieurs à ceux observés après dessiccation à 83% d'H.R. et pour les témoins non déshydratés (tableau 20).

A certaines exceptions près l'ensemble de ces travaux montre que, les (brady)rhizobia réagissent aux stress de dessiccation à différentes H.R.(s) en diminuant le degré d'insaturation de leurs A.G.(s).

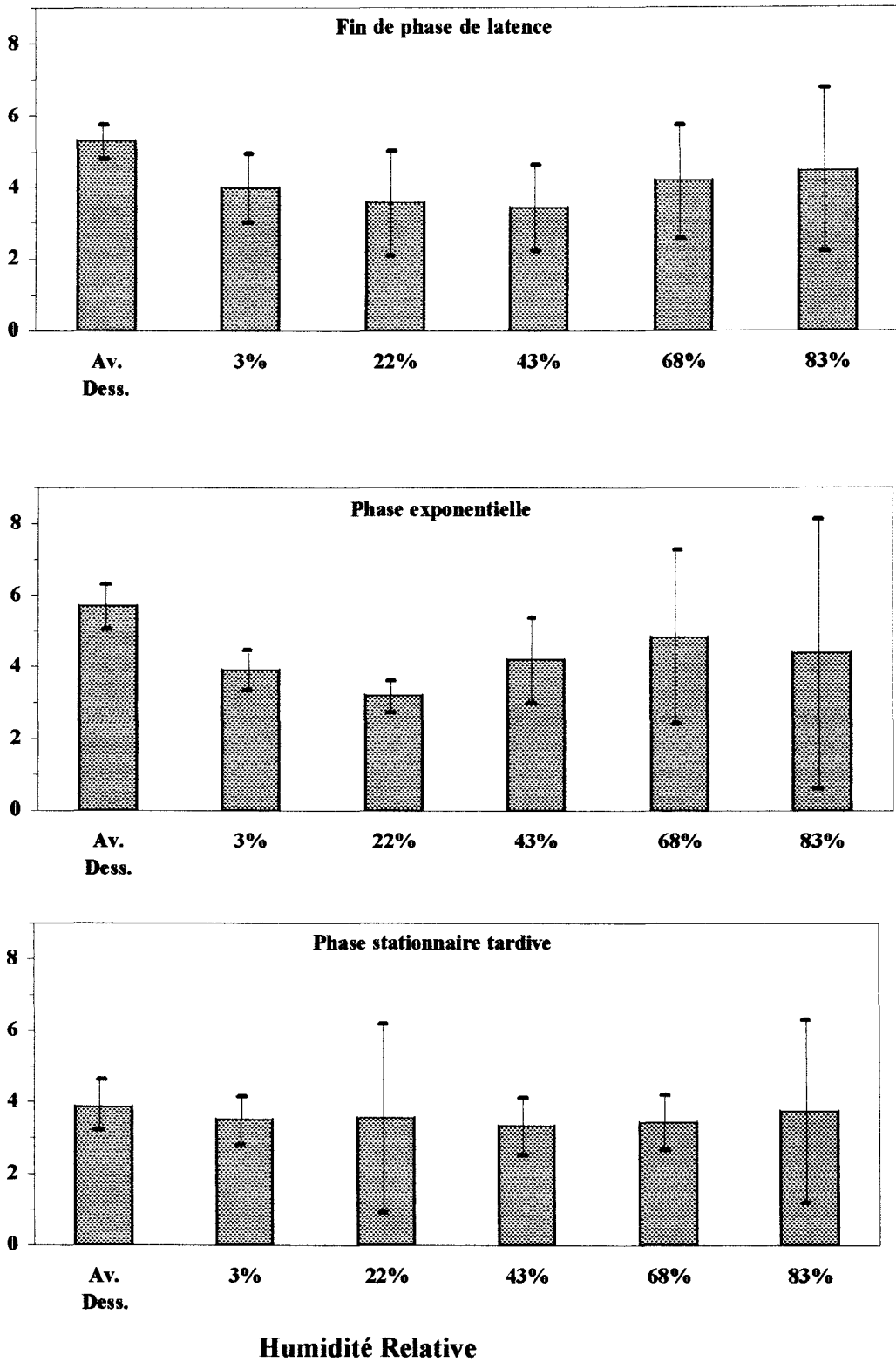
L'absence d'adaptation observée pour les cellules de *B. japonicum* 3-2 en phase exponentielle de croissance pourrait éventuellement s'expliquer par une synthèse accrue de polysaccharides capsulaires (DOLHEM-BIREMON *et al.*, 1993 et 1994) au cours de cette phase.

Degré d'insaturation

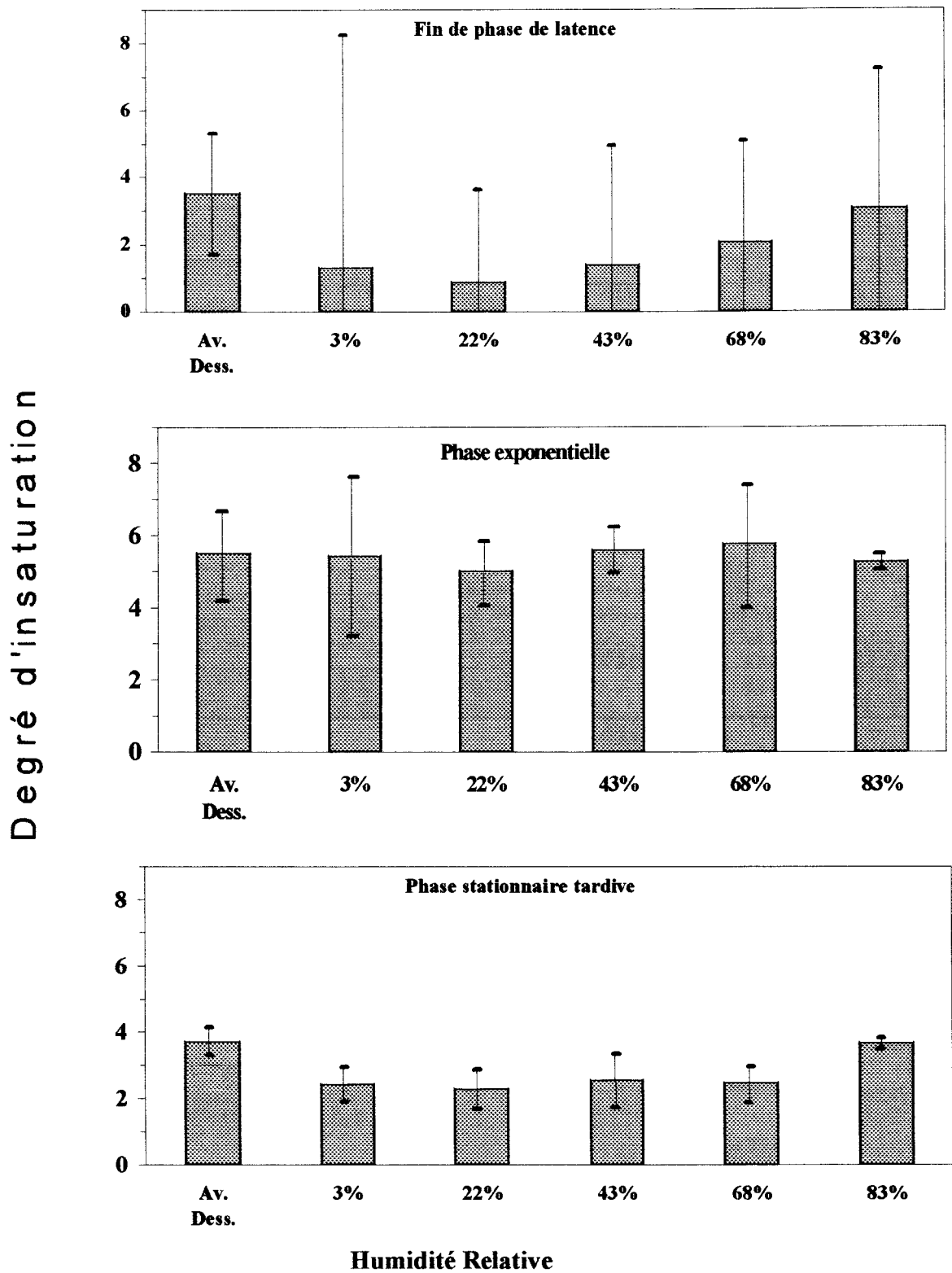


**Figure 12** : Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de *Rhizobium meliloti* RCR 2011 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions  $\pm$  intervalle de confiance (P=0,05).

Degré d'insaturation



**Figure 13** : Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions  $\pm$  intervalle de confiance (P=0,05).



**Figure 14** : Degrés d'insaturation des A.G.(s) juste après dessiccation à 3, 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) des cellules de *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 prélevées à trois âges physiologiques. Moyenne sur 3 répétitions  $\pm$  intervalle de confiance ( $P=0,05$ ).

**Tableau 20:** Evolution des degrés d'insaturation des A.G.(s) de cellules de (brady)rhizobia après déshydratations: effet des H.R.(s) et des âges physiologiques

Phase de croissance	Humidité Relative	Degré d'insaturation*		
		<i>Rhizobium meliloti</i> RCR 2011	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 120	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 3-2
Fin de phase de latence	Avant dessiccation	4,86 A	5,31 A	3,53 A
	3%	3,17 B	3,99 AB	1,32 C
	22%	2,97 B	3,59 B	0,90 C
	43%	2,72 B	3,44 B	1,39 C
	68%	3,33 B	4,19 AB	2,08 BC
	83%	2,83 B	4,46 AB	3,08 AB
Phase exponentielle	Avant dessiccation	5,40 A	5,71 A	5,52 A
	3%	2,97 B	3,92 C	5,44 A
	22%	3,76 B	3,22 D	5,01 A
	43%	3,05 B	4,21 BC	5,55 A
	68%	3,04 B	4,84 B	5,76 A
	83%	3,05 B	4,40 BC	5,28 A
Phase stationnaire tardive	Avant dessiccation	4,51 A	3,88 A	3,71 A
	3%	2,75 B	3,51 A	2,44 B
	22%	3,11 B	3,57 A	2,30 B
	43%	3,40 B	3,36 A	2,56 B
	68%	3,69 B	3,44 A	2,49 B
	83%	2,70 B	3,74 A	3,68 A

\*Pour une souche donnée et une phase de croissance donnée, les valeurs de degré d'insaturation des A.G.(s) suivies d'une même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de NEWMAN-KEULS (P = 0,05).



Ces synthèses entraîneraient une dépense énergétique importante qui empêcherait, par la suite, toute adaptation au niveau des A.G.(s) notamment dans les conditions oligotrophiques retenues au cours de notre protocole de dessiccation.

L'absence d'adaptation observée chez *B. elkanii* USDA 120 semble plus paradoxale. Cette souche serait apparemment incapable de diminuer son degré d'insaturation en dessous d'une valeur seuil de l'ordre de 3,2.

Nos résultats sont en contradiction totale avec les travaux de ZIKMANIS *et al.* (1982). En effet, ces auteurs montrent une augmentation du degré d'insaturation des A.G.(s) chez des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* soumises à dessiccation. Néanmoins, les souches les plus tolérantes à la dessiccation sont celles qui présentent les degrés d'insaturation les plus faibles.

Par contre, des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* soumises à une diminution d' $a_w$  réduisent le degré d'insaturation de leurs A.G.(s). (HILGE-ROTMANN et REHM, 1991). L'atomisation ou la lyophilisation de *Lactobacillus bulgaricus*, conduit à une réduction au demi du degré d'insaturation des A.G.(s) par rapport aux témoins non déshydratés (CASTRO *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1996). De même, une très légère diminution de ce degré est observée chez *Pseudomonas aureofaciens* après dessiccation sous 94% d'H.R. (KIEFT *et al.*, 1994).

Nos résultats confirment donc ces travaux et élargissent ces observations à une plus large gamme de niveaux de déshydratation (3 à 83% d'H.R.(s)).

## **2- Profils qualitatif et quantitatif des A.G.(s) observés chez les (brady)rhizobia juste après dessiccation**

Les résultats de cette étude sont reportés dans les tableaux 21,22 et 23 pour *R. meliloti* RCR 2011, les tableaux 24, 25 et 26 pour *B. elkanii* USDA 120 et les tableaux 27, 28 et 29 pour *B. japonicum* 3-2.

Quelles que soient les souches, les phases de croissance ou les H.R.(s) testées, nous avons observé les grandes tendances suivantes:

Les acides gras (à courtes chaînes C9:0 à C15:0) apparaissent ou leurs pourcentages augmentent de manière significative, (de  $\cong$  0,1% pour les témoins à 2-4% pour les cellules déshydratées). Pour une souche et une phase de croissance données, les pourcentages observés pour un A.G.(s) à courte chaîne particulier sont identiques quelles que soient les H.R.(s) testées.

Après dessiccation, le pourcentage de C18:1w9c augmente (de 0,7 à  $\cong$  3% pour les cellules déshydratées) et du C18:2w6,9c apparaît pour atteindre des pourcentages de l'ordre de 0,2 à 2%.

Les pourcentages de C18:1w7c diminuent. La diminution est d'autant plus marquée que l'H.R. est élevée. Une augmentation notable du C19:0 cyclo n'est observée que pour des H.R.(s) généralement  $\geq$  68%. La somme des pourcentages de ces deux A.G.(s) reste cependant identique quelles que soient les H.R.(s) et est généralement inférieur de dix points par rapport aux témoins non déshydratés. Cette dernière constatation n'est cependant pas vérifiée pour *B. elkanii* USDA 120 prélevé en phase stationnaire et pour *B. japonicum* 3-2 en phase exponentielle de croissance. Nous pouvons remarquer qu'une absence de diminution des degrés d'insaturation avait été observée dans ces deux cas (cf. Résultats IV-1).

Les pourcentages de C17:0 restent inchangés.

Chez *R. meliloti* RCR 2011, le pourcentage de C18:0 reste constant et celui du C16:0 augmente par rapport aux témoins quelles que soient les phases de croissance et les H.R.(s) testées. Le phénomène inverse est observé chez les deux souches de bradyrhizobia.

Les pourcentages de C14:03OH et accessoirement de C16:03OH augmentent après dessiccation des cellules de *R. meliloti* prélevées aux trois âges physiologiques. L'augmentation semble plus importante aux fortes H.R.(s). Les A.G.(s) hydroxylés ne sont pas observés chez les bradyrhizobia en raison de la méthode d'extraction employée (cf. Généralités VIII-1-a).

Chez *R. meliloti* RCR 2011 et *B. elkanii* USDA 120, les pourcentages de C20:2w6,9c augmentent après dessiccation.

**Tableau 21:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *R. meliloti* RCR 2011 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0		<b>0,24</b> (0,42)	<b>0,35</b> (0,61)		<b>0,23</b> (0,40)	
C12:0		<b>0,98</b> (1,00)	<b>1,12</b> (0,83)	<b>1,39</b> (1,13)	<b>0,69</b> (0,54)	<b>1,24</b> (1,10)
C14:0	<b>0,04</b> (0,07)	<b>0,90</b> (0,79)	<b>1,70</b> (0,44)	<b>1,71</b> (0,63)	<b>0,75</b> (0,38)	<b>1,97</b> (1,17)
C15:0			<b>0,61</b> (0,08)	<b>0,69</b> (0,16)	<b>0,25</b> (0,21)	<b>0,57</b> (0,53)
C14:0,3OH	<b>5,85</b> (0,36)	<b>6,76</b> (0,92)	<b>6,81</b> (0,24)	<b>6,39</b> (0,23)	<b>7,25</b> (0,46)	<b>6,97</b> (0,90)
C16:1w7c	<b>0,91</b> (0,21)		<b>0,41</b> (0,71)	<b>0,42</b> (0,72)	<b>0,62</b> (0,54)	<b>0,38</b> (0,65)
C16:0	<b>7,19</b> (0,83)	<b>9,92</b> (0,62)	<b>10,80</b> (1,01)	<b>11,12</b> (0,48)	<b>10,29</b> (0,68)	<b>11,41</b> (1,37)
C17:0 cyclo	<b>1,05</b> (0,28)	<b>0,72</b> (0,63)	<b>1,07</b> (0,14)	<b>1,05</b> (0,25)	<b>1,17</b> (0,28)	<b>1,34</b> (0,11)
C17:0	<b>0,39</b> (0,05)		<b>0,37</b> (0,33)	<b>0,39</b> (0,34)	<b>0,31</b> (0,27)	<b>0,14</b> (0,24)
C16:0,3OH	<b>0,57</b> (0,49)	<b>0,73</b> (0,64)	<b>0,69</b> (0,60)	<b>0,69</b> (0,60)	<b>0,43</b> (0,74)	<b>0,80</b> (0,69)
C18:2w6,9c		<b>3,70</b> (5,77)	<b>0,92</b> (0,39)	<b>1,73</b> (1,71)	<b>0,19</b> (0,32)	<b>1,74</b> (3,04)
C18:1w9c	<b>0,87</b> (0,76)	<b>3,00</b> (2,26)	<b>1,85</b> (0,67)	<b>2,85</b> (0,56)	<b>2,62</b> (1,69)	<b>2,83</b> (1,45)
C18:1w7c	<b>55,45</b> (2,00)	<b>45,50</b> (0,91)	<b>43,37</b> (3,10)	<b>39,89</b> (4,48)	<b>34,19</b> (4,24)	<b>27,58</b> (4,32)
C18:0	<b>2,39</b> (0,50)	<b>3,07</b> (1,14)	<b>2,76</b> (0,36)	<b>3,73</b> (1,93)	<b>2,24</b> (0,15)	<b>2,59</b> (0,10)
C19:0 cyclo	<b>22,25</b> (0,56)	<b>18,59</b> (7,04)	<b>23,08</b> (2,47)	<b>22,97</b> (3,38)	<b>32,36</b> (1,86)	<b>35,22</b> (1,44)
C20:3w6,9,12c	<b>2,74</b> (0,74)	<b>3,02</b> (0,88)	<b>2,52</b> (0,19)	<b>2,50</b> (0,08)	<b>2,68</b> (0,17)	<b>2,69</b> (0,33)
C20:2w6,9c	<b>0,83</b> (0,07)	<b>1,23</b> (2,13)	<b>0,96</b> (1,67)	<b>1,44</b> (1,80)	<b>2,38</b> (1,84)	<b>1,39</b> (2,41)

\* avant dessiccation

**Tableau 22:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *R. meliloti* RCR 2011 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions  $\pm$  écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0		<b>0,38</b> (0,65)		<b>0,04</b> (0,06)	<b>0,35</b> (0,60)	
C12:0	<b>0,06</b> (0,10)	<b>1,16</b> (0,56)	<b>1,45</b> (1,29)	<b>1,24</b> (0,57)	<b>1,65</b> (1,43)	<b>0,33</b> (0,57)
C14:0	<b>0,12</b> (0,21)	<b>1,64</b> (0,11)	<b>1,34</b> (0,97)	<b>1,82</b> (0,28)	<b>1,82</b> (0,76)	<b>1,15</b> (0,15)
C15:0	<b>0,03</b> (0,06)	<b>0,25</b> (0,44)	<b>0,06</b> (0,11)	<b>0,64</b> (0,63)	<b>0,71</b> (0,14)	<b>0,53</b> (0,46)
C14:0,3OH	<b>5,75</b> (0,42)	<b>6,57</b> (0,08)	<b>6,36</b> (0,59)	<b>6,91</b> (0,81)	<b>7,43</b> (0,07)	<b>7,13</b> (1,08)
C16:1w7c	<b>1,00</b> (0,07)	<b>0,57</b> (0,98)	<b>0,22</b> (0,38)	<b>0,39</b> (0,67)	<b>0,35</b> (0,60)	<b>1,28</b> (1,12)
C16:0	<b>5,49</b> (0,86)	<b>9,99</b> (2,13)	<b>7,35</b> (0,69)	<b>9,39</b> (1,33)	<b>8,96</b> (1,37)	<b>10,75</b> (2,16)
C17:0 cyclo	<b>0,45</b> (0,14)		<b>0,41</b> (0,35)	<b>0,13</b> (0,22)	<b>0,19</b> (0,33)	<b>0,16</b> (0,27)
C17:0	<b>0,27</b> (0,01)	<b>0,17</b> (0,29)	<b>0,18</b> (0,31)	<b>0,46</b> (0,45)	<b>0,16</b> (0,28)	<b>0,22</b> (0,38)
C16:0,3OH	<b>0,37</b> (0,32)	<b>0,47</b> (0,41)	<b>0,26</b> (0,45)	<b>0,55</b> (0,48)	<b>0,54</b> (0,47)	<b>0,33</b> (0,57)
C18:2w6,9c		<b>1,12</b> (0,99)	<b>0,66</b> (0,75)	<b>0,52</b> (0,46)	<b>0,74</b> (0,75)	<b>0,39</b> (0,68)
C18:1w9c	<b>0,48</b> (0,27)	<b>1,74</b> (0,51)	<b>2,18</b> (1,06)	<b>1,57</b> (0,62)	<b>1,73</b> (0,90)	<b>3,83</b> (2,20)
C18:1w7c	<b>72,32</b> (0,20)	<b>56,18</b> (4,24)	<b>55,33</b> (1,57)	<b>54,1</b> (2,61)	<b>50,80</b> (3,15)	<b>42,83</b> (3,90)
C18:0	<b>3,00</b> (0,16)	<b>4,25</b> (1,71)	<b>3,49</b> (1,82)	<b>2,89</b> (0,5)	<b>2,74</b> (0,19)	<b>3,25</b> (0,67)
C19:0 cyclo	<b>7,27</b> (2,12)	<b>11,83</b> (1,22)	<b>15,68</b> (2,24)	<b>14,54</b> (4,94)	<b>18,17</b> (3,85)	<b>21,98</b> (4,62)
C20:3w6,9,12c	<b>2,62</b> (0,22)	<b>2,87</b> (0,16)	<b>3,04</b> (0,33)	<b>3,15</b> (0,37)	<b>3,19</b> (0,12)	<b>3,43</b> (0,44)
C20:2w6,9c	<b>0,07</b> (0,13)		<b>1,37</b> (0,71)	<b>0,57</b> (0,98)		<b>1,06</b> (1,84)

\* avant dessiccation

**Tableau 23:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *R. meliloti* RCR 2011 prélevées en phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions  $\pm$  écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0						
C12:0		<b>0,33</b> (0,57)	<b>0,67</b> (0,58)	<b>0,07</b> (0,12)		<b>0,92</b> (0,81)
C14:0	<b>0,08</b> (0,13)	<b>1,35</b> (0,80)	<b>0,91</b> (0,97)	<b>0,97</b> (0,45)	<b>0,32</b> (0,28)	<b>1,52</b> (0,39)
C15:0		<b>0,64</b> (0,45)	<b>0,14</b> (0,25)	<b>0,26</b> (0,22)	<b>0,25</b> (0,22)	<b>0,54</b> (0,57)
C14:0,3OH	<b>5,28</b> (0,33)	<b>6,70</b> (0,64)	<b>7,13</b> (0,69)	<b>7,15</b> (0,07)	<b>7,27</b> (0,70)	<b>7,75</b> (0,47)
C16:1w7c	<b>0,69</b> (0,03)	<b>0,56</b> (0,49)	<b>0,33</b> (0,58)	<b>0,57</b> (0,51)	<b>0,67</b> (0,68)	<b>0,48</b> (0,83)
C16:0	<b>8,63</b> (0,35)	<b>12,25</b> (2,70)	<b>11,53</b> (1,05)	<b>10,75</b> (1,61)	<b>10,26</b> (0,45)	<b>12,40</b> (1,49)
C17:0 cyclo	<b>1,06</b> (0,23)	<b>0,49</b> (0,43)	<b>0,89</b> (0,06)	<b>0,60</b> (0,52)	<b>0,66</b> (0,57)	<b>0,74</b> (0,64)
C17:0	<b>0,56</b> (0,02)	<b>0,69</b> (0,10)	<b>0,20</b> (0,35)	<b>0,39</b> (0,34)	<b>0,36</b> (0,31)	<b>0,19</b> (0,32)
C16:0,3OH	<b>0,41</b> (0,36)	<b>0,26</b> (0,44)	<b>0,63</b> (0,54)			<b>0,73</b> (0,64)
C18:2w6,9c						
C18:1w9c	<b>0,59</b> (0,79)	<b>3,59</b> (0,59)	<b>2,15</b> (1,02)	<b>2,48</b> (0,31)	<b>2,44</b> (2,12)	<b>3,48</b> (1,15)
C18:1w7c	<b>55,54</b> (1,18)	<b>42,27</b> (3,27)	<b>43,65</b> (1,60)	<b>41,45</b> (0,09)	<b>35,93</b> (2,65)	<b>28,16</b> (0,55)
C18:0	<b>2,71</b> (0,42)	<b>4,57</b> (2,64)	<b>2,80</b> (0,46)	<b>2,50</b> (0,29)	<b>2,32</b> (0,06)	<b>2,74</b> (1,17)
C19:0 cyclo	<b>20,72</b> (2,39)	<b>19,94</b> (3,93)	<b>22,79</b> (2,07)	<b>26,62</b> (1,60)	<b>33,28</b> (1,95)	<b>32,15</b> (2,86)
C20:3w6,9,12c	<b>2,45</b> (0,37)	<b>3,13</b> (0,28)	<b>3,20</b> (0,18)	<b>3,41</b> (0,18)	<b>3,21</b> (0,36)	<b>3,68</b> (0,19)
C20:2w6,9c	<b>0,60</b> (0,09)	<b>2,25</b> (0,51)	<b>2,39</b> (1,23)	<b>2,08</b> (1,34)	<b>2,46</b> (1,87)	<b>3,60</b> (1,30)

\* avant dessiccation

**Tableau 24:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. elkanii* USDA 120 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0			<b>0,86</b> (1,06)	<b>1,98</b> (1,88)	<b>1,37</b> (1,19)	<b>1,58</b> (1,37)
C12:0	<b>0,06</b> (0,10)	<b>0,15</b> (0,13)	<b>0,07</b> (0,12)	<b>0,09</b> (0,08)		<b>0,31</b> (0,53)
C14:0	<b>0,19</b> (0,27)	<b>0,70</b> (0,61)	<b>1,06</b> (0,30)	<b>0,86</b> (0,80)	<b>0,85</b> (0,54)	<b>0,66</b> (0,89)
C15:0		<b>0,49</b> (0,43)	<b>0,50</b> (0,43)	<b>0,49</b> (0,46)	<b>0,20</b> (0,18)	<b>0,37</b> (0,45)
C16:1w7c	<b>0,74</b> (0,24)	<b>0,83</b> (0,76)	<b>1,14</b> (1,05)	<b>1,51</b> (1,45)	<b>0,42</b> (0,39)	<b>0,24</b> (0,42)
C16:0	<b>14,39</b> (0,68)	<b>16,14</b> (0,63)	<b>16,67</b> (0,30)	<b>16,34</b> (0,65)	<b>14,68</b> (2,39)	<b>13,62</b> (2,03)
C17:0 cyclo	<b>0,25</b> (0,43)	<b>0,25</b> (0,22)	<b>0,12</b> (0,21)	<b>0,26</b> (0,22)	<b>0,38</b> (0,33)	<b>0,62</b> (0,05)
C17:0		<b>0,14</b> (0,24)	<b>0,29</b> (0,25)	<b>0,13</b> (0,22)		<b>0,19</b> (0,32)
C18:2w6,9c	<b>0,07</b> (0,13)	<b>0,26</b> (0,45)	<b>0,66</b> (0,65)	<b>1,00</b> (0,95)	<b>0,57</b> (0,98)	<b>0,39</b> (0,67)
C18:1w9c	<b>0,61</b> (0,99)	<b>2,63</b> (0,57)	<b>3,63</b> (1,65)	<b>4,00</b> (1,98)	<b>3,15</b> (2,33)	<b>3,48</b> (1,22)
C18:1w7c	<b>65,12</b> (5,82)	<b>61,87</b> (1,89)	<b>61,26</b> (2,77)	<b>59,31</b> (2,40)	<b>56,54</b> (8,02)	<b>48,78</b> (5,35)
C18:0	<b>1,10</b> (0,24)	<b>2,13</b> (0,02)	<b>2,24</b> (0,25)	<b>2,34</b> (0,67)	<b>2,29</b> (0,93)	<b>2,08</b> (0,83)
C19:0 cyclo	<b>16,62</b> (6,72)	<b>12,24</b> (2,09)	<b>10,52</b> (1,34)	<b>10,54</b> (0,76)	<b>18,00</b> (1,74)	<b>24,93</b> (1,87)
C20:2w6,9c	<b>0,17</b> (0,29)	<b>0,85</b> (1,48)			<b>1,24</b> (2,14)	<b>1,95</b> (1,20)

\* avant dessiccation

**Tableau 25:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. elkanii* USDA 120 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions  $\pm$  écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess. *	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0		<b>0,90</b> (1,56)	<b>2,14</b> (1,88)	<b>2,16</b> (1,87)	<b>2,62</b> (0,16)	<b>2,74</b> (0,47)
C12:0	<b>0,03</b> (0,05)					
C14:0	<b>0,16</b> (0,28)	<b>0,98</b> (0,08)	<b>0,84</b> (0,73)	<b>0,49</b> (0,44)	<b>0,42</b> (0,13)	<b>0,45</b> (0,13)
C15:0	<b>0,06</b> (0,10)	<b>0,32</b> (0,27)	<b>0,38</b> (0,33)	<b>0,31</b> (0,27)		<b>0,34</b> (0,10)
C16:1w7c	<b>0,54</b> (0,18)	<b>0,51</b> (0,88)	<b>0,67</b> (0,58)	<b>0,72</b> (0,63)	<b>0,18</b> (0,25)	<b>0,63</b> (0,37)
C16:0	<b>13,62</b> (0,32)	<b>15,44</b> (0,96)	<b>17,10</b> (2,30)	<b>14,14</b> (1,37)	<b>12,29</b> (0,59)	<b>13,22</b> (0,49)
C17:0 cyclo	<b>0,48</b> (0,42)	<b>0,21</b> (0,36)				<b>0,44</b> (0,03)
C17:0		<b>0,13</b> (0,23)				
C18:2w6,9c						
C18:1w9c		<b>2,24</b> (0,27)	<b>2,71</b> (2,72)	<b>1,26</b> (1,09)	<b>0,92</b> (1,29)	<b>3,21</b> (0,30)
C18:1w7c	<b>71,59</b> (5,56)	<b>63,35</b> (4,29)	<b>62,32</b> (12,15)	<b>69,38</b> (4,69)	<b>68,87</b> (2,78)	<b>53,82</b> (8,00)
C18:0	<b>1,04</b> (0,31)	<b>2,29</b> (0,20)	<b>2,57</b> (0,57)	<b>2,13</b> (0,39)	<b>1,83</b> (0,21)	<b>1,81</b> (0,16)
C19:0 cyclo	<b>12,37</b> (5,75)	<b>11,07</b> (4,54)	<b>10,04</b> (11,52)	<b>8,58</b> (4,94)	<b>12,89</b> (2,02)	<b>22,59</b> (4,86)
C20:2w6,9c	<b>0,07</b> (0,12)	<b>1,42</b> (1,23)		<b>0,67</b> (1,17)		

\* avant dessiccation

**Tableau 26:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. elkanii* USDA 120 prélevées en phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0		<b>1,37</b> (1,23)	<b>2,75</b> (0,06)	<b>1,22</b> (2,11)	<b>2,51</b> (2,21)	<b>1,53</b> (1,46)
C12:0	<b>0,92</b> (1,05)			<b>0,36</b> (0,63)		
C14:0	<b>0,83</b> (0,46)	<b>1,07</b> (0,20)	<b>0,82</b> (0,14)	<b>0,91</b> (1,05)	<b>0,78</b> (0,36)	<b>1,09</b> (0,88)
C15:0	<b>0,20</b> (0,20)	<b>0,38</b> (0,34)	<b>0,41</b> (0,15)	<b>0,10</b> (0,17)	<b>0,53</b> (0,24)	<b>0,65</b> (0,47)
C16:1w7c	<b>2,18</b> (2,70)	<b>1,28</b> (1,11)	<b>1,02</b> (0,30)	<b>0,18</b> (0,31)	<b>0,49</b> (0,53)	<b>0,59</b> (0,54)
C16:0	<b>16,84</b> (1,11)	<b>16,73</b> (0,57)	<b>15,36</b> (1,24)	<b>17,72</b> (2,18)	<b>16,06</b> (0,96)	<b>15,99</b> (2,91)
C17:0 cyclo	<b>1,06</b> (1,49)	<b>0,17</b> (0,29)		<b>0,20</b> (0,35)	<b>0,48</b> (0,44)	<b>0,20</b> (0,34)
C17:0						
C18:2w6,9c				<b>0,35</b> (0,61)	<b>0,23</b> (0,40)	<b>0,30</b> (0,51)
C18:1w9c	<b>1,23</b> (1,07)	<b>3,61</b> (0,70)	<b>3,26</b> (1,24)	<b>4,74</b> (2,79)	<b>3,74</b> (1,01)	<b>4,27</b> (1,55)
C18:1w7c	<b>56,42</b> (15,03)	<b>53,87</b> (5,47)	<b>59,32</b> (6,17)	<b>49,12</b> (9,72)	<b>47,07</b> (5,84)	<b>42,39</b> (6,55)
C18:0	<b>1,44</b> (0,57)	<b>2,44</b> (0,26)	<b>2,23</b> (0,25)	<b>2,70</b> (0,86)	<b>2,36</b> (0,37)	<b>2,44</b> (1,01)
C19:0 cyclo	<b>16,66</b> (8,08)	<b>17,83</b> (7,60)	<b>14,02</b> (3,51)	<b>21,77</b> (4,78)	<b>24,48</b> (6,19)	<b>29,64</b> (2,31)
C20:2w6,9c	<b>0,19</b> (0,32)	<b>0,64</b> (1,11)		<b>0,63</b> (1,09)	<b>0,80</b> (1,38)	<b>0,85</b> (1,47)

\* avant dessiccation



**Tableau 27:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. japonicum* 3-2 prélevées en fin de phase de latence. Moyenne sur trois répétitions  $\pm$  écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0						
C12:0						
C14:0		<b>4,31</b> (2,36)		<b>2,57</b> (0,04)	<b>0,84</b> (1,18)	<b>0,62</b> (0,87)
C15:0		<b>2,58</b> (1,10)		<b>1,84</b> (0,28)	<b>0,68</b> (0,96)	<b>0,39</b> (0,54)
C16:1w7c	<b>0,21</b> (0,29)	<b>7,40</b> (0,71)		<b>4,33</b> (0,95)	<b>1,96</b> (2,77)	<b>0,92</b> (1,30)
C16:0	<b>17,76</b> (0,40)	<b>28,85</b> (8,10)	<b>27,19</b> (3,19)	<b>27,13</b> (4,85)	<b>22,24</b> (2,36)	<b>17,72</b> (1,61)
C17:0						
C18:2w6,9c		<b>2,29</b> (3,24)			<b>1,12</b> (1,58)	
C18:1w9c		<b>5,89</b> (8,32)	<b>4,15</b> (5,87)	<b>4,49</b> (6,34)	<b>4,92</b> (6,96)	<b>3,71</b> (5,25)
C18:1w7c	<b>66,81</b> (2,96)	<b>29,48</b> (3,75)	<b>32,68</b> (5,35)	<b>39,62</b> (1,86)	<b>49,97</b> (6,49)	<b>56,63</b> (7,87)
C18:0	<b>3,96</b> (0,45)	<b>9,51</b> (3,87)	<b>26,10</b> (4,63)	<b>10,75</b> (1,73)	<b>8,82</b> (3,27)	<b>5,93</b> (0,28)
C19:0 cyclo	<b>9,50</b> (1,45)	<b>8,18</b> (1,34)	<b>9,89</b> (2,94)	<b>9,30</b> (0,35)	<b>9,23</b> (1,65)	<b>14,10</b> (1,42)

\* avant dessiccation

**Tableau 28:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. japonicum* 3-2 prélevées en phase exponentielle. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0	<b>0,09</b> (0,16)		<b>0,08</b> (0,14)	<b>0,06</b> (0,10)	<b>0,17</b> (0,18)	<b>0,13</b> (0,23)
C12:0	<b>0,18</b> (0,31)	<b>0,32</b> (0,56)	<b>0,26</b> (0,44)	<b>0,26</b> (0,27)	<b>0,74</b> (0,78)	<b>0,50</b> (0,87)
C14:0	<b>0,25</b> (0,43)	<b>0,74</b> (0,23)	<b>0,76</b> (0,02)	<b>0,30</b> (0,04)	<b>0,28</b> (0,11)	<b>0,69</b> (0,10)
C15:0	<b>0,10</b> (0,17)	<b>0,15</b> (0,27)	<b>0,30</b> (0,28)	<b>0,22</b> (0,11)	<b>0,23</b> (0,07)	<b>0,33</b> (0,05)
C16:1w7c	<b>0,67</b> (0,16)	<b>1,14</b> (0,30)	<b>1,52</b> (0,38)	<b>0,62</b> (0,12)	<b>1,05</b> (0,40)	<b>1,02</b> (0,05)
C16:0	<b>12,39</b> (0,78)	<b>11,35</b> (0,93)	<b>11,50</b> (1,19)	<b>10,34</b> (1,18)	<b>8,83</b> (2,17)	<b>10,46</b> (1,23)
C17:0	<b>0,12</b> (0,21)		<b>0,13</b> (0,22)	<b>0,10</b> (0,17)	<b>0,21</b> (0,21)	
C18:2w6,9c	<b>0,47</b> (0,82)		<b>0,27</b> (0,47)			<b>0,70</b> (1,22)
C18:1w9c			<b>2,10</b> (0,69)	<b>1,21</b> (0,60)	<b>1,41</b> (0,40)	<b>3,36</b> (0,91)
C18:1w7c	<b>79,15</b> (1,70)	<b>78,67</b> (2,39)	<b>74,81</b> (2,15)	<b>73,89</b> (5,70)	<b>69,19</b> (7,19)	<b>62,34</b> (2,79)
C18:0	<b>1,92</b> (0,62)	<b>2,91</b> (0,50)	<b>3,17</b> (0,66)	<b>2,79</b> (0,31)	<b>3,28</b> (1,52)	<b>3,27</b> (0,45)
C19:0 cyclo	<b>2,27</b> (1,02)	<b>2,70</b> (1,53)	<b>2,22</b> (0,93)	<b>2,47</b> (1,19)	<b>6,57</b> (1,05)	<b>13,81</b> (3,63)

\* avant dessiccation

**Tableau 29:** Analyse des acides gras membranaires avant dessiccation et après équilibre à des H.R.(s) de 3, 22,43, 68 et 83% chez des cellules de *B. japonicum* 3-2 prélevées en phase stationnaire tardive. Moyenne sur trois répétitions ± écart-type (entre parenthèse) à P=0,05.

AG	Av. Dess.*	3%	22%	43%	68%	83%
C9:0	<b>0,11</b> (0,09)	<b>0,31</b> (0,27)	<b>0,13</b> (0,22)	<b>0,25</b> (0,22)	<b>0,23</b> (0,20)	
C12:0	<b>0,48</b> (0,44)	<b>1,07</b> (0,95)	<b>1,06</b> (0,99)	<b>1,13</b> (1,05)	<b>0,84</b> (0,75)	
C14:0	<b>0,23</b> (0,20)	<b>0,88</b> (0,72)	<b>1,16</b> (1,72)	<b>1,19</b> (1,41)	<b>0,77</b> (0,37)	<b>0,58</b> (0,15)
C15:0	<b>0,18</b> (0,15)	<b>0,21</b> (0,37)	<b>0,22</b> (0,39)	<b>0,72</b> (0,63)	<b>0,47</b> (0,42)	<b>0,31</b> (0,05)
C16:1w7c	<b>0,78</b> (0,29)	<b>1,25</b> (1,12)	<b>2,14</b> (2,33)	<b>1,94</b> (1,05)	<b>1,31</b> (1,28)	<b>0,91</b> (0,50)
C16:0	<b>16,70</b> (0,52)	<b>17,90</b> (2,33)	<b>17,67</b> (4,22)	<b>17,39</b> (1,85)	<b>18,06</b> (0,77)	<b>15,03</b> (0,35)
C17:0	<b>0,32</b> (0,07)	<b>0,24</b> (0,42)	<b>0,23</b> (0,40)	<b>0,36</b> (0,31)	<b>1,25</b> (0,96)	<b>0,14</b> (0,24)
C18:2w6,9c		<b>2,42</b> (2,36)	<b>1,18</b> (2,04)	<b>0,57</b> (0,99)	<b>0,75</b> (1,30)	<b>3,95</b> (0,74)
C18:1w9c	<b>0,77</b> (0,67)	<b>4,18</b> (0,94)	<b>3,20</b> (2,78)	<b>3,02</b> (0,45)	<b>2,58</b> (2,23)	<b>3,39</b> (0,93)
C18:1w7c	<b>69,60</b> (1,94)	<b>52,39</b> (6,87)	<b>52,47</b> (2,80)	<b>58,52</b> (2,07)	<b>54,77</b> (4,08)	<b>55,72</b> (1,62)
C18:0	<b>2,93</b> (0,42)	<b>7,02</b> (0,38)	<b>8,18</b> (1,89)	<b>6,56</b> (2,19)	<b>6,60</b> (0,67)	<b>4,52</b> (0,32)
C19:0 cyclo	<b>6,53</b> (0,46)	<b>6,39</b> (0,14)	<b>6,39</b> (0,82)	<b>6,14</b> (0,52)	<b>10,52</b> (1,23)	<b>11,74</b> (0,51)

\* avant dessiccation

De même, les pourcentages de C20:3w6,9,12c augmentent chez *R. meliloti*. Ce composé n'est pas détecté chez *B. elkanii*. *Bradyrhizobium japonicum* ne présente jamais d'A.G.(s) en C20 polyinsaturés.

Il apparaît donc qu'au cours de la dessiccation, la voie anaérobie de synthèse des A.G.(s) est probablement stoppée et par voie de conséquence, le pourcentage relatif des A.G.(s) caractéristiques de cette voie, à savoir le C18:1w7c et le C19:0cyclo (KEWELOH et HEIPIEPER, 1996), diminue. A l'inverse, la voie aérobie avec ses A.G.(s) particuliers, C18:1w9c et C18:2w6,9c prend alors le relais tout au moins en partie. Cette voie utilise directement les phospholipides comme substrat. Les A.G.(s) saturés de ces phospholipides sont désaturés en cis par l'intervention d'une « désaturase ». De cette manière, les cellules adaptent le degré d'insaturation des A.G.(s) de manière post-biosynthétique (KEWELOH et HEIPIEPER, 1996). Cette voie est tout à fait compatible avec les conditions oligotrophiques imposées au cours de notre protocole de dessiccation.

Une conversion du C18:1w7c en C19:0 cyclo est essentiellement observée aux H.R.(s) supérieures ou égales à 68%. Des observations similaires ont été rapportées (augmentation des rapports C19:0 cyclo / C18:1w7c et C17:0 cyclo / C16:1w7c) pour *Pseudomonas aureofaciens* après dessiccation à 94% d'H.R. (KIEFT *et al.*, 1994). La C.F.A synthase (Cyclopropane Fatty Acid synthase), enzyme hautement spécifique, soluble et intracytoplasmique, agit directement sur les bicouches de phospholipides contenant des A.G.(s) insaturés (WANG *et al.*, 1992). Ces A.G.(s) contenant un cyclopropane sont généralement considérés comme des indicateurs de stress ou de privation nutritionnelle (CRONAN et ROCK, 1987; GUCKERT *et al.*, 1986., STEWART et OLSON, 1992).

Des augmentations des pourcentages de C16:0 et C18:0 ont été relevées après atomisation de *Lactobacillus bulgaricus*: cependant, dans ce cas, les pourcentages de C18:1 et C19:0 cyclo observés après dessiccation restent identiques à ceux enregistrés pour les témoins non déshydratés (TEIXEIRA *et al.*, 1996). L'augmentation des A.G.(s) à courte chaîne n'a jamais été rapportée après des stress de dessiccation.

## V- ETUDE DES CINÉTIQUES DE SURVIE DE SOUCHES DE (BRADY)RHIZOBIA DESHYDRATÉES ET CONSERVÉES À DIFFÉRENTES HUMIDITÉS RELATIVES. RECHERCHE D'UNE CORRELATION AVEC LES DEGRÉS D'INSATURATION DES A.G.(S) JUSTE APRÈS DESSICCATION ET APRÈS 40 JOURS DE CONSERVATION

### A- Cinétiques de survie

Les cellules de (brady)rhizobia, prélevées à trois âges physiologiques, sont standardisées à la même concentration cellulaire initiale puis soumises à des déshydratations lentes (8h. à 50 h.) dans des enceintes sous pression atmosphérique normale en présence d'oxygène. Nous avons étudié, la survie de ces cellules au cours de la conservation à différentes H.R.(s) (3 à 83 %), à 30° C et en l'absence d'exopolysaccharide, de polysaccharide capsulaire ou de tout autre support protecteur.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 15, 16 et 17 et dans le tableau 30.

#### 1- Comparaison de la tolérance à différentes H.R.(s) de *R. meliloti* RCR 2011, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2

En l'absence de substances protectrices, les (brady)rhizobia comme la majorité des bactéries à GRAM négatif sont particulièrement sensibles à la dessiccation et à la conservation en l'état déshydraté quelles que soient les H.R.(s) testées.

Nos résultats sont en accord avec les constatations de nombreux auteurs (BOTTOMLEY, 1992; SMITH, 1992; STREETER, 1994) sur la sensibilité des (brady)rhizobia à la dessiccation.

Parmi différentes bactéries à GRAM négatif, *Rhizobium leguminosarum* présente avec *Pseudomonas fluorescens* la plus grande sensibilité à la conservation en l'état déshydraté (BALE *et al.*, 1993).

*Rhizobium meliloti* RCR 2011 est plus tolérant que les deux souches de bradyrhizobia lors des conservations à 22, 43, 68 et 83% d'H.R.(s) et ce

quelles que soient les phases de croissances testées. Nos résultats confirment et élargissent à une plus large gamme d'H.R.(s), les travaux de VAN RENSBURG et STRIJDOM (1980) réalisés à une H.R. de 31%. Par contre, *R. meliloti* et *B. japonicum* semblent plus sensibles que *B. elkanii* lors de la conservation à 3% d'H.R. conformément aux travaux de BUSHBY et MARSHALL (1977a).

Les profils de résistance à la dessiccation de ces deux genres bactériens correspondent aux observations de MUGNIER et JUNG (1985) et de MARY *et al.* (1994).

## **2- Humidités Relatives optimales de conservation des (brady)rhizobia**

La conservation des (brady)rhizobia à H.R.(s) élevées de l'ordre de 83% pour *R. meliloti* voire même supérieure ou égale à 68% pour les bradyrhizobia sous une température de 30°C n'est pas envisageable. Dans ces conditions, les cellules viables chez les bradyrhizobia ne sont plus détectables après 15 à 30 jours maximum de conservation. Des décroissances de type linéaires présentant parfois un épaulement au cours des cinq premiers jours sont alors observés (fig. 16 et 17 ). *Rhizobium meliloti* présente des décroissances linéaires, cependant dans ce cas des cellules viables sont encore détectables après 40 jours de conservation à 83% (fig. 15).

Ces résultats sont analogues à ceux observés chez d'autres souches de (brady)rhizobia (VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; MARY *et al.*, 1985; JUWARKAR et REWARI, 1988; CLIQUET et CATROUX, 1994; MARY *et al.*, 1994...).

Sous ces H.R.(s) et températures élevées, la présence d'un support protecteur (lait écrémé + saccharose, xanthane-caroube ou alginate) ne permet pas d'améliorer la survie des (brady)rhizobia ou d'autres bactéries (MUGNIER et JUNG, 1985; BALE *et al.*, 1993; MARY *et al.*, 1993; PAUL *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1995b...).

Le dysfonctionnement enzymatique des cellules a fréquemment été invoqué pour expliquer la mortalité observée à ces H.R.(s) et températures relativement élevées (BUSHBY et MARSHALL, 1977a;

VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; AL-RASHIDI *et al.*, 1982; FUHRMANN *et al.*, 1986; THEUNISSEN *et al.*, 1993).

Récemment, STARK et FIRESTONE (1995) ont démontré que dès 97% d'H.R., les bactéries sont confrontées à la dessiccation mais également à un manque de biodisponibilité des substrats. Ce phénomène pourrait éventuellement expliquer un dysfonctionnement enzymatique. Il est remarquable qu'à ces H.R.(s) ( $\geq 68\%$ ) nous avons observé une conversion significative du C18:1w7c en C19:0 cyclo que certains auteurs interprètent comme un indice de privation nutritionnelle.

Dans nos conditions expérimentales, une conservation à long terme des (brady)rhizobia sous 3% d'H.R. est également impossible. Aucune cellule survivante n'est détectée après 15 à 20 jours (fig.15, 16 et 17). Les cinétiques de survie sont alors biphasiques.

Ces résultats confirment qu'en l'absence de support protecteur, l'oxygène se révèle particulièrement néfaste à la survie de bactéries déshydratées (MARY *et al.*, 1985,1986 et 1994; BOZOGLU *et al.*, 1987).

La présence d'un support protecteur, de polysaccharides bactériens, d'alginate ou d'une concentration cellulaire initiale très élevée permet de minimiser fortement ces effets néfastes de l'oxygène (MUGNIER et JUNG, 1985; MARY *et al.*, 1986 et 1993; PAUL *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1995). Dans ce cas, les taux de survie observés après conservation à 3% d'H.R., se rapprochent de ceux enregistrés à 22%, 43% voire même dans certains cas 55% d'H.R.(s).

D'autre part, BUSHBY et MARSHALL (1977c) ont démontré que les (brady)rhizobia présentent peu de résistance au passage des molécules d'eau. Dans ces conditions la présence d'un support protecteur, les polysaccharides ou les cellules mortes pourraient jouer le rôle de « tampon » et ralentir la vitesse de perte en eau lors de la déshydratation ou réduire les effets du choc hydrique lors de la réhydratation (ALLISON et PROSSER, 1991; ROBERSON et FIRESTONE, 1992; OPHIR et GUTNICK, 1994). Les effets protecteurs des exopolysaccharides ont été démontrés chez *R. meliloti* déshydraté sous 3% d'H.R. (MARY *et al.*,

1986). Une amélioration des taux de survie des rhizobia a été obtenu après réhydratation ménagée (KOSANKE *et al.*, 1992; BALE *et al.*, 1993).

L'analyse de nos travaux fait apparaître que les H.R.(s) optimales de conservation se situent entre 22 et 43% d'H.R.(s) pour *R. meliloti* RCR 2011 et 43% pour *B. elkanii* USDA 120 et *B. japonicum* 3-2: nos résultats sont conformes à ceux de MARY *et al.* (1985), MUGNIER et JUNG (1985), MARY *et al.* (1993 et 1994) et PAUL *et al.*, (1993) sur les (brady)rhizobia et *Azospirillum* et de CASTRO *et al.* (1995) et TEIXEIRA *et al.* (1995b) sur *Lactobacillus bulgaricus*.

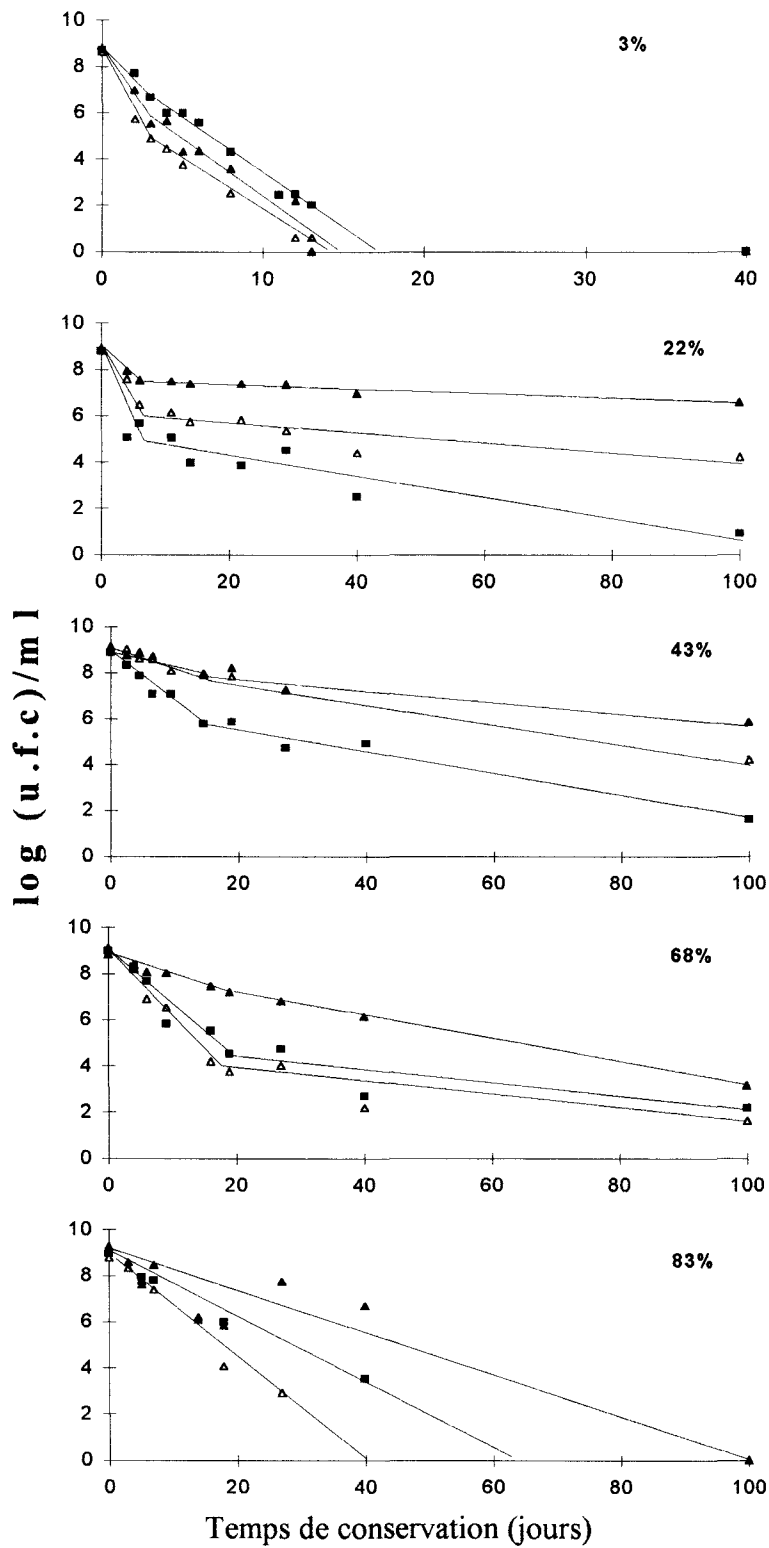
### **3- Influence de l'âge physiologique sur la survie des (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)**

De manière générale, les cellules de (brady)rhizobia prélevées en fin de phase de latence présentent les niveaux de tolérance les plus élevés aux différentes H.R.(s) testées (fig. 15, 16 et 17).

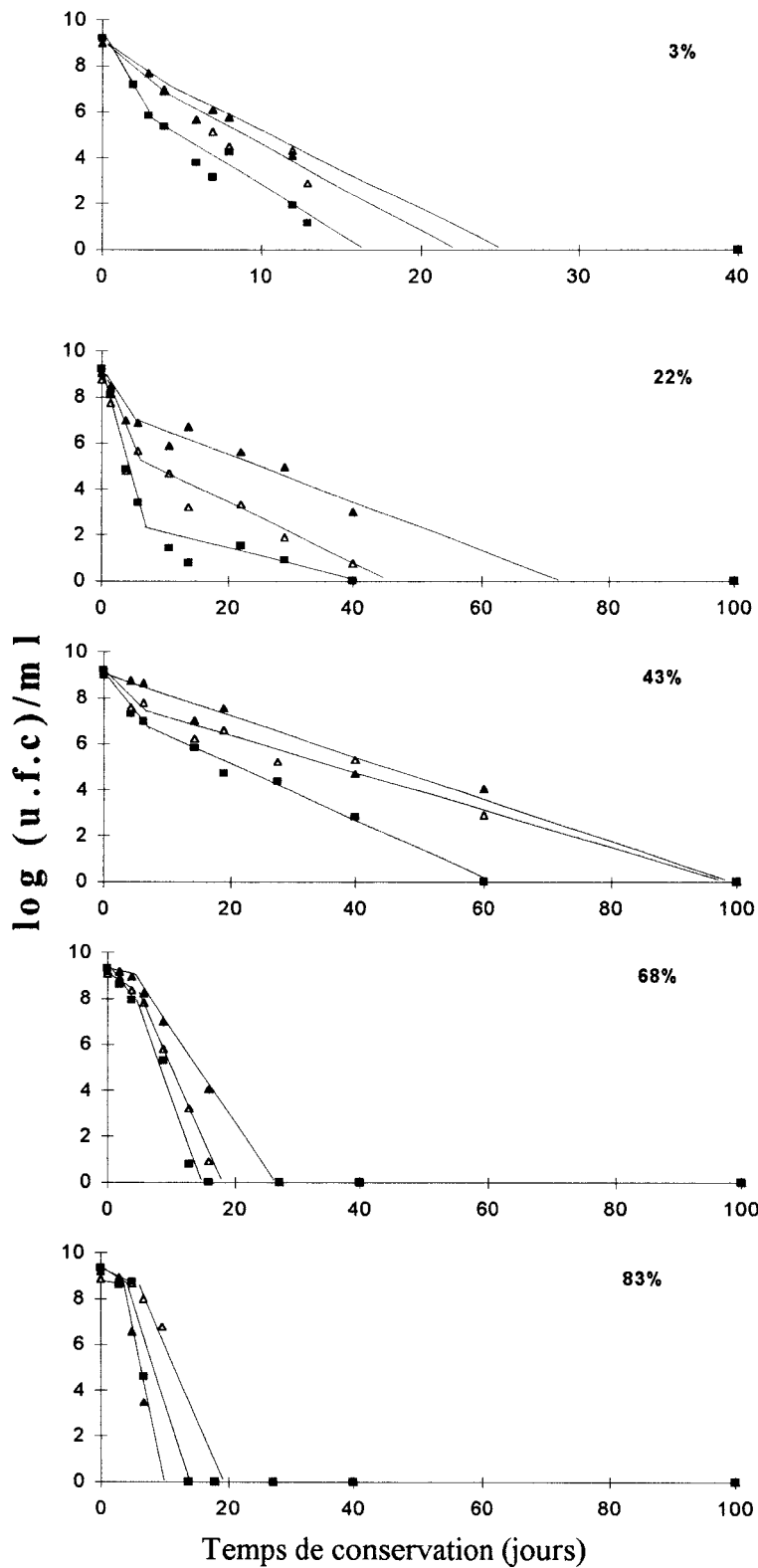
A notre connaissance, cette observation n'a jamais été rapportée tout au moins pour la tolérance à la dessiccation. Par contre, ce phénomène a déjà été décrit pour la tolérance d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus faecalis* à un choc thermique de 60°C (HANSEN et RIEMANN, 1963). Dans ce cas, les cellules en fin de phase de latence sont beaucoup plus résistantes au stress de température que les cellules parentales ayant servies à l'inoculation (issues de la phase stationnaire). Nos observations sur la tolérance à la dessiccation vont dans le même sens.

Un éventuel effet protecteur des substrats (notamment du mannitol) non encore assimilés, comme il a été décrit chez *Pseudomonas fluorescens* soumis à la dessiccation (SLININGER *et al.*, 1996), peut être totalement écarté pour expliquer ce phénomène: en effet, les lavages des cellules que nous avons réalisés par centrifugations et filtration éliminent toute trace résiduelle du milieu de culture au cours de nos manipulations. Cependant il est évident que des expériences complémentaires seront nécessaires

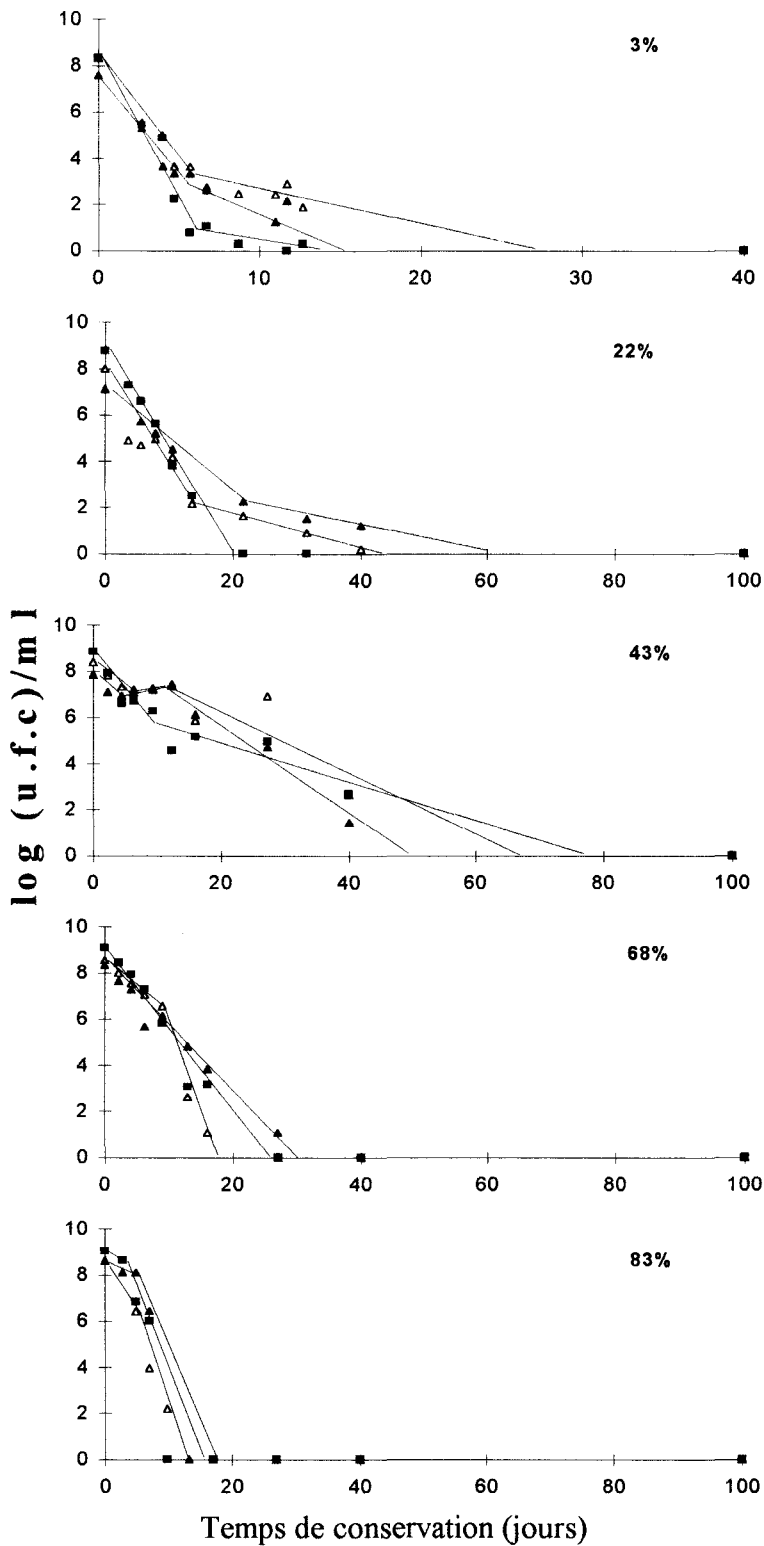




**Figure 15:** Comportement de *Rhizobium meliloti* RCR 2011 selon l'âge physiologique ( $\blacktriangle$  : fin de phase de latence;  $\blacksquare$  : phase exponentielle et  $\triangle$  : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.



**Figure 16 :** Comportement de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 selon l'âge physiologique (▲ : fin de phase de latence; ■ : phase exponentielle et △ : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.



**Figure 17 :** Comportement de *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 selon l'âge physiologique (▲ : fin de phase de latence; ■ : phase exponentielle et △ : phase stationnaire tardive) lors de la conservation aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.

pour expliquer ce phénomène qui présente un énorme intérêt dans la technologie de préparation des inocula ou des graines préinoculées et bactérisées.

Dans nos travaux nous montrons que c'est en fin de phase de latence que les cellules sont les plus aptes à supporter la conservation à l'état déshydraté voir à de rares exceptions près, les cellules de (brady)rhizobia prélevées en phase exponentielle présentent une grande sensibilité à la conservation à l'état déshydraté. Les cellules prélevées en phase stationnaire tardive montrent une tolérance intermédiaire. Ces résultats confirment de nombreux travaux (cf. Généralités IV-2).

#### **4- Allure générale des cinétiques de survie des (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)**

Dans le tableau 30 sont reportés les coefficients de mortalité issus des équations de régression linéaire établies à partir des valeurs de survie. La première équation qui caractérise la première droite de régression est de la forme:

$$\log N/N_0 = -k_1 t$$

pour laquelle  $t$  est le temps de conservation,  
 $k_1$  le coefficient de mortalité exprimé en jours<sup>-1</sup>,  
 $N_0$  et  $N$  les nombres de bactéries au temps  $t$ .

Cette équation peut s'écrire sous la forme:

$$\log N = \log N_0 - k_1 t$$

L'équation qui caractérise la seconde partie de cette phase de décroissance s'exprime de la manière suivante:

$$\log N/N'_0 = -k_2 t$$

$k_2$  est le coefficient de mortalité  
 $\log N'_0 = e$  pour  $t = 0$

elle peut également s'écrire:

$$\log N = e - k_2 t$$

Ces décroissances biphasiques sont dites concaves lorsque la deuxième pente est plus importante que la première ( $k_2 > k_1$ ); elles sont dites convexes dans le cas contraire ( $k_2 < k_1$ )

La modélisation de ces équations expérimentales doit permettre de prédire les taux de survie pour une conservation donnée: des données supplémentaires sont cependant nécessaires pour les établir avec confiance en respectant les lois de la statistique.

*Rhizobium meliloti* présente des décroissances biphasiques lors de la conservation sous 3, 22, 43 et 68% d'H.R.(s). Le coefficient de mortalité observé au cours de la première phase ( $k_1$ ) diminue lorsque l'H.R. de conservation augmente. A l'inverse, la durée de cette première phase augmente (3j à 3% jusqu'à 19j à 68% d'H.R.). A l'extrême, des décroissances linéaires avec de faibles taux de mortalité sont observées lors de la conservation à 83% d'H.R..

Des résultats similaires sont obtenus pour *B. elkanii* USDA 120 et *B. japonicum* 3-2. Des décroissances biphasiques sont observées à 3, 22 et 43%. A l'exception de la conservation sous 3% d'H.R., les taux de mortalité au cours de la première phase sont plus élevés que ceux observés chez *R. meliloti*. Il en va de même pour les taux de mortalité ( $k_2$ ) caractéristiques de la deuxième phase. Cependant une stabilisation des taux de survie apparaît transitoirement entre 5 et 10 jours de conservation pour *B. japonicum* à 43% d'H.R.(s).

Lors des conservations à 68 et 83% d'H.R.(s), la mortalité reste faible au cours des cinq premiers jours puis augmente de sorte qu'aucune cellule viable n'est observée après 10 à 30 jours maximum de conservation.

Des décroissances linéaires dans les taux de survie à forte H.R.(s) ( $\geq 75\%$ ) sont fréquemment décrites chez les (brady)rhizobia qu'il y ait présence ou non de substances protectrices (VAN RENSBURG et

STRIJDOM, 1980; MUGNIER et JUNG, 1985; MARY *et al.*, 1985 et 1993; CLIQUET et CATROUX, 1994). Des résultats similaires sont obtenus pour d'autres bactéries (ANGLE *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1995b)

Des décroissances biphasiques concaves représentent généralement la meilleure description mathématique de l'évolution de la survie de différentes espèces du genre *Rhizobium* soumis à des niveaux de déshydratation inférieures ou égaux à 68% d'H.R.(s) (OCHIN *et al.*, 1983; MARY *et al.*, 1985; OCHIN *et al.*, 1986; NECASEK *et al.*, 1993; MARY *et al.*, 1994; TROTMAN et WEAVER, 1995)

Les évolutions des taux de survie au cours de la conservation en l'état déshydraté chez *B. japonicum*, *B. elkanii* et *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) semblent beaucoup plus hétérogènes. En effet, des décroissances linéaires (VAN RENSBURG et STRIJDOM, 1980; CLIQUET et CATROUX, 1994; MARY *et al.*, 1994), biphasiques concaves (AL-RASHIDI *et al.*, 1982; BOONKERD et WEAVER, 1982; KREMER et PETERSON, 1983) et biphasiques convexes (MUGNIER et JUNG, 1985; JUWARKAR et REWARI, 1988) ont été décrites.

Des décroissances biphasiques sont fréquemment décrites chez d'autres micro-organismes (CHEN et ALEXANDER, 1973; ZECHMAN et CASIDA, 1982; BOZOGLU *et al.*, 1987; BALE *et al.*, 1993; DANDURAND *et al.*, 1994; JANNING *et al.* 1994; LOUIS *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1995).

##### **5- Etude particulière de l'aspect biphasique des cinétiques de survie chez *Rhizobium meliloti* RCR 2011 à l'état déshydraté**

L'observation de décroissances biphasiques lors de la conservation des souches de *R. meliloti* à 3, 22, 43 et 68% d'H.R., nous a conduit à envisager l'existence d'une « fraction » de population plus tolérante à la dessiccation ou un éventuel effet protecteur des cellules mortes.

###### **a- Essai de sélection d'une souche anhydro-tolérante**

Les Humidités Relatives 3 et 43% ont été retenues au cours de cette étude

**Tableau 30:** Coefficients des équations de mortalité des (brady)rhizobia lors de la conservation à 30°C sous différentes H.R.(s) ( $k_1$  et  $k_2$  coefficients observés pour la première et la seconde phase de décroissance respectivement)

Phase de Croissance	Humidité Relative	<i>R. meliloti</i> RCR 2011		<i>B. elkanii</i> USDA 120		<i>B. japonicum</i> 3-2	
		$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$
Fin de phase de latence	3%	1,034 (0,98)*	0,442 (0,99)	0,490 (0,98)	0,325 (0,91)	0,841 (0,95)	0,295 (0,44)
	22%	0,233 (0,99)	0,001 (0,92)	0,404 (0,93)	0,106 (0,89)	0,229 (0,99)	0,059 (0,96)
	43%	0,063 (0,91)	0,025 (0,63)	0,091 (0,94)	$k_1 = k_2$	ND**	ND
	68%	0,090 (0,91)	0,050 (0,99)	0,055 (0,80)	0,412 (0,99)	0,272 (0,97)	$k_1 = k_2$
	83%	0,092 (0,83)	$k_1 = k_2$	0,083	1,367 (0,99)	0,123 (0,83)	0,793
Phase exponentielle	3%	0,632 (0,96)	0,484 (0,98)	1,019 (0,98)	0,411 (0,87)	1,197 (0,92)	0,115 (0,66)
	22%	0,645(0,76)	0,046(0,92)	0,997 (0,98)	0,071 (0,61)	0,444 (0,98)	$k_1 = k_2$
	43%	0,215 (0,96)	0,049 (0,97)	0,369 (0,97)	0,125 (0,99)	0,324 (0,80)	0,088 (0,76)
	68%	0,239 (0,92)	0,029 (0,69)	0,341 (0,99)	0,783 (0,96)	0,356 (0,96)	$k_1 = k_2$
	83%	0,142 (0,98)	$k_1 = k_2$	0,151 (0,65)	0,889 (0,92)	0,141	0,633 (0,96)
Phase stationnaire tardive	3%	1,313 (0,98)	0,490 (0,92)	0,459 (0,95)	0,368 (0,86)	0,887 (0,96)	0,152 (0,54)
	22%	0,379(0,98)	0,023(0,74)	0,661 (0,75)	0,136 (0,92)	0,424 (0,77)	0,074 (0,99)
	43%	0,091 (0,94)	0,043 (0,87)	0,259 (0,82)	0,081 (0,92)	ND	ND
	68%	0,292 (0,98)	0,026 (0,71)	0,173 (0,94)	0,634 (0,99)	0,227 (0,99)	0,770 (0,97)
	83%	0,222 (0,97)	$k_1 = k_2$	0,037 (0,99)	0,686 (0,97)	0,392 (0,99)	0,856 (0,97)

\* coefficients de corrélation ( $r^2$ ) des régressions linéaires; lorsque l'analyse porte sur deux points ce coefficient n'est pas précisé

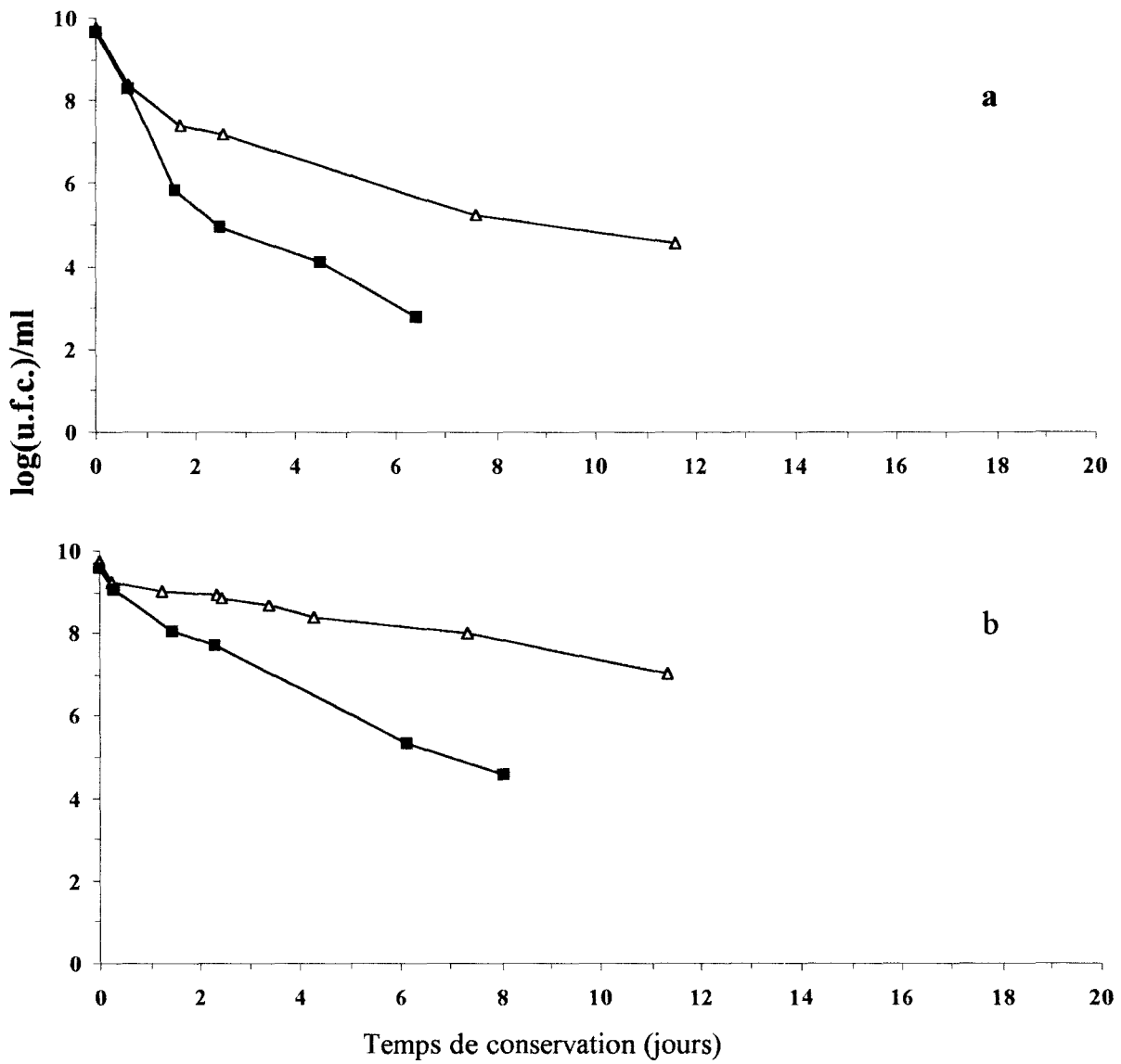
\*\* ND: Non Déterminé

(H.R. = 3% étant la plus néfaste à la conservation; H.R. = 43% étant celle qui préserve le mieux les cellules). Les cellules sont soumises à un premier cycle de dessiccation-conservation. Les taux de survie sont alors appréciés. Après dix jours de conservation, un échantillon est réhydraté et fait l'objet d'une subculture. Cette population bactérienne est alors soumise à un second cycle de déshydratation-conservation. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure 18. Les taux de survie enregistrés au cours du second cycle de conservation sont notablement inférieurs à ceux obtenus au cours du premier cycle. Il ne semble donc pas possible de sélectionner une souche anhydro-tolérante par cette méthode, ce qui est en accord avec de nombreux travaux sur la dessiccation de *Rhizobium* et d'autres micro-organismes (CHEN et ALEXANDER, 1973; BUSHBY et MARSHALL, 1977 a; PENA-CABRIALES et ALEXANDER, 1979; MARY *et al.*, 1987; RYZNAR et DRASIL, 1991). Nos résultats ne sont pas nécessairement en contradiction avec ceux de OCHIN (1980) qui démontre l'obtention d'une souche anhydro-tolérante par cycles de lyophilisations successives. Il a été, en effet, démontré que la congélation et la dessiccation sont deux stress radicalement différents (CROWE *et al.*, 1990) et que l'obtention de mutants tolérants la congélation est relativement aisée (MATSUTANI *et al.*, 1990). L'amélioration de l'anhydro-tolérance de *R. meliloti* après cycles de lyophilisations successives peut très bien être due à une tolérance accrue à la congélation (première étape de la lyophilisation). Chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, certaines colonies issues de bactéries ayant résisté à un premier cycle de dessiccation semble plus tolérantes, après subculture, à un deuxième cycle de déshydratation (NECASEK *et al.*, 1993).

#### **b- Influence de la concentration cellulaire initiale sur la survie de *R. meliloti* RCR 2011**

Dans nos conditions, une concentration de  $2 \times 10^9$  cellules/ml aboutit à la formation de 1 à 2 couches de cellules par filtre. Afin de détecter un éventuel effet protecteur, trois concentrations cellulaires initiales ( $4,1 \times 10^9$ ;  $3,9 \times 10^8$  et  $4 \times 10^7$  cellules/ml) ont été testées à des H.R.(s) de 43% et de 3% (Figure 19).



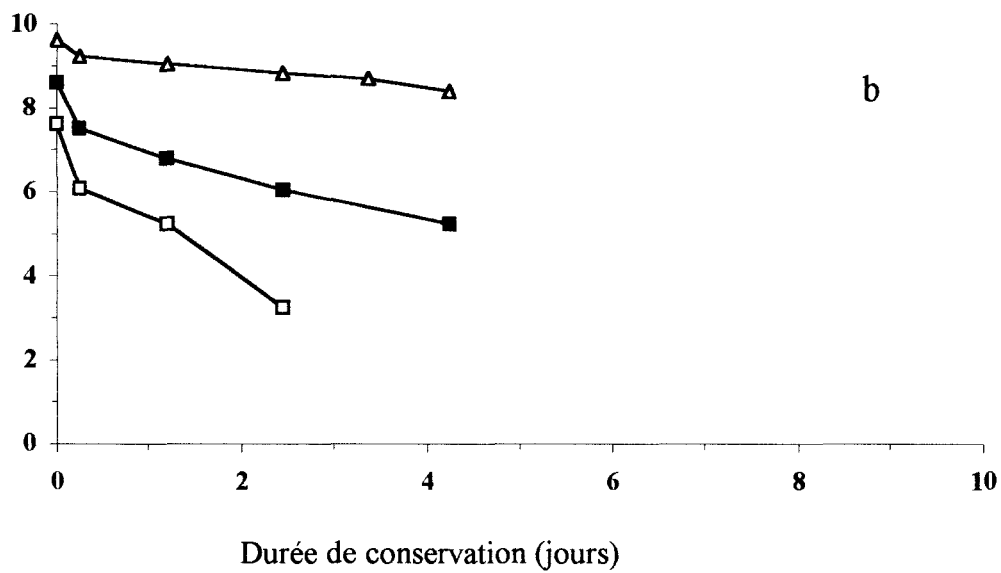
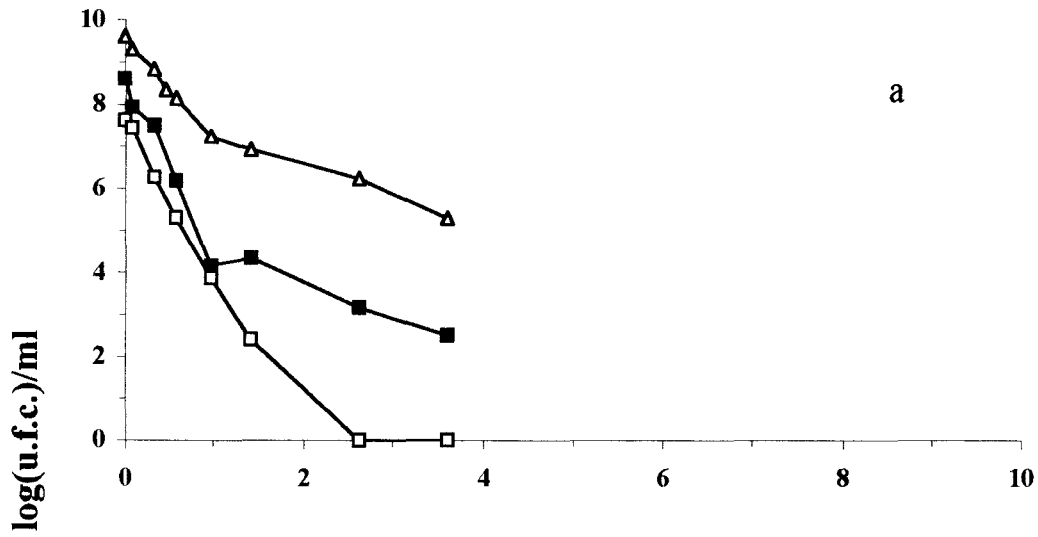


**Figure 18:** Effet d'un double cycle de déshydratation-conservation ( $\Delta$ : premier cycle,  $\blacksquare$ : deuxième cycle) à 3% d'H.R. (a) et 43% d'H.R. (b) sur les taux de survie de *R. meliloti* RCR 2011.

Les fréquences d'apparition d'une population théoriquement plus tolérante, déterminées aux points de rupture de pente et pour une concentration initiale de  $3,9 \times 10^8$  bactéries/ml (obtention d'une couche unique de cellules sur le filtre), sont de l'ordre de  $3,7 \times 10^{-5}$  à 3% et de  $8,3 \times 10^{-2}$  à 43% d'H.R.

Les résultats obtenus pour une concentration initiale de  $4,1 \times 10^9$  bactéries/ml montrent l'existence d'un effet protecteur. Ces observations sont en accord avec de nombreux travaux réalisés à basses H.R. (s) (DYE, 1982; OCHIN, 1983; MARY *et al.* 1993; FU et ETZEL, 1995). Cependant, à H.R.(s) plus élevées ( $\geq 75\%$ ), la concentration cellulaire initiale semble sans influence sur la survie lors de la conservation (ZECHMAN et CASIDA, 1982; MARY *et al.*, 1993; MAWDSLEY et BURNS, 1994). Pour une concentration initiale de  $4 \times 10^7$  bactéries/ml, nous ne pouvons pas mettre en évidence de phénomène biphasique à 3% d'H.R. Par contre, à 43%, ce mécanisme semble exister bien qu'il apparaisse moins efficace.

Le phénomène de décroissance biphasique pourrait donc s'expliquer, du moins en partie, par un effet protecteur des cellules mortes. Cet aspect biphasique pourrait également s'interpréter par un retrait très lent de l'eau liée et de ce fait les véritables temps d'équilibre seraient alors considérablement augmentés. La première phase de décroissance correspondrait alors à la mortalité de *R. meliloti* au cours de la dessiccation. Cette interprétation paraît peu probable, en effet, BUSHBY et MARSHALL (1977 c) ont démontré l'absence de résistance au passage des molécules d'eau chez les différents genres de la famille des *Rhizobiaceae*.



**Figure 19:** Influence de la concentration cellulaire initiale ( $\Delta$ :  $4,1 \times 10^9$ ;  $\blacksquare$ :  $3,9 \times 10^8$  et  $\square$ :  $4 \times 10^7$ ) sur la survie de *R. meliloti* RCR 2011 lors d'une conservation à 3% d'H.R. (a) et 43% (b) d'H.R..

## **B- Recherche d'une corrélation avec les degrés d'insaturation**

### **1- Degré d'insaturation juste après dessiccation et cinétiques de survie durant la conservation de cellules de (brady)rhizobia à différentes H.R.(s)**

Quelles que soient les phases de croissance et les H.R.(s) testées, *Rhizobium meliloti* diminue de manière significative le degré d'insaturation de ces A.G.(s) pendant la dessiccation. Cependant, pour une phase de croissance donnée, les degrés d'insaturation observés aux différentes H.R.(s) après dessiccation ne sont pas statistiquement différents alors que les taux de survie en conservation à ces H.R.(s) sont radicalement différents.

Chez les deux souches de bradyrhizobia, les degrés d'insaturation après dessiccation à 83% d'H.R. sont généralement plus élevés que ceux observés aux autres H.R.(s) testés. Dans la majorité de ces cas, ils ne sont même pas significativement différents des témoins non déshydratés. Cette situation s'accompagne de taux de survie très faibles au cours de la conservation à cette H.R.. Cependant, les cellules de *B. elkanii* prélevées en phase stationnaire et de *B. japonicum* prélevées en phase exponentielle de croissance n'adaptent pas du tout leurs degrés d'insaturation après dessiccation à différentes H.R.(s) mais ne sont pas parmi les cellules les plus sensibles à la conservation.

Chez *B. japonicum* 3-2, les degrés d'insaturation les plus faibles sont observés pour les cellules prélevées en fin phase de latence et ces cellules semblent généralement mieux tolérer la conservation aux différentes H.R.(s). Par contre, les cellules de *B. elkanii* USDA 120 prélevées en phase stationnaire présentent les degrés les plus faibles mais les taux de survie en conservation ne sont pas les plus élevés.

Il ne semble donc pas exister de corrélation étroite entre les degrés d'insaturation et les taux de survie lors de la conservation. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de ZIKMANIS *et al.* (1982).

Lors de la dessiccation et la conservation les cellules modifient la structure de leurs A.G.(s) membranaires, en s'opposant dans un premier temps aux pertes d'eau par une diminution de la fluidité membranaire (en terme de degré d'insaturation). Ces changements sont principalement dus à l'apparition des A.G.(s) saturés à courte chaîne carbonée, symboles chez certaines espèces de l'apparition des cellules viables mais non cultivables (LINDER et OLIVER, 1994). Une diminution de la somme des pourcentages des C18:1w7c et C19:0 cyclo est également enregistrée.

On peut aussi évoquer, une protection des liaisons *cis* des A.G.(s) insaturés, par la conversion en leurs isomères cycliques qui s'effectue aux H.R.(s) les plus élevées ( $\geq 68\%$ ). Ces acides gras portant un cyclopropane sont considérés comme des témoins de stress nutritionnel et/ou de dessiccation (GUCKERT *et al.*, 1986; KIEFT *et al.*, 1994). D'autre part, ce mécanisme de conversion protégerait la double liaison des phénomènes d'oxydation. Récemment, TEIXEIRA *et al.* (1996) ont suggéré que la chute du degré d'insaturation des A.G.(s) de *Lactobacillus bulgaricus* est liée à un mécanisme d'oxydation. Cependant, aucune preuve tangible n'a jamais été apportée tout au moins « *in vivo* » (GROGAN et CRONAN, 1986). Il est remarquable qu'aux H.R.(s) où les effets néfastes de l'oxygène se font théoriquement le plus sentir, c'est à dire 43, 22 et surtout 3%, nous n'avons observé aucune différence entre les pourcentages de 19:0 cyclo juste après dessiccation et ceux des témoins non déshydratés.

KIEFT *et al.* (1994) précisent que *Pseudomonas aureofaciens* modifie la fluidité de sa membrane par diminution du degré d'insaturation mais également en convertissant les A.G.(s) *cis* en leurs isomères *trans*. Ce mécanisme post-biosynthétique permet de modifier la structure des A.G.(s) membranaires même dans des conditions de privation nutritionnelle (GUCKERT *et al.*, 1986). Leurs structures se rapprochent de celles des A.G.(s) saturés et leurs confèrent la même propriété physique, à savoir une réduction du volume des phospholipides. Ceci se traduit par un changement de la fluidité membranaire (DIEFENBACH *et*

*al.*, 1992). Ces A.G.(s) en configuration *trans* n'ont pas été détectés au cours de notre étude.

L'expression des A.G.(s) sous forme de degré d'insaturation est certainement un bon paramètre pour exprimer l'état membranaire en terme de fluidité, mais les propriétés physiques dépendent aussi des groupements polaires des phospholipides. En effet, la déshydratation entraîne un « compactage » des têtes polaires des phospholipides. Ce phénomène augmente les interactions de type VAN DER WAALS entre les chaînes d'acides gras. Cette interaction conduit à un changement de phase qui consiste en un passage de l'état liquide cristallin à l'état de gel. Lors de la réhydratation des fuites membranaires se produisent au cours du retour à l'état liquide cristallin.

Dans certaines conditions, la dessiccation ne conduit pas à la formation d'un état de gel mais à une forme intermédiaire appelée phase hexagonale (LESLIE *et al.*, 1995). Dans ce cas, les groupements polaires sont internes et les chaînes d'acides gras sont tournées vers l'extérieur. Il existe alors, des zones de fragilité membranaire qui pourraient expliquer les fuites et la perméabilité croissante de la membrane.

La formation de la phase hexagonale (HII) est observée quand les phospholipides possèdent de petites têtes polaires et concerne principalement la phosphatidyléthanolamine (P.E.) (LESLIE *et al.*, 1995). Chez un mutant de *Escherichia coli*, incapable de synthétiser de P.E., la proportion du cardiolipine est supérieur à celle observé chez la souche sauvage, et la croissance nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ . L'ensemble  $Mg^{2+}$ - ou  $Ca^{2+}$ -cardiolipine exerce le même rôle que la P.E. et facilite la formation de phases hexagonales (RIETVELD *et al.*, 1993). Dans ce cas la formation de la phase HII facilite les échanges avec le milieu de culture mais se révèle néfaste lors de la dessiccation et la réhydratation. *Bradyrhizobium japonicum* et *R. meliloti* présentent une composition en lipides membranaires différente (MILLER *et al.*, 1990) ce qui pourrait expliquer leurs sensibilités différentes vis à vis de la dessiccation et la conservation.

Le rôle protecteur du tréhalose lors de la dessiccation (cf. Généralités VII-2) est lié à son caractère hydrophile (ses groupements hydroxyles remplacent les molécules d'eau). Il s'intercale entre les têtes polaires des phospholipides (ELEUTHERIO *et al.*, 1993), et évite donc les chocs hydriques lors d'une réhydratation massive (FABRIE *et al.*, 1994). Le tréhalose peut aussi agir au niveau de la température de transition, qui reflète le passage de l'état de gel à l'état de liquide cristallin. En effet, la déshydratation des souches d'*E. coli* entraîne une chute de cette température de 40°C. Dans ce cas l'addition de tréhalose avant la dessiccation maintient cette température voisine de celle observée chez les cellules hydratées (LESLIE *et al.*, 1995). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la température de transition varie avec l'âge physiologique des cultures, et elle est fortement influencée par la synthèse du tréhalose en phase stationnaire (LESLIE *et al.*, 1994). Cette phase de croissance coïncide également avec la conversion du phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine (CRONAN et ROCK, 1987).

Les hopanoides détectés chez toutes les espèces de *Bradyrhizobium* et absents chez les *Rhizobium* (KANNENBERG *et al.*, 1995) pourraient être impliqués dans la stabilité de la membrane lors de la dessiccation. La structure de ces hopanoides ressemble en effet à celle des stérols. Ces derniers ont la propriété de s'intercaler entre les phospholipides en maintenant les phases gels plus fluides et les phases liquide cristallin plus rigide (JAHNKE, 1992; LESLIE *et al.*, 1994).

## **2- Evolution des degrés d'insaturation après quarante jours de conservation à différentes H.R.(s)**

Récemment, TEIXEIRA *et al.* (1996) ont démontré que la chute du degré d'insaturation des A.G.(s) de *Lactobacillus bulgaricus*, après 49 jours de conservation, est concomitante de la perte très importante de la viabilité de ce micro-organisme.

Nous avons donc déterminé les degrés d'insaturation après 40 jours de conservation à différentes H.R.(s). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 31.

Après 40 jours de conservation, les degrés d'insaturation des A.G.(s) de *R. meliloti* RCR 2011 ont tendance à augmenter pour les cellules prélevées en fin de phase de latence. La même tendance est observée en phase exponentielle de croissance bien que l'augmentation soit moins marquée et probablement à la limite du significatif. A l'inverse, les cellules prélevées en phase stationnaire de croissance diminuent ce degré d'insaturation après 40 jours (à l'exception des cellules conservées à 3% d'H.R.).

*Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 pris en fin de phase de latence et surtout en phase exponentielle de croissance, augmente son degré d'insaturation et le diminue lorsqu'il est prélevé en phase stationnaire.

*Bradyrhizobium japonicum* 3-2 diminue fortement son degré d'insaturation des A.G.(s) après 40 jours quelles que soient les phases de prélèvement et les H.R.(s) de conservation.

Encore une fois, il ne semble pas exister de corrélation très nette entre l'évolution du degré d'insaturation pendant la conservation et les taux de survie. Cependant, chez *B. japonicum* 3-2, une diminution significative des degrés d'insaturation est observée et cette souche est considérée comme sensible à la dessiccation (notamment à 3, 22 et 43% d'H.R.). Ce résultat semble en accord avec les travaux de TEIXEIRA *et al.* (1996).



**Tableau 31:** Evolution des degrés d'insaturation après 40 jours de conservation à différentes H.R.(s). Comparaison avec les degrés d'insaturation observés juste après dessiccation

Souche	Phase de croissance	Temps de conservation	Humidité Relative				
			3%	22%	43%	68%	83%
<i>R. meliloti</i> R.C.R 2011	Fin de phase de latence	0 jours	3,17	2,97	2,72	3,33	2,83
		40 jours	ND	3,77	3,58	4,12	3,80
	Phase Exponentielle	0 jours	2,97	3,76	3,05	3,04	3,05
		40jours	3,73	3,9	3,28	3,48	2,33
	Phase stationnaire tardive	0 jours	2,75	3,11	3,40	3,69	2,70
		40jours	3,67	ND	2,8	3,21	2,84
<i>B. elkanii</i> U.S.D.A. 120	Fin de phase de latence	0 jours	3,99	3,59	3,44	4,19	4,46
		40 jours	ND	3,93	3,89	4,93	3,61
	Phase Exponentielle	0 jours	3,92	3,22	4,21	4,84	4,40
		40jours	4,13	4,36	3,99	5,45	4,27
	Phase stationnaire tardive	0 jours	3,51	3,57	3,36	3,44	3,74
		40jours	2,65	2,67	2,84	2,10	2,54
<i>B. japonicum</i> 3-2	Fin de phase de latence	0 jours	1,32	0,90	1,40	2,08	3,08
		40 jours	ND	0,54	0,45	1,08	0,91
	Phase Exponentielle	0 jours	5,44	5,01	5,55	5,76	5,28
		40jours	3,09	4,28	4,38	5,16	3,3
	Phase stationnaire tardive	0 jours	2,44	2,30	2,56	2,49	3,68
		40jours	0,32	0,65	1,99	0,49	ND

ND: Non Déterminé.

## VI- ETUDE DES DEGATS CELLULAIRES APRES DESSICCATION ET CONSERVATION

### 1- Appréciation des taux de survie par la mobilité bactérienne

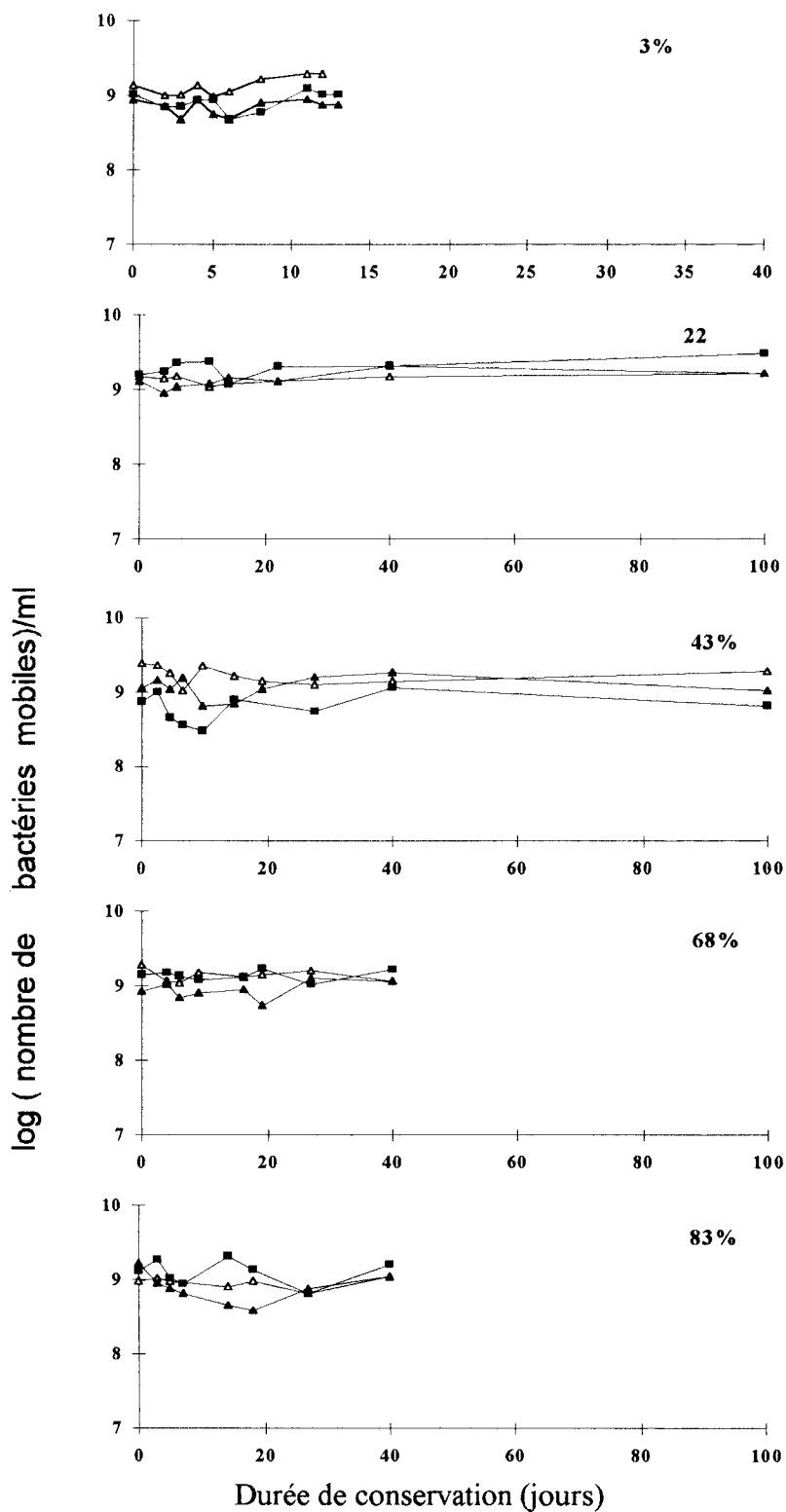
Actuellement d'autres méthodes, plus rapides que la numération, sont utilisées pour déterminer l'impact de certains stress. Nous pouvons citer l'exemple de la détermination de l'acidification du milieu de culture chez *Lactococcus lactis* (FU et ETZEL, 1995), *Lactobacillus bulgaricus* (TEIXEIRA *et al.*, 1995a) ou l'utilisation de fluorochromes couplés à l'utilisation du microscope à épifluorescence (cf. Généralités IV-5). TSUCHIDO *et al.* (1994), apprécie la viabilité ou l'intensité des dégâts chez *Bacillus subtilis* par l'analyse de la mobilité de ce micro-organisme.

Après conservation aux différentes H.R.(s), les filtres sont repris dans le T.N.P.. Une partie de la suspension est diluée et observée sous microscope. Le dénombrement des cellules est réalisé à l'aide d'une cellule de THOMA. Les résultats sont exprimés en logarithme décimal du nombre de bactéries mobiles en fonction du temps de conservation (figure 20, 21 et 22). Cette méthode d'appréciation de la mobilité correspond à une adaptation très simple du protocole utilisé par TSUCHIDO *et al.* (1994).

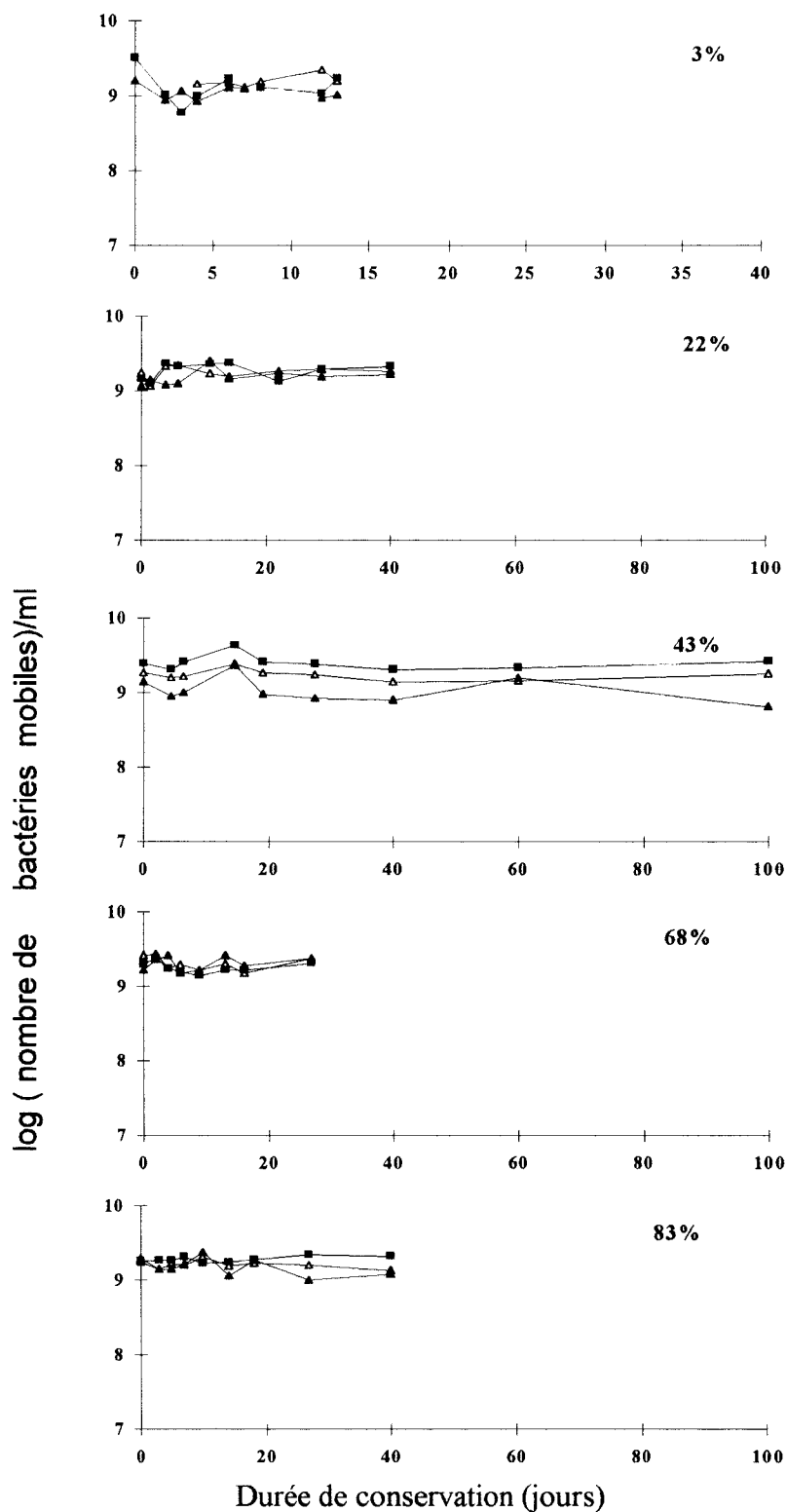
L'analyse de ces résultats nous permet de préciser un certain nombre de points:

Les taux de survie observés lors des dénombrements sur milieu gélosé sont considérablement inférieurs à ceux appréciés par la mobilité bactérienne. Par exemple, après 40 jours de conservation *B. elkanii* et surtout *B. japonicum* ne présentent pratiquement aucune cellule viable et cultivable alors que neuf unités logarithmiques de bactéries mobiles sont encore observés. La perte de la faculté des bactéries à former des colonies macroscopiquement visibles après les stress de dessiccation ne nous permet donc pas de considérer ces bactéries comme mortes.

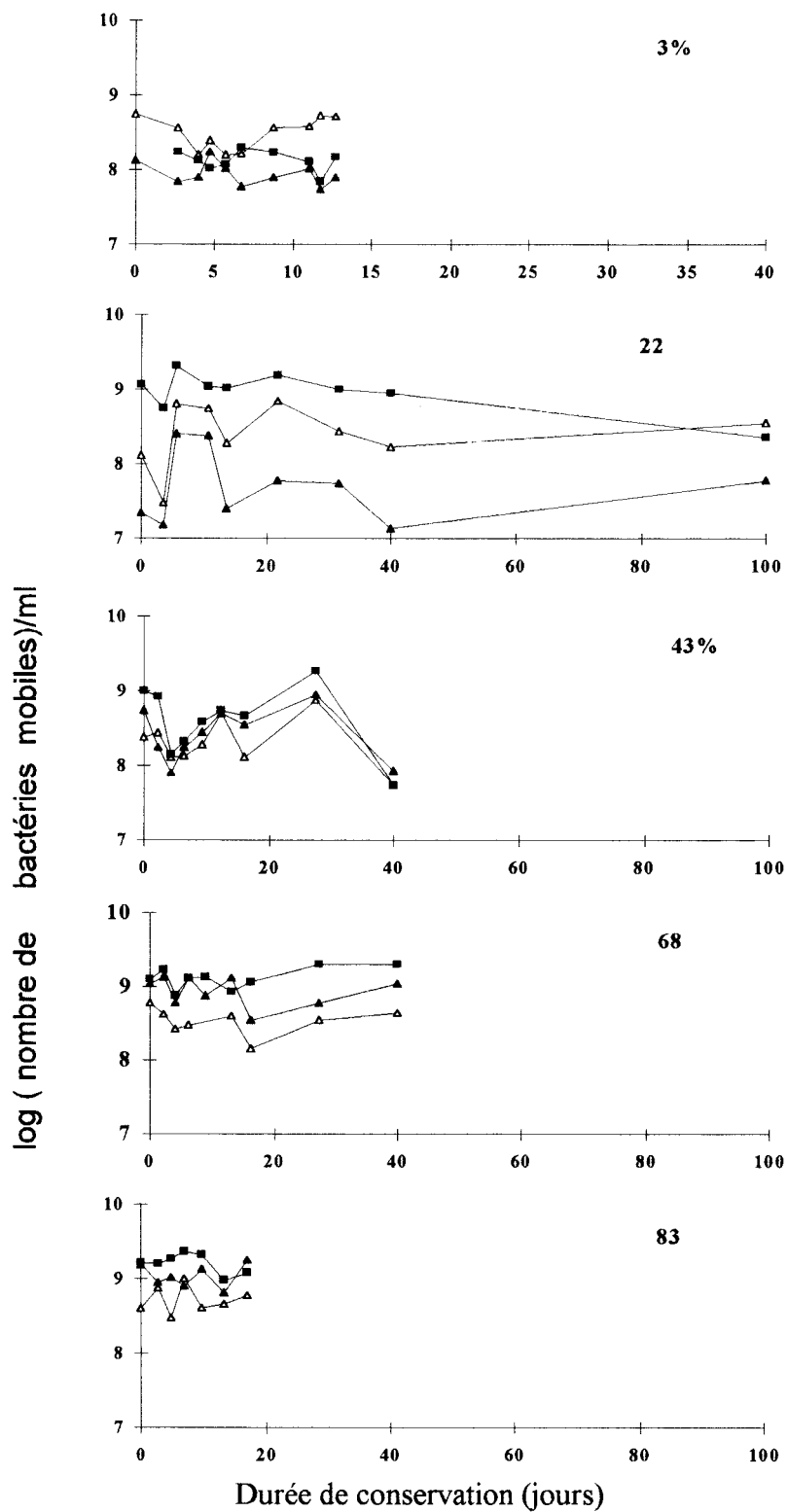
Encore une fois *B. japonicum* 3-2 apparaît plus sensible que les deux autres souches testées (fig. 22).



**Figure 20** : Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de *Rhizobium meliloti* RCR 2011 (▲: fin de phase de latence; ■: phase exponentielle et △: phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.



**Figure 21** : Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 (▲: fin de phase de latence; ■: phase exponentielle et △: phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.



**Figure 22 :** Taux de survie, appréciés par la mobilité bactérienne, après conservation de *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 (▲: fin de phase de latence; ■: phase exponentielle et △: phase stationnaire tardive) aux Humidités Relatives 3, 22, 43, 68 et 83%.

La présence de bactéries intactes et dotées d'une mobilité nous permet d'affirmer que la lyse bactérienne lors de la réhydratation n'est pas la cause principale de la mortalité même si les dégâts subis au niveau de la membrane bactérienne sont fortement plausibles (BUSHBY et MARSHALL, 1977b; SALEMA *et al.*, 1982; LIEVENSE *et al.*, 1994).

L'existence de cellules viables mais non cultivables a déjà été démontrée après dessiccation d'*Alcaligenes eutrophus* et d'*Enterobacter cloacae* sous 10% d'H.R (PEDERSEN et JACOBSEN, 1993) et suggérée chez *Pseudomonas aureofaciens* et *Arthrobacter protophormiae* après dessiccation sous 90% d'H.R. (KIEFT *et al.*, 1994). WILSON et LINDOW n'ont cependant pas détecté ce phénomène chez *Pseudomonas syringae* après dessiccation sous 45-50% d'H.R.

## **2- Etude des dégâts cellulaires en microscopie électronique à balayage**

L'absence de lyses extensives des cellules déshydratées puis réhydratées a été recherchée en microscopie électronique.

*Rhizobium meliloti* RCR 2011 et *B. japonicum* 3-2 ont été retenus au cours de cette étude sur les effets des conservations (50 jours) à 3 et 83% d'H.R.(s). Deux échantillons ont été préparés par type de traitement; l'un est fixé directement (cellules déshydratées) et l'autre est réhydraté avant fixation (cellules réhydratées).

Les observations réalisées (Photographies I à VI) nous permettent d'émettre quelques hypothèses:

La dessiccation en elle même, quelle que soit l'H.R., n'affecte pas grandement la morphologie générale de la bactérie (Photographies Ia et Ib, IIIa et IIIb, Va et VIa). Notons cependant, la présence discrète de matériel non identifié à la surface des bactéries (pouvant être des débris cellulaires, des exopolysaccharides résiduels, ou peut être des artefacts). Chez *B. japonicum* conservé à 3% d'H.R. (Photographies IIIa et IIIb), de petites plages indifférenciées d'exopolysaccharides ou de polysaccharides

capsulaires résiduels sont fréquemment observés et pourraient rendre compte des résultats obtenus juste après dessiccation (cf. Résultats III-2-b).

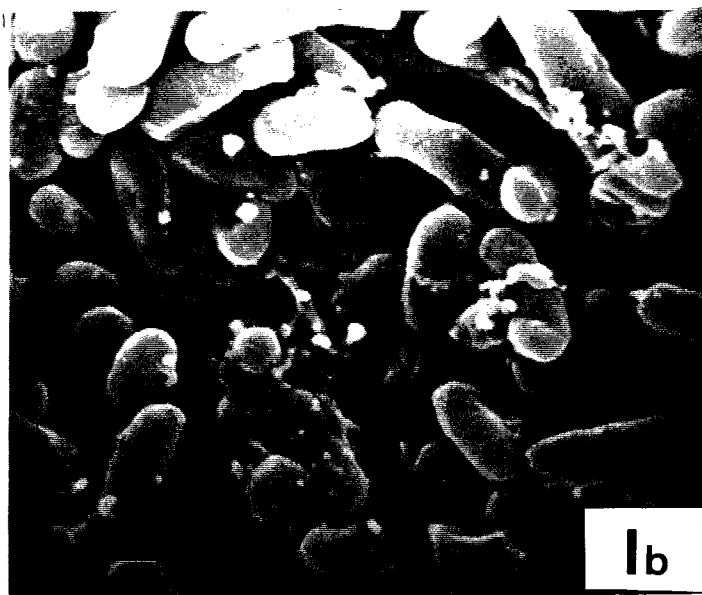
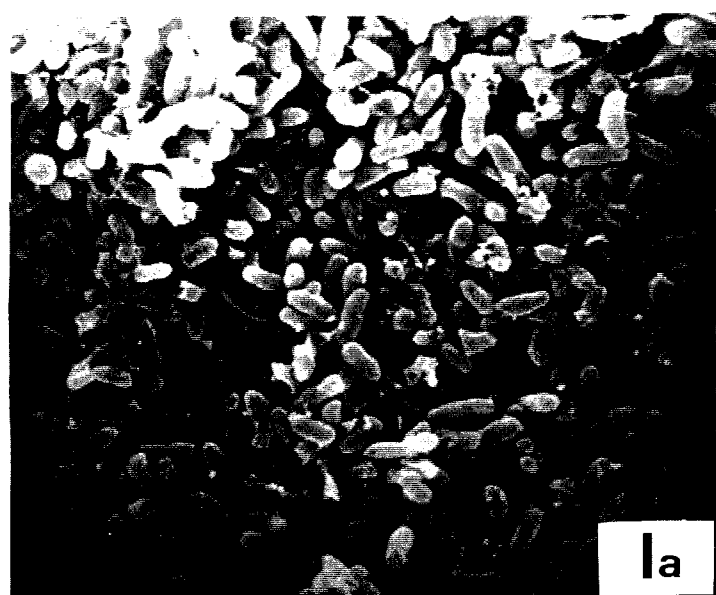
La réhydratation des échantillons induit des changements morphologiques importants chez ces deux genres bactériens:

\* l'apparition quasi constante de matériel indifférencié ou sous forme sphérique (qui sont probablement des débris cellulaires) lors de la réhydratation de *R. meliloti* conservé à 3% d'H.R. (Photographies IIa et IIb). Les corps bactériens intacts semblent moins nombreux (réduction de moitié) que dans le cas précédent.

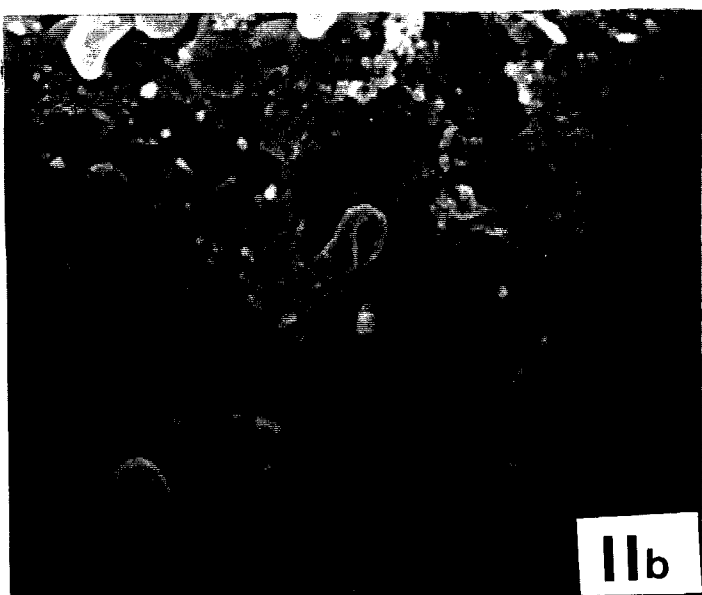
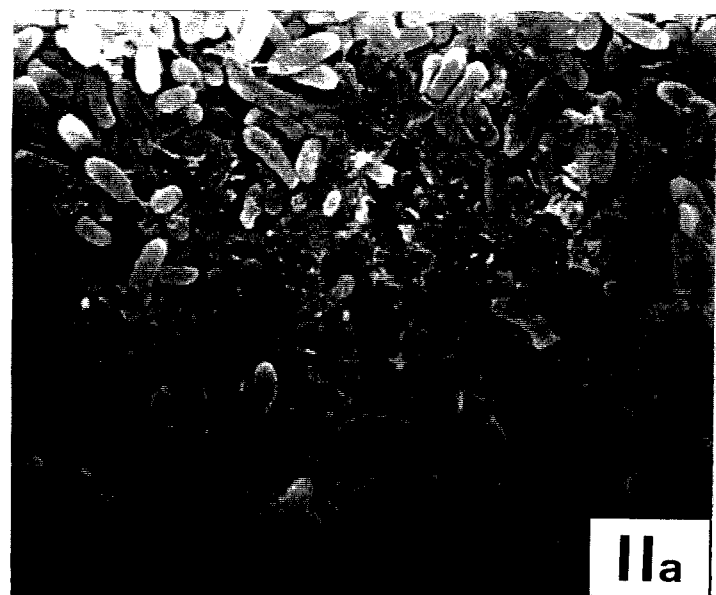
\* l'apparition de nombreux « bourgeonnements » à la surface des bactéries (fuite de matériels intracellulaires ?) lors de la réhydratation de *B. japonicum* conservé à 3% d'H.R. (Photographies IVa et IVb).

\* après réhydratation de *R. meliloti* et *B. japonicum* conservés à 83% d'H.R., nous pouvons observer des cellules ayant tendance à occuper le maximum d'espace disponible (léger gonflement probablement consécutif à un choc hypoosmotique) et présentant quelques « bourgeonnements » (Photographie Vb et Vc; VIb et VIc).

La dessiccation, en elle-même n'affecte donc pas directement la morphologie bactérienne mais fragilise les structures bactériennes (peptidoglycane, membrane externe...). La réhydratation (choc hypoosmotique) conduit à la lyse de quelques cellules fragilisées ou à la fuite de matériels intracellulaires. Ces observations sont conformes à celles de SALEMA *et al.* (1982). La fuite de matériel intracellulaire après réhydratation de cellules a par ailleurs, été démontrée chez *Rhizobium* (BUSHBY et MARSHALL, 1977 b) et chez *Lactobacillus plantarum* (LIEVENSE *et al.*, 1994).

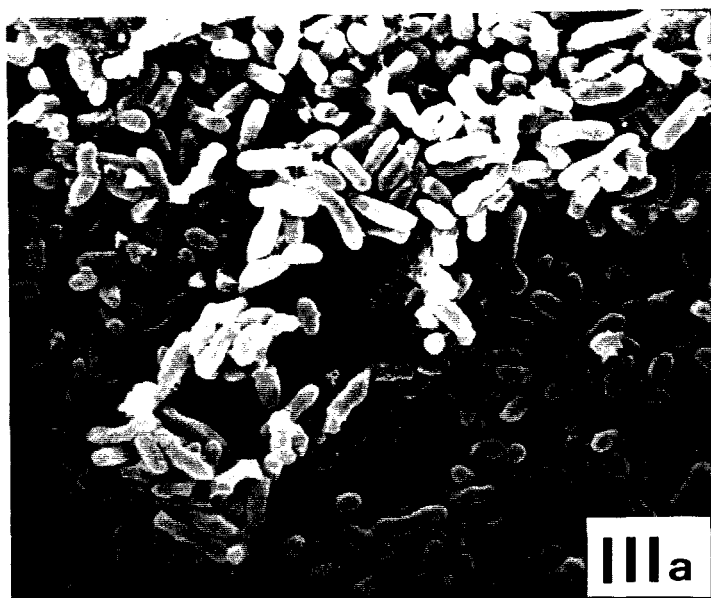


**Photographies Ia et Ib:** *Rhizobium meliloti* RCR 2011 conservé à 3% d'H.R. avant réhydratation (a: x 7700; b: 23100). Les barres représentent 1 µm

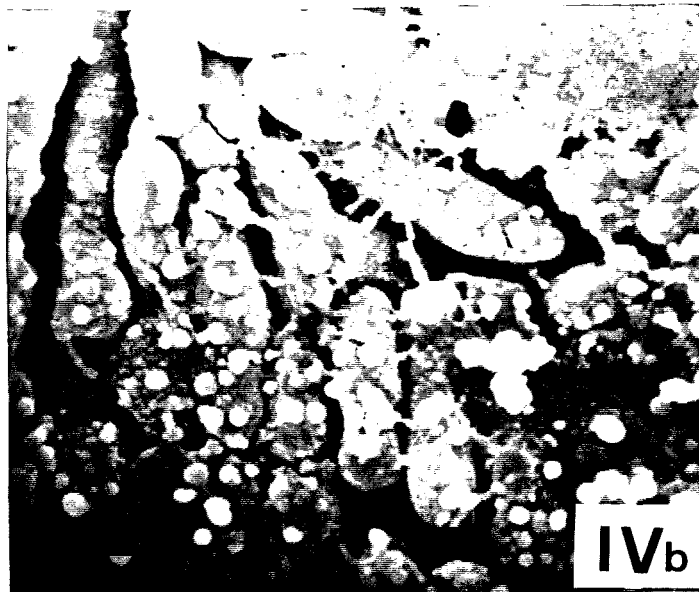
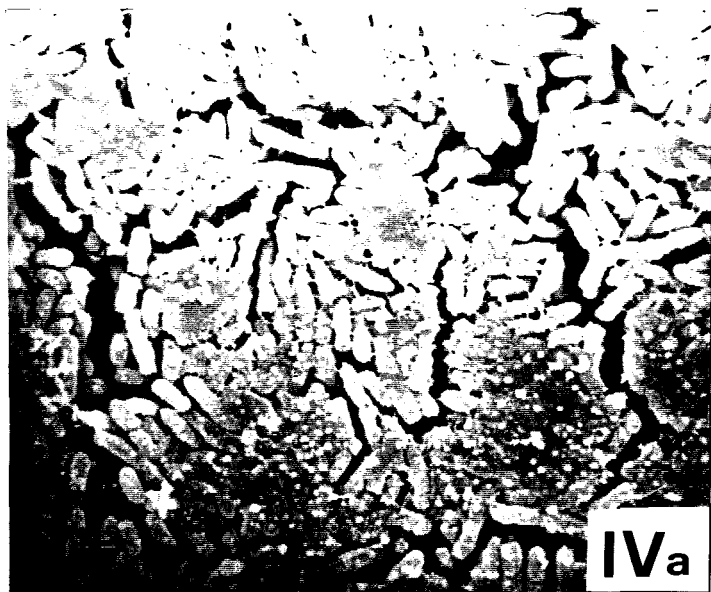


**Photographies IIa et IIb:** *Rhizobium meliloti* RCR 2011 conservé à 3% d'H.R. après réhydratation (a: x 7700; b: x 23100). Les barres représentent 1 µm





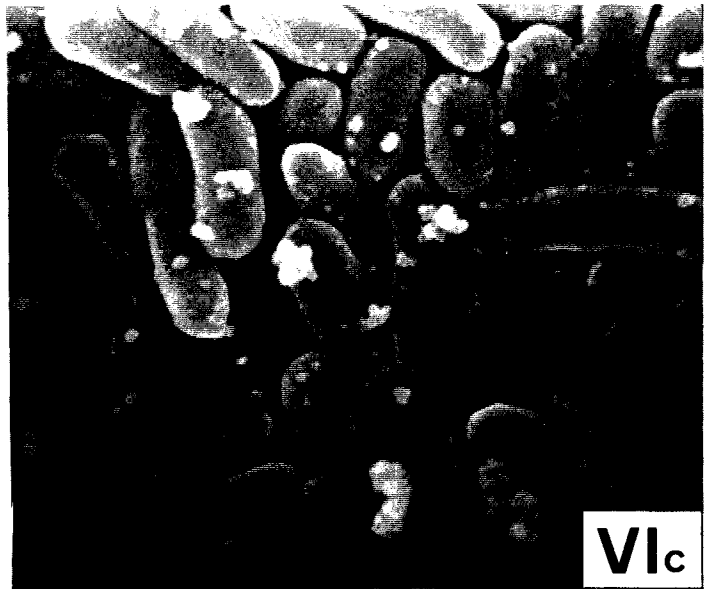
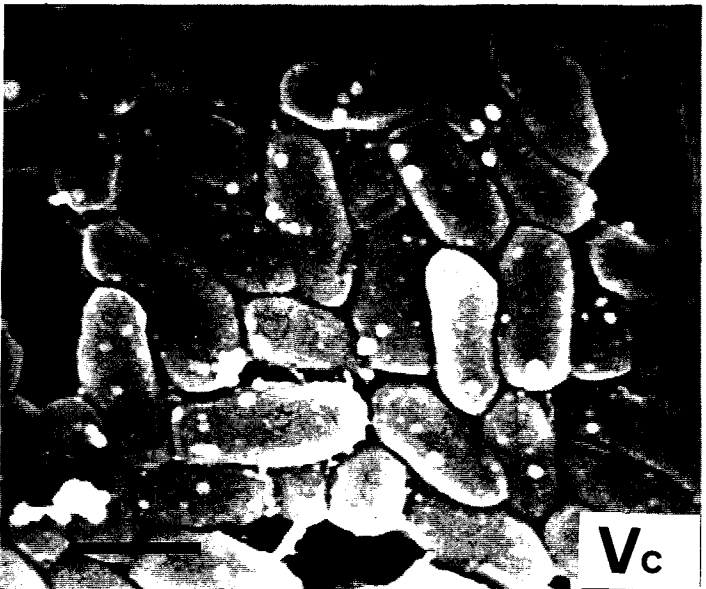
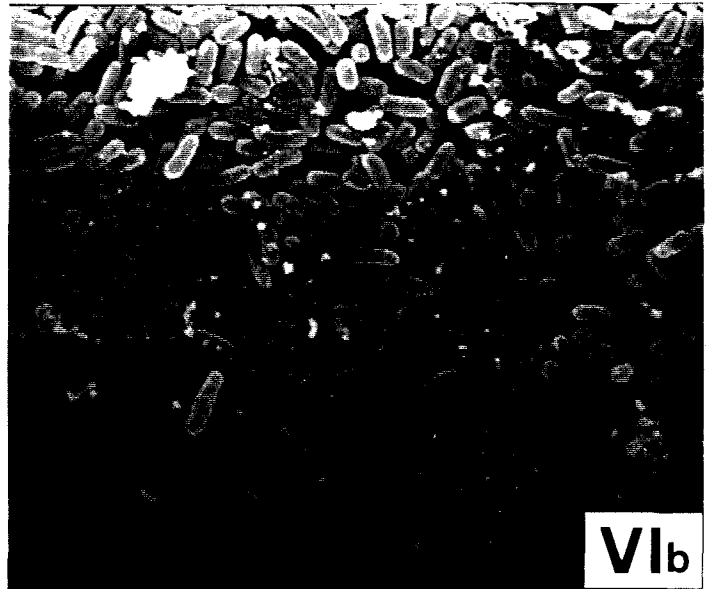
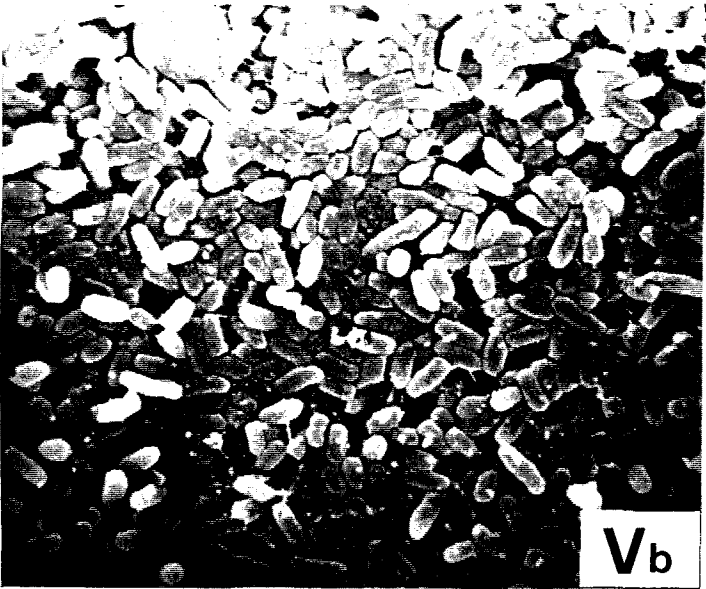
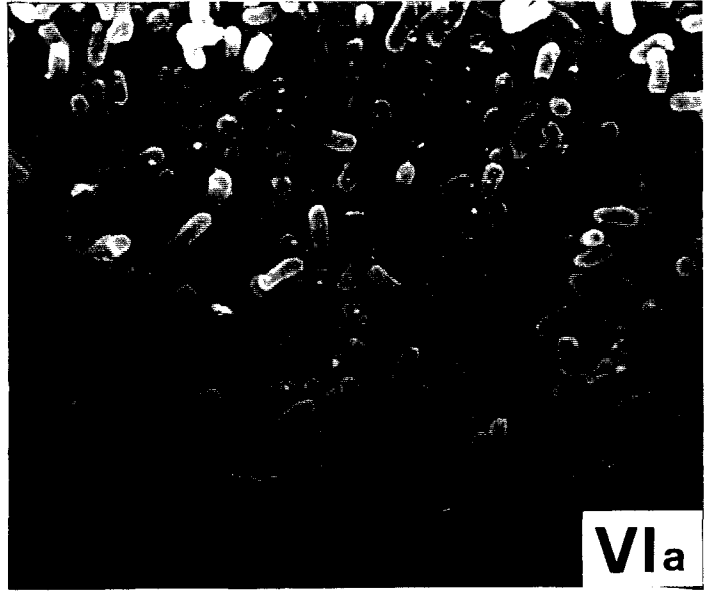
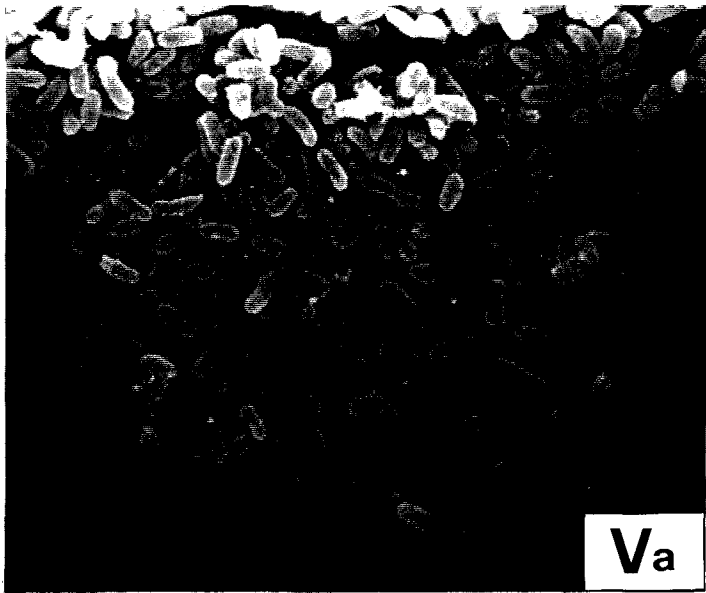
**Photographies IIIa et IIIb:** *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 conservé à 3% d'H.R. avant réhydratation (a: x 7700; b: x 30800). Les barres représentent 1  $\mu\text{m}$



**Photographies IVa et IVb:** *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 conservé à 3% d'H.R. après réhydratation (a: x 7700; b: x 30800). Les barres représentent 1  $\mu\text{m}$

**Photographies Va, Vb et Vc:** *Rhizobium meliloti* RCR 2011 conservé à 83% d'H.R. avant (a: x 7700) et après réhydratation (b: x 7700; c: x 30800). Les barres représentent 1  $\mu\text{m}$

**Photographies VIa, VIb et VIc:** *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 conservé à 83% d'H.R. avant (a: x 7700) et après réhydratation (b: x 7700; c: x 30800). Les barres représentent 1  $\mu\text{m}$



Ces observations préliminaires devront être confirmées, étudiées à d'autres H.R.(s) et affinées. Il est évident qu'une réhydratation ménagée dans une enceinte à environ 100% d'H.R. ou une réhydratation avec des solutions hypertoniques, seraient des procédés à employer pour sauvegarder le mieux possible l'intégrité des cellules.

### **3- Etude de la nodulation des cellules réhydratées issues d'échantillons de *Rhizobium meliloti* conservés quarante jours à différentes H.R.(s)**

Des tests de nodulation ont été réalisés sur des plantules de Luzerne inoculées par des dilutions ( $10^{-6}$ ) ne contenant plus, théoriquement de cellules de *R. meliloti* RCR 2011 capables de former des colonies après 40 jours de conservation aux différentes H.R.(s) (sauf à 83% d'H.R.). Des numérations sont effectuées de manière à déterminer l'absence de cellules viables et cultivables. Ces expériences ont été réalisées afin d'apprécier si des cellules viables mais non cultivables ( $\cong 10^3$  bactéries à la dilution  $-6$ ) sont encore en mesure de noduler leur hôte.

Sur l'ensemble des résultats, on constate seulement trois cas de nodulation, à 22 et 83% d'H.R. pour les cellules issues de la fin de phase de latence, et à 22% d'H.R. quand elles proviennent de la phase exponentielle de croissance. Le nombre de nodules reste faible ( $\cong 5$  nodules/ plante). Aucune nodulation n'a été observée pour les échantillons conservés à 83% d'H.R. alors que  $1 \times 10^6$  et  $7,5 \times 10^2$  cellules viables et cultivables sont enregistrées pour les échantillons de cellules prélevées en fin de phase de latence et phase exponentielle de croissance respectivement.

Les cellules viables mais non cultivables ne sont donc plus en mesure de noduler leur hôte végétal. Nos résultats sont en accord avec les travaux de BOTTOMLEY et DUGHRI (1989) et de BOTTOMLEY et MAGGARD (1990) réalisés sur des cellules viables mais non cultivables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* présentes dans les sols. Des pertes de l'aptitude à noduler pendant la conservation de cellules non protégées de

*Bradyrhizobium japonicum* (DOMMERGUES *et al.*, 1979; MARY *et al.*, 1994) et *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (NECASEK *et al.*, 1993) ont déjà été rapportées.

A l'inverse, les stress de dessiccation en présence d'un support protecteur ne semble pas affecter l'infectivité des cellules de (brady)rhizobia (DYE, 1982; KREMER et PETERSON, 1983; MARY *et al.*, 1993).

## **VII- DETERMINATION DES DEGRES D'INSATURATION APRES CULTURE DES (BRADY)RHIZOBIA A $A_w(S)$ REDUITES**

Nous avons étudié, la croissance des (brady)rhizobia dans des milieux liquides de faibles  $a_w(s)$  (0,969 à 0,999) de manière à apprécier les effets de déshydratations osmotiques sur l'évolution des degrés d'insaturation.

### **1- Détermination des paramètres de croissance**

En raison de la sensibilité de *Bradyrhizobium elkanii* et de *Bradyrhizobium japonicum* aux composés ioniques (AL-RACHIDI *et al.*, 1982; MARY *et al.*, 1986; TULLY *et al.*, 1990; FUJIHARA et YONEMA, 1993) les diminutions d' $a_w$  des milieux de culture ont été réalisées par l'addition de glycérol. Chez *R. meliloti*, le chlorure de sodium a été utilisé de manière à se rapprocher des conditions naturelles.

La croissance des trois souches a été suivie par mesure de l'absorbance (toutes les 90 minutes) au biophotomètre. Les cinétiques observées en milieu liquide avec diverses valeurs d' $a_w$  ont été établies et comparées avec celles obtenues après modélisation. Le modèle de GOMPERTZ a été retenu au cours de notre étude. Les constantes de l'équation de GOMPERTZ sont déterminées à l'aide du logiciel de statistique STATITCF. Les dérivées première et secondaire de cette équation ont permis d'exprimer les paramètres de croissance (Phase de latence et taux de croissance maximal) en fonction de ces constantes. Les calculs ont été

effectués en s'inspirant des travaux de ZWIETERING *et al.*, (1990) et BUCHANAN (1993). Les résultats sont de la forme:

- Modèle de Gompertz reparamétré:  $\text{Ln}\left(\frac{N}{N_0}\right) = a \cdot e^{-(b/c) \cdot e^{(-c \cdot t)}}$

avec l'appréciation de la population bactérienne par l'absorbance (DO)

mesurée à une longueur d'onde de 600 nm:  $\frac{N}{N_0} = \frac{DO}{DO_i}$

- Le taux de croissance pour la phase exponentielle:  $\mu_{\max} = \frac{a \cdot c}{e}$  (en h<sup>-1</sup>)

- Le temps de génération pour la phase exponentielle:  $G = \frac{\text{Ln}2}{\mu_{\max}}$  (en h)

- La population maximale en phase stationnaire (N<sub>max</sub>) appréciée avec:

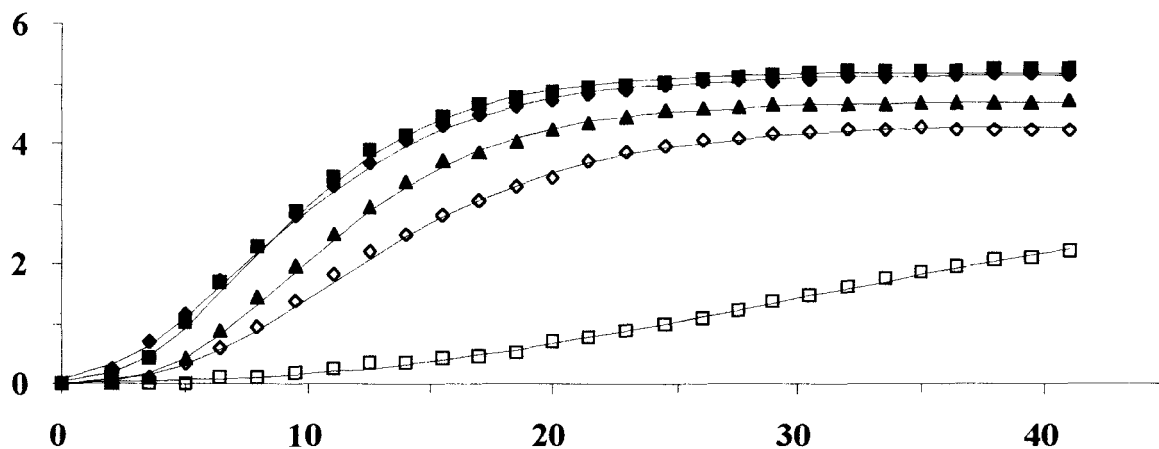
$$\text{Ln}DO_{\max} = a \text{ Ln}DO_i$$

- La durée de la phase de latence:  $\lambda = \frac{\text{Ln}(b/c) - 1 + a \cdot e^{-(b/c)}}{c}$  (en h)

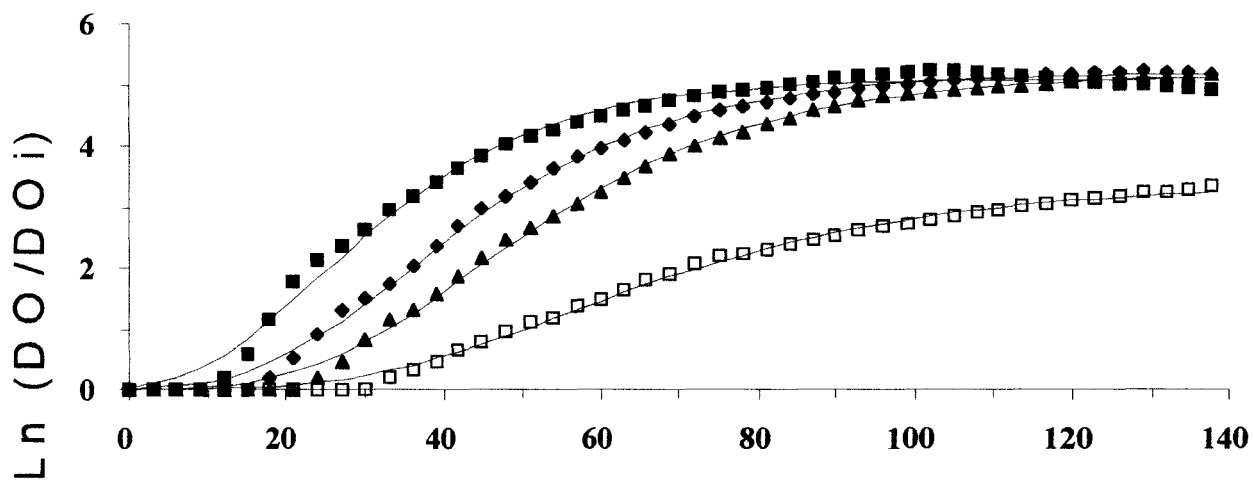
Comme nous le constatons d'après la formule de l'équation de Gompertz la valeur zéro (c.-à-d. N=N<sub>0</sub>) n'a de solution que quand la valeur temps tend vers l'infini, donc Ln(N/N<sub>0</sub>) doit être non nul. Le temps initial de croissance doit donc coïncider avec l'instant où le nombre N devient légèrement supérieur à N<sub>0</sub>, d'où les modifications apportées à l'expression de la phase de latence.

Le traitement des résultats par l'intermédiaire du logiciel STATITCF a permis de déterminer les constantes de l'équation de Gompertz pour chaque série de données. Les courbes obtenues sont reportées sur la figure 23. A l'exception de deux a<sub>w</sub> des milieux de culture (0,996 pour *B. elkanii* et 0,999 pour *B. japonicum*), les courbes de croissance décrites par le modèle passent par tous les points expérimentaux, ce qui signifie que les paramètres de croissance obtenus reflètent bien la réalité dans nos conditions d'étude.

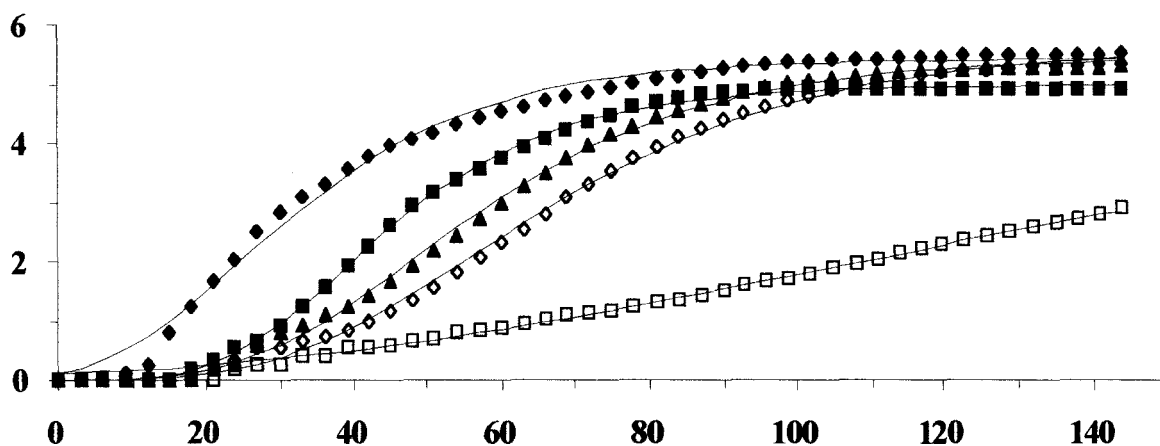
*Rhizobium meliloti* RCR 2011



*Bradyrhizobium elkanii* USDA 120



*Bradyrhizobium japonicum* 3-2



Temps (heures)

**Figure 23:** Modélisation des courbes de croissance sous différentes  $a_w$  à l'aide de l'équation de Gompertz (lignes continues) chez *Rhizobium meliloti* RCR 2011 (◆: 0.999, ■: 0.9928, ▲: 0.9866, ◇: 0.9804, et □: 0.969 d' $a_w$ ), *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 (◆: 0.999, ■: 0.996, ▲: 0.990, ◇: 0.984, □: 0.969).

Quelle que soit la souche étudiée, la diminution de l' $a_w$  du milieu de culture est fortement ressentie au niveau de la croissance. La sensibilité croissante de *R. meliloti* au cours de la diminution de l' $a_w$  du milieu de culture à déjà été signalée par MARY *et al.* (1986). Les différences observées pour les valeurs maximales de populations atteintes en phase stationnaire sont à mettre en relation avec la toxicité du NaCl.

Pour *B. elkanii* et *B. japonicum* la baisse de l' $a_w$  du milieu de culture entraîne les mêmes ralentissements de croissance. Cependant les valeurs maximales de densité bactérienne atteintes en phase stationnaire sont approximativement les mêmes: le glycérol utilisé pour abaisser l' $a_w$  ne présente donc pas d'effet toxique. Il faut noter qu'une  $a_w$  de 0,969 du milieu de culture inhibe très fortement la croissance pour toutes les souches étudiées.

Le tableau 32 rapporte les valeurs des paramètres de croissance obtenues à partir des constantes du modèle de GOMPERTZ ainsi que les résultats des corrélations ( $r^2$ ) entre les valeurs expérimentales et les valeurs du modèle. Pour toutes les croissances étudiées les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,99, ce qui signifie que le modèle se rapproche fortement des données expérimentales des courbes de croissance.

L'analyse de ces résultats permet d'apporter un certain nombre de renseignements:

La diminution de l' $a_w$  du milieu de culture entraîne en général une augmentation de la durée de la phase de latence. Seul *B. elkanii* présente une phase de latence paradoxalement plus courte sous une  $a_w$  de 0,996: il est difficile d'interpréter ce résultat qui demande à être confirmé par d'autres essais

Les taux de croissance maxima sont fonction de l' $a_w$  du milieu de culture: les valeurs de ces taux diminuent de façon appréciable lorsque les



**Tableau 32:** Paramètres de croissance de *Rhizobium meliloti* RCR 2011, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2. à différentes  $a_w$ : les valeurs sont établies à partir des équations modélisées de GOMPERTZ

Souches	$a_w$	Phase de latence en h	Taux de croissance ( $\mu$ ) en $h^{-1}$	Temps de génération (G) en h	DO <sub>max</sub>	$r^2$
<i>R. meliloti</i> RCR 2011	0,9990	2,60	0,38	1,84	1,74	0,9999
	0,9928	3,12	0,43	1,61	1,82	0,9997
	0,9866	4,50	0,37	1,89	1,11	0,9995
	0,9804	4,83	0,27	2,57	0,75	0,9997
	0,9690	12,32	0,08	8,76	0,40	0,9992
<i>B. elkanii</i> USDA 120	0,9990	16,25	0,10	6,86	1,83	0,9996
	0,9960	9,32	0,12	5,86	1,65	0,9989
	0,9900	22,39	0,09	7,62	1,78	0,9993
	0,9690	29,54	0,05	14,54	0,29	0,9990
<i>B. japonicum</i> 3-2	0,9990	8,59	0,11	6,26	2,25	0,9988
	0,9960	21,93	0,11	6,18	1,45	0,9998
	0,9900	25,67	0,09	7,62	2,32	0,9994
	0,9840	30,09	0,08	8,61	2,76	0,9995
	0,9690	38,14	0,03	27,38	2,25	0,9973

valeurs d' $a_w$  baissent dans le milieu de culture; ces valeurs du taux de croissance deviennent extrêmement faibles pour une  $a_w$  de 0,969 et une culture de cellules devient alors difficile à réaliser.

La période de la phase de latence est connue comme une étape d'adaptation des cellules à leur nouveau milieu de culture. Les cellules sont alors très sensibles aux stress osmotiques (LARSSON et GUSTAFSSON, 1993). BLOMBERG (1995) rapporte que lorsque *Saccharomyces* est soumis à une concentration d'environ 2 M en NaCl, cette phase peut durer plusieurs jours. Chez certaines espèces de *Rhizobium*, cette phase de latence est trois fois supérieure sous une concentration de 400 mM de NaCl (GHITTONI et BUENO (1995). L'augmentation de la pression osmotique chez *Saccharomyces* s'accompagne dans un premier temps d'une fuite d'eau qui entraîne une diminution du volume cellulaire (MARECHAL et GERVAIS, 1994, SKJERDAL *et al.*, 1995), ce qui conduit probablement à la stimulation de la synthèse des solutés compatibles reflétée par une activité intense de l'A.T.P.ase membranaire (NISHI et YAGI, 1992). Chez *R. meliloti* la qualité et la quantité de ces solutés varie avec la pression osmotique du milieu, et la synthèse du tréhalose n'apparaît que lorsque cette pression atteint une valeur seuil (SMITH *et al.*, 1994b).

L'appréciation de ces paramètres de culture bactérienne par la détermination de la DO n'est cependant pas sans poser de problèmes. En effet, HUDSON et MOTT (1994) considèrent que la durée de la phase de latence ne peut être déterminée réellement que par les techniques de numération. D'autre part, certains genres bactériens, tel *Pseudomonas*, produisent des polysaccharides en abondance lorsqu'ils sont confrontés à une déshydratation osmotique (SINGH *et al.*, 1992; SINGH et FETT, 1995): dans de telles conditions la présence de ces polysaccharides pourrait très bien fausser la détermination de la  $DO_{max}$  voire même celle du taux de croissance.

## **2- Evolution du degré d'insaturation**

L'extraction des A.G.(s) membranaires a été réalisée sur des cultures prélevées en phase stationnaire de croissance. Le profil d'A.G.(s) a servi dans le calcul du degré d'insaturation et les résultats sont reportés sur la figure 24.

Nous constatons tout d'abord que les degrés d'insaturation de *R. meliloti* et *B. elkanii* issus du milieu Y.E.M. standard ( $a_w$  0,999) sont légèrement supérieurs à ceux observés dans les études précédentes: ce léger décalage peut s'expliquer par les conditions de culture en biophotomètre qui sont différentes de celles utilisées précédemment (agitation, aération...)

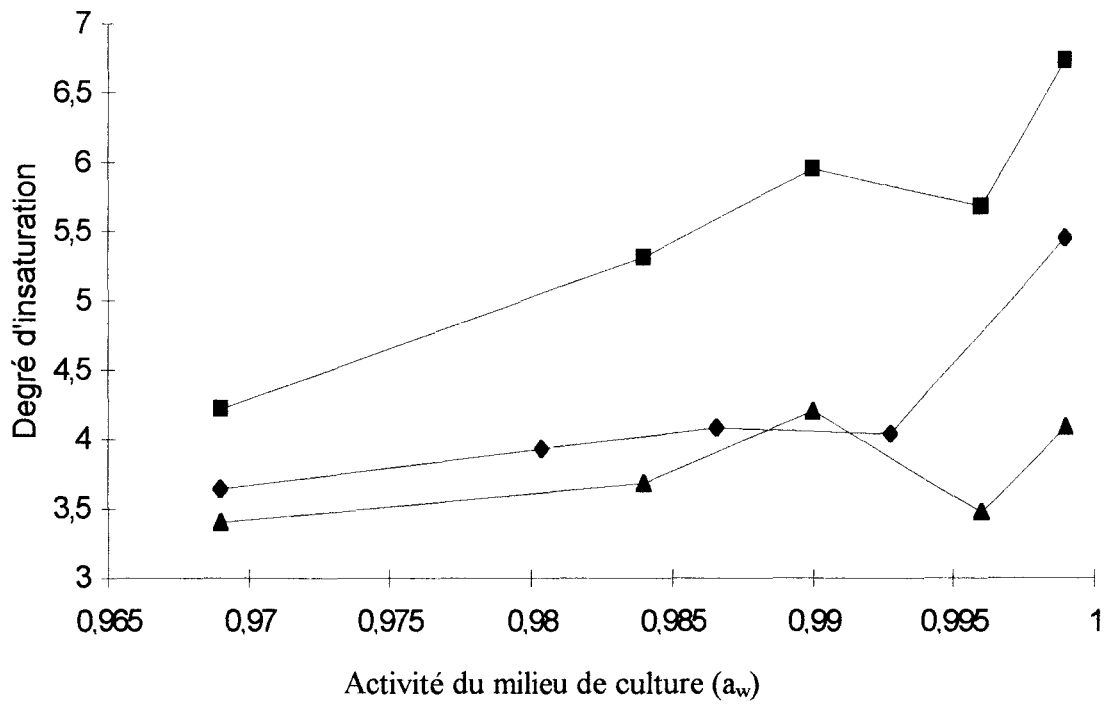
Une nette diminution du degré d'insaturation est observée pour les trois souches étudiées lorsque l'activité du milieu de culture diminue.

*Bradyrhizobium japonicum* présente une diminution relative moins importante de son degré d'insaturation que les deux autres souches étudiées.

Pour *R. meliloti*, une faible diminution de l' $a_w$  entraîne une forte diminution du degré d'insaturation des A.G.(s). On peut penser qu'il y a rapidement une restructuration importante de la membrane qui se traduit par une intense diminution de la fluidité membranaire. Les changements sont ensuite beaucoup plus lents.

Pour *B. elkanii* on constate une baisse très progressive du degré d'insaturation des A.G.(s) quand l' $a_w$  diminue: cette bactérie doit probablement réguler lentement sa fluidité membranaire.

Les cellules de (brady)rhizobia soumises à une déshydratation osmotique en milieu riche modifient leur structure membranaire en abaissant leur degré d'insaturation. Ce phénomène d'adaptation est très rapide puisqu'il est déjà perceptible pour une très faible diminution de l' $a_w$ .



**Figure 24:** Evolution du degré d'insaturation des A.G.(s) lors de la croissance à différentes  $a_w$ (s) chez *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 (■), *Rhizobium meliloti* RCR 2011(◆) et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2 (▲).

Une diminution du degré d'insaturation consécutive à une baisse de l' $a_w$  des milieux de culture a déjà été rapportée pour de nombreux micro-organismes (HILGE-ROTMANN et REHM, 1991; LESAGE *et al.*, 1993; NICHOLS *et al.*, 1994; SAJBIDOR *et al.*, 1994): les applications potentielles de ce phénomène n'ont pas été examinées. Dans notre expérimentation avec les (brady)rhizobia il serait intéressant de considérer cette étape comme une préadaptation à la déshydratation intramatricielle. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour appuyer cette hypothèse avant de proposer des milieux de cultures à basse  $a_w$  parfaitement adaptés à la production de (brady)rhizobia capables de supporter les stress ultérieurs d'une dessiccation.

## Conclusion Générale

Le maintien de l'intégrité et de la fluidité des membranes cytoplasmique et externe et par voie de conséquence la composition en acides gras cellulaires sont logiquement de première importance dans la tolérance à la dessiccation. La composition en acides gras (A.G.(s)) des rhizobia diffère de celle des bradyrhizobia et varie aussi en fonction de l'âge physiologique.

Au cours de cette étude, nous avons donc étudié l'influence de l'âge physiologique sur la survie de souches de (brady)rhizobia après dessiccation et conservation prolongée à différentes Humidités Relatives (H.R.(s)). Les activités de l'eau optimales et maximales de croissance ont également été déterminées. Une analyse de l'évolution des acides gras cellulaires au cours de ces stress a été menée afin d'établir une éventuelle corrélation entre degré d'insaturation et tolérance à la dessiccation.

Les souches retenues au cours de notre étude (*Rhizobium meliloti* RCR 2011, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 120 et *Bradyrhizobium japonicum* 3-2) ont été identifiées au niveau du genre par des tests de nodulation sur les plantes hôtes respectives (luzerne et soja) et au niveau de l'espèce par l'analyse des profils d'A.G.(s). L'analyse des profils des A.G.(s) montre que le genre *Rhizobium* présente une plus grande variété d'A.G.(s). En effet, le C14:3OH, le C16:0 3OH (caractéristiques des L.P.S.), le C17:0 et le C20:3:w6,9,12c ne sont jamais détectés chez les bradyrhizobia. Cette propriété permet de séparer aisément les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Dans le genre *Bradyrhizobium*, l'identification au niveau de l'espèce est aisée. En effet, *B. japonicum* présente beaucoup moins de C19:0 cyclo (C19:0cyclo 11-12) que *B. elkanii*. De plus, le C17:0 cyclo (C17:0 cyclo 9-10) n'est jamais détecté chez *B. japonicum*. L'identification au niveau de l'espèce chez les rhizobia est plus délicate, mais reste cependant tout à fait possible.

Les degrés d'insaturation les plus élevés sont observés chez *B. elkanii* puis *R. meliloti*. *Bradyrhizobium japonicum* présente le degré d'insaturation le plus faible.

Lors de la croissance en milieu liquide, le degré d'insaturation présente une valeur maximale en phase exponentielle de croissance. Ce phénomène est particulièrement marqué chez les bradyrhizobia. La chute de ce degré coïncide avec l'entrée en phase stationnaire de croissance. Au cours de cette phase, le degré d'insaturation continue à diminuer et ce de manière pratiquement linéaire. Au cours de la croissance, les pourcentages des A.G.(s) prédominants (supérieurs à 5%) évoluent de manière tout à fait similaire chez les trois souches étudiées. La transformation des A.G.(s) *cis* insaturés en A.G.(s) cyclo coïncide avec la phase de ralentissement ou l'entrée en phase stationnaire de croissance.

Les cellules de (brady)rhizobia ne sont pas affectées par l'étape de dessiccation quels que soient les âges physiologiques et les H.R.(s) testés. Il ne semble pas exister de corrélation nette entre le degré d'insaturation avant dessiccation et le taux de survie juste après dessiccation chez les (brady)rhizobia.

De manière générale, les (brady)rhizobia réagissent aux stress de dessiccation à différentes H.R.(s) en diminuant leurs degrés d'insaturation.

Il apparaît qu'au cours de la dessiccation les (brady)rhizobia adoptent plusieurs stratégies:

- Un arrêt de la voie anaérobie de synthèse des A.G.(s) en faveur de la voie aérobie.
- Une conversion de C18:1w7c en C19:0 cyclo essentiellement observée aux H.R.(s) supérieures ou égales à 68%.
- Une augmentation des A.G.(s) à courte chaîne carbonée et du C16:0 ou du C18:0.

*Rhizobium meliloti* est plus tolérant que les deux autres souches de *Bradyrhizobium* lors de la conservation à 22, 43, 68 et 83% d'H.R. et ce quelles que soient les phases de croissances testées.

Suivant les phases de croissances testées, les H.R.(s) optimales de conservation se situent entre 22 et 43% d'H.R.(s) pour *R. meliloti* RCR 2011 et 43% pour *B. elkanii* USDA 120 et *B. japonicum* 3-2.



De manière générale, les cellules de (brady)rhizobia prélevées en fin de phase de latence présentent les niveaux de tolérance les plus élevés aux différentes H.R.(s) testées. A de rare exceptions près, les cellules de (brady)rhizobia prélevées en phase exponentielle présentent une grande sensibilité à la conservation à l'état déshydraté.

Des décroissances biphasiques sont observées chez les (brady)rhizobia lors de la conservation. Ces décroissances sont caractérisées par une première phase dont la durée et la pente varient selon les souches, l'âge physiologique et les H.R.(s) de conservation.

L'aspect biphasique des cinétiques de survie chez *R. meliloti* RCR 2011 est du en partie à un effet protecteur des cellules mortes et non à l'existence d'une fraction de population plus tolérante.

Il ne semble pas exister de corrélation entre les degrés d'insaturation après dessiccation et les taux de survie lors de la conservation. Les degrés d'insaturation observés à 40 jours de conservation n'expliquent pas non plus ces mortalités.

Les observations en microscopie photonique et électronique à balayage ont permis de montrer que la lyse bactérienne n'est pas la cause principale de la forte mortalité. La dessiccation, en elle même n'affecte pas directement la morphologie bactérienne. La réhydratation conduit à la lyse de quelques cellules fragilisées ou à la fuite de matériels intracellulaires.

L'existence de cellules viables mais non cultivables est fortement probable. Cependant, ces cellules ne sont plus en mesure de noduler leur hôte végétal.

Quelle que soit la souche étudiée, la diminution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du milieu de culture est fortement ressentie au niveau des paramètres liés à la croissance. Ces changements s'accompagnent également d'une baisse du degré d'insaturation des A.G.(s) des souches de (brady)rhizobia.

## Références Bibliographiques

- ASSELINEAU J.** 1966. The bacterial lipids in Chemistry of Naturel Products III Lederer E. Eds. Hermann Paris.
- ADAMS R.L. and N.J. RUSSELL.** 1992. Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. Can. J. Microbiol. **38**: 823-827.
- AL-RASHIDI R.K., T.E. LOYNACHAN and L.R. FREDERICK.** 1982. Desiccation tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem. **14**: 489-493.
- ALLISON S.M. and J.I. PROSSER.** 1991. Survival of ammonia oxidising bacteria in air-dried soil. FEMS Microbiol. Lett. **79**: 65-68.
- ANGLE J.S., M.A. LEVIN, J.V. GAGLIARDI and M.S. McINTOSH.** 1995. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) in soil. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2835-2839.
- ANTHEUNISSE J. and L. ARKESTEIN-DIJKSMAN.** 1979. Rate of drying and the survival of microorganisms. Antonie Van Leeuwenhoek. **45**: 177-184.
- ANTHEUNISSE J., J.W. DE BRUIN-TOL and M.E. VAN DER POL-VAN SOEST.** 1981. Survival of microorganisms after drying and storage. Antonie Van Leeuwenhoek. **47**: 539-545.
- ATHAR M. and D.A. JOHNSON.** 1996. Nodulation, biomass production, and nitrogen fixation in alfalfa under drought. J. Plant Nutr. **19**: 185-199.
- BAE J.-H., S.H. ANDERSON and K.J. MILLER.** 1993. Identification of a high-affinity glycine betaine transport system in *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2734-2736.
- BALE M.J., P.M. BENNETT, J.E. BERINGER and M. HINTON.** 1993. The survival of bacteria exposed to desiccation on surfaces associated with farm buildings. J. Appl. Bacteriol. **75**: 519-528.
- BARBOUR W.M., D.R. HATTERMANN and G. STACEY.** 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2635-2639.
- BARCINA I., I. ARANA, P. SANTORUM, J. IRIBERRI and L. EGEA.** 1995. Direct viable count of Gram- positive and Gram- negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. J. Microbiol. Methods. **22**: 139-150.
- BASHAN Y., M.E. PUENTE, M.N. RODRIGUEZ-MENDOZA, G. TOLEDO, G. HOLGUIN, R. FERRERA-CERRATO and S. PEDRIN.** 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil type. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1938-1945.
- BERNARD T., M. JEBBAR, Y. RASSOULI, S. HIMDI-KABBAB, J. HAMELIN and C. BLANCO.** 1993. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. J. Gen. Microbiol. **139**: 129-136.
- BHAT U.R. and R.W. CARLSON.** 1992. A new method for the analysis of amide-linked hydroxy fatty acids in lipid-As from gram-negative bacteria. Glycobiology. **2**: 535-539.

- BHAT U.R., L.S. FORSBERG and R.W. CARLSON.** 1994. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. Am. Soc. Biochem. Molecul. Biol.: 14402-14410.
- BINNERUP S.J., D.F. JENSEN, H. THORDAL-CHRISTENSEN and J. SØRENSEN.** 1993. Detection of viable, but non-culturable *Pseudomonas fluorescens* DF57 in soil using a microcolony epifluorescence technique. FEMS Microbiol. Ecol. **12**: 97-105.
- BISSONNETTE N, R. and LALANDE.** 1988. High survivability of cheese Whey-grown *Rhizobium meliloti* cells upon exposure to physical stress Appl. Environ. Microbiol. **54**: 183-187.
- BIZOT H., D. TOME, A. GUILBOT, R. DRAPRON and J.L. MULTON.** 1978. Les aliments à humidité intermédiaire. A.P.R.I.A., Serie Synthèse Bibliographique. **16**.
- BLANCHETTE L., D. ROY and S.F. GAUTHIER.** 1995. Protective effect of ultrafiltered retentate powder on stability of freeze dried cultures of bifidobacteria during storage. Milchwissenschaft. **50**: 363-367.
- BLOMBERG A.** 1995. Global change in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0,7 M NaCl. J. Bacteriol. **177**: 3563-3572.
- BODNARUK P.W. and D.A. GOLDEN.** 1996. Influence of pH and incubation temperature on fatty acid composition and virulence factors of *Yersinia enterocolitica*. Food Microbiol. **13**: 17-22.
- BOONKERD N. and R.W. WEAVER.** 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 585-589.
- BOTTOMLEY P.J. and M.H. DUGHRI.** 1989. Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 959-964.
- BOTTOMLEY P.J. and S.P. MAGGARD.** 1990. Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 533-540.
- BOTTOMLEY P.J.** 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In Biological Nitrogen Fixation (G. STACEY, R.H. BURRIS and H.J. EVANS, Eds) pp. 293-348. Chapman & Hall, New York.
- BOZOGLU T.F., M. OZILGEN and U. BAKIR.** 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. Enzyme Microb. Technol. **9**: 531-537.
- BRASHEARS M.M. and S.E. GILLILAND.** 1995. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. J. Dairy Sci. **78**: 2326-2335.
- BREEDVELD.M.W., L.P.T.M. ZEVENHUIZEN and A.J.B. ZEHNDER.** 1990. Osmotically induced oligo-and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J. Gen. Microbiol. **136**: 2511-2519.

- BREEDVELD M.W., L.P.T.M. ZEVENHUIZEN and A.J.B. ZEHNDER.** 1992. Synthesis of cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* **174**: 6336-6342.
- BREEDVELD M.W., C. DIJKEMA, L.P.T.M. ZEVENHUIZEN and A.J.B. ZEHNDER.** 1993. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3157-3163.
- BREEDVELD M.W. and K.J. MILLER.** 1994. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**: 145-161.
- BROCKWELL J. and P.J. BOTTOMLEY.** 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil. Biol. Biochem.* **27**: 683-697.
- BUCHANAN R.L.** 1993. Predictive food microbiology. *Trends in Food Sci. Technol.* **4**: 6-11.
- BURLEIGH S.H. and J.O. DAWSON.** 1994. Desiccation tolerance and trehalose production in *Frankia hyphae*. *Soil. Biol. Biochem.* **26**: 593-598.
- BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL.** 1977 a. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol. Biochem.* **9**: 143-147.
- BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL.** 1977 b. Desiccation induced damage to the cell envelope of root nodule bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **9**: 147-152.
- BUSHBY H.V.A. and K.C. MARSHALL.** 1977 c. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *J. Gen. Microbiol.* **99**: 19-27.
- CAESAR A.J. and T.J. BURR.** 1991. Effect of conditioning, betaine and sucrose on the survival of rhizobacteria in powder formulations. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 168-172.
- CANGELOSI G.A., G. MARTINETTI and E.W. NESTER.** 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic  $\beta$ -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 2172-2174
- CARRION M., U.R. BHAT, B. REUHS and R.W. CARLSON.** 1990. Isolation and characterisation of lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 1725-1731.
- CASTRO H.P., P.M. TEIXEIRA and R. KIRBY.** 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 172-176.
- CASTRO H.P., P.M. TEIXEIRA and R. KIRBY.** 1996. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* **18**: 99-104.
- CHAO W.-L. and M. ALEXANDER.** 1982. influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **46**: 949-952.

- CHAO W.-L. and M. ALEXANDER.** 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 94-97.
- CHEN M. and M. ALEXANDER.** 1973. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 213-221.
- CIANI M. and F.U. DIRIYE.** 1995. Presence of rhizobia in soils in Somalia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 615-617.
- CLEIN J.S. and J.P. SCHIMEL.** 1994. Reduction in microbial activity in birch litter due to drying and rewetting events. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 403-406.
- CLIQUET S. and G. CATROUX.** 1994. Influence of culture medium and growth stage on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation and storage at two relative humidities. *Symbiosis* **16**: 279-287.
- COHEN J.L. and K.J. MILLER.** 1991. A novel membrane-bound glucosyltransferase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4271-4276.
- COLE M.A., G.H. ELKAN.** 1973. Transmissible resistance to Penicillin G, Neomycin and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 248-253.
- CRONAN JR J.E. and C.O. ROCK.** 1987. Biosynthesis of membrane lipids. *In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, vol. 1. **NEIDHARDT F.C., J.L. INGRAHAM, K.B. LOW, B. MAGASANIK, M. SCHAECHTER and H.E. UMBARGER** (ed). *Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.* p. 474-497
- CROWE J.H., J.F. CARPENTER, L.M. CROWE and T.J. ANCHORDOGUY.** 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? a comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology.* **27**: 219-231.
- CROZAT Y., J.C. CLEYET-MAREL, J.J. GIRAUD and M. OBATON.** 1982. Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil. Biol. Biochem.* **14**: 401-405.
- CSONKA L.N. and A.D. HANSON.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.
- CULLEN J., M.C. PHILLIPS and G.G. SHIPLEY.** 1971. The effects of temperature on the composition and physical properties of the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. J.* **125**: 733-742.
- DANDURAND L.-M., M.J. MORRA, M.H. CHAVERRA and C.S. ORSER.** 1994. Survival of *Pseudomonas* spp in air-dried mineral powders. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1423-1430.
- DANSO S.K.A. and M. ALEXANDER.** 1974. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **38**: 86-89.

- DAVIDSON F. and H.W. REUSZER.** 1978. Persistence of *Rhizobium japonicum* on the soybean seed coat under controlled temperature and humidity. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 94-96.
- DE LAJUDIE P., A. WILLEMS, B. POT, D. DEWETTINCK, G. MAESTROJUAN, M. NEYRA, M.D. COLLINS, B. DREYFUS, K. KERSTERS and M. GILLIS.** 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 715-733.
- DIAB S. and M. SHILO.** 1988. Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp.. *Arch. Microbiol.* **150**: 387-393.
- DIEFENBACH R., H.-J. HEIPIEPER and H. KEWELOH.** 1992. The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 382-387.
- DIEFENBACH R. and H. KEWELOH.** 1994. Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bound of lipids. *Arch. Microbiol.* **162**: 120-125.
- DOLHEM-BIREMON C., P. MARY and R. TAILLIEZ.** 1993. Compétition entre souches de *Rhizobiaceae*: mise en évidence de différents modes d'adhésion sur les racines de soja. *Can. J. Microbiol.* **39**: 982-986.
- DOLHEM-BIREMON C., P. MARY and R. TAILLIEZ.** 1995. Adhesion behaviour of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains: evidence of duality between the two species. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 1657-1660.
- DOMMERGUES Y.R., H.G. DIEM and L. DIVIES.** 1979. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 779-781.
- DRICI-CACHON Z., J.F. CAVIN and C. DIVIES.** 1996. Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 331-334.
- D'SOUZA-AULT M.R., L.T. SMITH and G.M. SMITH.** 1993. Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 473-478.
- DUPRAY E., A. DIRRIEN and R. PICHON.** 1995. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 148-151.
- DURAR A.A., J.L. STEINER, S.R. EVETT and E.L. SKIDMORE.** 1995. Measured and simulated surface soil drying. *Agron. J.* **87**: 235-244.
- DYE M.** 1982. A note on some factors affecting the survival of *Rhizobium* cultures during freeze drying and subsequent storage. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 461-464.
- DYLAN T., D.R. HELINSKI and G.S. DITTA.** 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 1400-1408.

- ELEUTHERIO E.C.A., P.S. DE ARAUJO and A.D. PANEK.** 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Bioph. Acta.* **1156**: 263-266.
- ELSHEIKH E.A.E. and M.WOOD.** 1990. Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 127-129.
- EVANS J., C. WALLACE and N. DOBROWOLSKI.** 1993. Interaction of soil type and temperature on the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1153-1160.
- FABRIE C.H.J.P., J.M.W. SMEETS, B.D. KRUIJFF and J.D. GIER.** 1994. The cryoprotectant trehalose destabilises the bilayer organisation of *Escherichia coli*-derived membrane systems at elevated temperatures as determined by <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P-NMR. *Chem. Phys. Lip.* **70**: 133-145.
- FAGES J.** 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 473-478.
- FLÄRDH K., P.S. COHEN and S. KJELLEBERG.** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* **174**: 6780-6788.
- FOUILLEUX G., C. REVELLIN and G. CATROUX.** 1994. Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculation process using mineral microgranules. *Can. J. Microbiol.* **40**: 322-325.
- FRIONI L., C. LE ROUX, Y.R. DOMMERGUES and H.G. DIEM.** 1994. Inoculant made of encapsulated *Frankia* growth within alginate beads. **10**: 118-121.
- FU W.-Y. and M.R. ETZEL.** 1995. Spray drying of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* C2 and cellular injury. *J. Food Sci.* **60**: 195-200.
- FUHRMANN J., C.B. DAVEY and A.G. WOLLUM, II.** 1986. Desiccation tolerance of clover rhizobia in sterile soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**: 639-644.
- FUJIHARA S. and T. YONEYAMA.** 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1104-1109.
- GALINSKI E.A.** 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia.* **49**: 487-496.
- GEIGER O., A.C. WEISSBORN and E.P. KENNEDY.** 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **173**: 3021-3024.
- GERVAIS P. and I. MARTINEZ DE MARANON.** 1995. Effects of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability. *Biochem. Biophys. ACTA.* **1235**: 52-56.
- GHITTONI N.E. and M.A. BUENO.** 1995. Peanut rhizobia under salt stress: role of trehalose accumulation in strain ATCC 51466. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1021-1030.



- GHITTONI N.E. and M.A. BUENO.** 1996. Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hyper salinity. *Symbiosis*. **20**:117-127.
- GIVSKOV M., L. EBERL,S. MØLLER, L. KONGSBÆK POULSEN and S. MOLIN.** 1994. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT 2442: analysis of general cross protection, cell shape, and macromolecular content. *J. Bacteriol.* **176**: 7-14.
- GOMBOS Z., H. WADA and N. MURATA.** 1992. Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low -temperature photoinhibition. *Plant Biology*. **89**: 9959-9963.
- GRAHAM P.H.** 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**:475-484.
- GRAHAM P.H., M.J. SADOWSKY, S.W. TIGHE, J.A. THOMPSON, R.A. DATE, J.G. HOWIESON and R. THOMAS.** 1995. Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1038-1042.
- GRAU R., D. GARDIOL, G.C. GLIKIN and D. DE MENDOZA.** 1994. DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **11**: 933-941.
- GRIFFITH G.W. and R.J. ROUGHLEY.** 1992. The effect of moisture potential on growth and survival of root nodule bacteria in peat culture and on seed. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 7-13.
- GROGAN D.W. and J.E. CRONAN JR.** 1986. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **166**: 872-877.
- GUCKERT J.B., M.A. HOOD and D.C. WHITE.** 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 794-801.
- GUCKERT J.B., D.B. RINGELBERG and D.C. WHITE.** 1987. Biosynthesis of *trans* fatty acids from acetate in the bacterium *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **33**: 748-754.
- GUILLOUET S. and J.M. ENGASSER.** 1995. Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 315- 320.
- HAMAMOTO T., N. TAKATA, T. KUDO and K. HORIKOSHI.** 1994. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 77-82.
- HAMANA K., K. MINAMISAWA, S. MATSUZAKI.** 1990. Polyamines in *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and *Agrobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**: 71-76.
- HANDLEY B.A. and A.J.F. WEBSTER.** 1995. Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 368-378.
- HANSEN N.H. and H. RIEMANN.** 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *J. Appl. Bacteriol.* **26**: 314-333.

- HARRATA A.K., L.N. DOMELSMITH and R.B. COLE.** 1993. Electrospray mass spectrometry for characterisation of lipide A from *Enterobacter agglomerans*. *Biol. Mass Spectrom.* **22**: 59-67.
- HARTEL P.G. and M. ALEXANDER.** 1984. Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **30**: 820-823.
- HARTEL P.G. and M. ALEXANDER.** 1986. Role of extracellular polysaccharide production and clays in the desiccation tolerance of cowpea bradyrhizobia. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**: 1193-1198.
- HARTEL P.G., J.J. FUHRMANN, W.F. JOHNSON, Jr., E.G. LAWRENCE, C.S. LOPEZ, M.D. MULLEN, H.D. SKIPPER, T.E. STALEY, D.C. WOLF, A.G. WOLLUM II and D.A. ZUBERER.** 1994. Survival of *lacZY*-containing *Pseudomonas putida* strain under stressful abiotic soil conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **58**: 770-776.
- HARTWIG U.A., C.M. JOSEPH and D.A. PHILLIPS.** 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **95**: 797-803.
- HEIPIEPER H.J. and J.A.M. DE BONT.** 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4440-4444.
- HEIPIEPER H.J., G. MEULENBELD, Q. VAN OIRSCHOT and J.A.M. DE BONT.** 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2773-2777.
- HENDERSON R.J., R.M. MILLAR, J.R. SARGENT and J.-P. JOSTENSEN.** 1993. *Trans*-monoenoic and polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium in relation to growth conditions. *Lipids.* **28**: 389-396.
- HERSHKOVITZ N., A. OREN and Y. COHEN.** 1991. Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matric water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 645-648.
- HILGE-ROTMANN B. and H.J. REHM.** 1991. Relationship between fermentation capability and fatty acid composition of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 502-508.
- HOBEN H.J., N.N. AUNG, P. SOMASEGARAN and U.G. KANG.** 1991. Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 324-330.
- HOELZLE I. and J.G. STREETER.** 1990. Increased accumulation of trehalose in rhizobia culture under 1% oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3213-3215.
- HOLLIS A.B., W.E. KLOOS and G.H. ELKAN.** 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 215-222.

- HOTTIGER T., T. BOLLER and A. WIEMKEN.** 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* **220**: 113-115.
- HUBAC C., D.GUERRIER, J. FERRAN, A. TREMOLIERES and A. KONDOROSI.** 1992. Lipid and protein composition of outer and inner membranes in wild-type strains and *nod* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1973-1983.
- HUBER T.A., A.K. AGARWAL and D.L. KEISTER.** 1984. Extracellular polysaccharide composition, ex-planta nitrogenase activity and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **158**: 1168-1171.
- HUDSON J.A. and S.I. MOTT.** 1994. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *J. Food Safety.* **14**: 329-339.
- HUGENHOLTZ P., M.A. CUNNINGHAM, J.K. HENDRIKZ and J.A. FUERST.** 1995. Desiccation resistance of bacteria isolated from an air-handling system biofilm determined using a simple quantitative membrane filter method. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 41-46.
- HUTTER W., L. WERNER, J. PETER and W. HAMPEL.** 1995. Spray drying of the dehalogenating bacterium *Rhodococcus* sp. *Bioprocess Engineering.* **13**: 19-21.
- INON DE IANNINO N. and R.A. UGALDE.** 1993. Biosynthesis of cyclic  $\beta$ -(1-3), $\beta$ -(1-6) glucan in *Bradyrhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* **159**: 30-38.
- ISHIDA A., Y. KAWATAKE and N. ONO.** 1994. Osmotic stress conditioning for induction of acquired osmotolerance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 35-42.
- ISRAELI E., B. T. SHAFFER and B. LIGHTHART.** 1993. Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology.* **30**: 519-523.
- ISSA S. and M. WOOD.** 1995. Multiplication and survival of chickpea and bean rhizobia in dry soils: the influence of strains, matric potential and soil texture. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 785-792.
- JAHNKE L.L.** 1992. The effects of growth temperature on the methyl sterol and phospholipid fatty acid composition of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 209-212.
- JANNING B., P.H. IN'T VELD, S. NOTERMANS and J. KRÄMER.** 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 319-324.
- JANSEN J.P., B.C. SCHIFFERS, P. MATHOT and J. BRAKEL.** 1994. Use of bacteria protections in pelleting for preinoculation of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L). *Seed Sci. & Technol.* **22**: 329-336.
- JARVIS B.D.W. and S.W. TIGHE.** 1994. Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil* **161**: 31-41.

- JAUHRI K.S., M. GUPTA, N.S. DUTT and N.S. SUBBA RAO.** 1988. Experiments with freeze-dried inoculum of *Rhizobium* sp. nodulating groundnut (*Arachis hypogea*). Zentralbl. Mikrobiol. **143**: 275-284.
- JENSEN E.S. and L.H. SØRENSEN.** 1987. Survival of *Rhizobium leguminosarum* in soil after addition as inoculant. FEMS Microbiol. Ecol. **45**: 221-226.
- JOHANSSON T., P. NIKKILÄ, L. TOIVONEN, H. ROSENQVIST and S. LAAKSO.** 1995. Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4497-4499.
- JORDAN D.C.** 1984. Famille III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, p 234-254. In N.R. Krieg and J.C. Holtz (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. The Williams and Wilking Co., Baltimore.
- JUNG G., J. MUGNIER, H.G. DIEM and Y.R. DOMMERGUES.** 1982. Polymer-entrapped rhizobia as an inoculant for legumes. Plant Soil. **65**: 219-231.
- JUWARKAR A. and R.B. REWARI.** 1988. Synergistic effect of relative humidity and temperature on the survival of rhizobia in inoculant carrier. J. Appl. Bacteriol. **64**: 465-469.
- KANEDA T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. Microbiol. Rev. **55**: 288-302.
- KANNENBERG E.L., M. PERZL and T. HÄRTNER.** 1995. The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **127**: 255-262.
- KAPRELYANTS A.S., J.C. GOTTSCHAL and D.B. KELL.** 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **104**: 271-286.
- KETS E.P.W., P.J.M. TEUNISSEN and J.A.M. DE BONT.** 1996. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 259-261.
- KEWELOH H. and H.J. HEIPIEPER.** 1996. *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. Lipids. **31**: 129-137.
- KIEFT T.L., D.B. RINGELBERG and D.C. WHITE.** 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3292-3299.
- KILBERTUS G., J. PROTH and B. VERVIER.** 1979. Effets de la dessiccation sur les bactéries Gram-négatives d'un sol. Soil. Biol. Biochem. **11**: 109-114.
- KJELLEBERG S., N. ALBERTSON, K. FLARDH, L. HOLMQUIST, A. JOUPER-JAAN, R. MAROUGA, J. OSTLING, B. SUENBLAD and D. WEICHART.** 1993. How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? Antonie Van Leeuwenhoek. **63**: 333-341.
- KNAEBEL D.B., T.W. FEDERLE, D.C. McAVOY and J.R. VESTAL.** 1994. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in natural soil. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 4500-4508.

- KOGURE K., U. SIMIDU and N. TAGA.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415-420.
- KOSANKE J.W., R.M. OSBURN, G.I. SHUPPE and R.S. SMITH.** 1992. Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations. *Can. J. Microbiol.* **38**: 520-525.
- KOSKI P. and M. VAARA.** 1991. Polyamines as constituents of the outer membranes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 3695-3699.
- KREMER R.J. and H.L. PETERSON.** 1983. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1790-1794.
- KUYKENDALL L.D.** 1979. Transfer of R factors to and between genetically marked sublines of *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 862-866.
- KUYKENDALL L.D., M.A. ROY, J.J. O'NEILL and T.E. DEVINE.** 1988. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 358-361.
- KUYKENDALL L.D., B. SAXENA, T.E. DEVINE and S.E. UDELL.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Can. J. Microbiol.* **38**: 501-505.
- LAL B. and S. KHANNA.** 1994. Selection of salt-tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 637-639.
- LARSSON C. and L. GUSTAFSSON.** 1993. The role of physiological state in osmotolerance of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 603-609.
- LEISTNER L. and RODEL.** Inhibition of microorganism in food by water activity. *In: «Inhibition and inactivation of vegetatives microbes».* Skinner, Hugo Eds. : 219-237.
- LESAGE L., C. GENOT, E. RECORD, C. POULIQUEN and D. RICHARD-MOLARD.** 1993. Fatty acid composition and molecular order of phospholipids from *Eurotium chevalieri* in response to changes in water activity. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1653-1661.
- LESLIE S.B., S.A. TETER, L.M. CROWE and J.H. CROWE.** 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1192**: 7-13.
- LESLIE S.B., E. ISRAELI, B. LIGHTHART, J.H. CROWE and L.M. CROWE.** 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3592-3597.
- LEUNG K. and P.J. BOTTOMLEY.** 1994. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* at different soil water potentials. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 805-812.

- LIEVENSE L.C., M.A.M. VERBEEK, Ad NOOMEN and K. VAN'T RIET.** 1994. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 90-94.
- LINDBERG A.-M. and G. MOLIN.** 1993. Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus *Mortierella alpina* CBS 343.66 in fermentor cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**: 450-455.
- LINDER K. and J.D. OLIVER.** 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 2837-2842.
- LOUIS P., H.G. TRÜPER and E.A. GALINSKI.** 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 684-688.
- LUCHT J.L. and E. BREMER.** 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. FEMS Microbiol. Rev. **14**: 3-2.
- MACKENZIE S. L., M.S. LAPP and J.J. CHILD.** 1979. Fatty acid composition of *Rhizobium spp.* Can. J. Microbiol. **25**: 68-74.
- MAHLER R.L. and A.G. WOLLUM II.** 1980. Influence of water potential on the survival of rhizobia in a goldsboro loamy sand. Soil Sci. Soc. Am. J. **44**: 988-992.
- MARECHAL P.A., P. GERVAIS.** 1994. Yeast viability related to water potential variation: influence of the transition phase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 617-622.
- MARTINEZ-ROMERO E.** 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil. **161**: 11-20.
- MARTINEZ-ROMERO E. and J. CABALLERO-MELLADO.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci. **15**: 113-140.
- MARUFU L., N. KARANJA and M. RYDER.** 1995. Legume inoculant production and use in East and Southern Africa. Soil. Biol. Biochem. **27**: 735-738.
- MARY P., D. OCHIN and R. TAILLIEZ.** 1985. Rates of drying and survival of *Rhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 207-211.
- MARY P., D. OCHIN and R. TAILLIEZ.** 1986. Growth status of rhizobia in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses. Soil Biol. Biochem. **18**: 179-184.
- MARY P., D. OCHIN, J.C. DERIEUX and R. TAILLIEZ.** 1987. Effets de cycles de déshydratation-réhydratation sur la survie de *Rhizobium* à différentes humidités relatives. Colloque SFM, Lille 26-27 mars 1987.

- MARY P., N. MOSCHETTO and R. TAILLIEZ.** 1993. Production and survival during storage of spray-dried *Bradyrhizobium japonicum* cell concentrates. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 340-344.
- MARY P., N. DUPUY, C. DOLHEM-BIREMON, C. DEFIVES and R. TAILLIEZ.** 1994. Difference among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1125-1132.
- MATERON L.A. and R.W. WEAVER.** 1985. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seed. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 465-467.
- MATIN A.** 1990. Molecular analysis of the starvation stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 185-196.
- MATSUTANI K., Y. FUKUDA, K. MURATA, A. KIMURA, I. NAKAMURA and N. YAJIMA.** 1990. Physical and biochemical properties of freeze-tolerant mutants of a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 275-276.
- MAWDSLEY J.L. and R.G. BURNS.** 1994. Factors affecting the survival of a *Flavobacterium* species in non-planted and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 849-859.
- MAYBERRY W.R. and J.R. LANE.** 1993. Sequential alkaline saponification/acid hydrolysis/esterification: a one-tube method with enhanced recovery of both cyclopropane and hydroxylated fatty acids. *J. Microbiol. Methods.* **18**: 21-32.
- Mc COWAN R.P., K.J. CHENG, C.B.M. BAILEY and J.W. COSTERTON.** 1978. Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within reticulo-rumen of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 149-155.
- McCLURE P.J., M.B. COLE and J.P.P.M. SMELT.** 1994. Effects of water activity and pH on growth of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76**: 105S-114S.
- McFETERS G.A., F.P. YU, B.H. PYLE, P.S. STEWART.** 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods.* **21**: 1-13.
- MICHIELS J., C. VERRETH and J. VANDERLEYDEN.** 1994. Effect of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1206-1212.
- MILLER L. and T. BERGER.** 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Application Note 228-38. Hewlett-Packard Co. Palo Alto Calif.
- MILLER K.J., R.S. GORE and A.J. BENESI.** 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic  $\beta$ -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**: 4569-4575.
- MILLER K.J., B.C. SHON, R.S. GORE and W.P. HUNT.** 1990. The phospholipid composition of *Bradyrhizobium* spp. *Curr. Microbiol.* **21**: 205-210.

- MODY B.R., M.O. BINDRA and V.V. MODY.** 1990. Capsule development and structural characterization of acidic extracellular polysaccharides secreted by cowpea rhizobia. *Cur. Microbiol.* **20**: 145-152.
- MOLENAAR D., A. HAGTING, H. ALKEMA, A.J.M. DRIESSEN and W.N. KONINGS.** 1993. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **175**: 5438-5444.
- MORITA N., A. SHIBAHARA, K. YAMAMOTO, K. SHINKAI, G. KAJIMOTO and H. OKUYAMA.** 1993. Evidence for *cis-trans* isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Bacteriol.* **175**: 916-918.
- MUGNIER J. and G. JUNG.** 1985. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 108-114.
- MURAKAMI Y., K. YOKOIGAWA and H. KAWAI.** 1995. Lipid composition of a freeze-tolerant yeast *Torulasporea delbrueckii*, and its freeze sensitive mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 167-171.
- MURATA N. and H. WADA.** 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* **308**: 1-8.
- NAIR S., K.JAH PRAKASH and C.R. BABU.** 1993. Induced salt tolerant rhizobia, from extremely salt tolerant *Rhizobium* gene pools, from reduced but effective symbiosis under non-saline growth conditions of legume hosts. *Microbios* **74**: 39-51.
- NECASEK J.,M. NEMCOVA,L. LISA, J. DUSBABKOVA, V. NASINEC and D. POZARKOVA.** 1993. Drought tolerance of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti*. *Folia Microbiol.* **38**: 320-324.
- NEVES M.J., J.A. JORGE, J.M. FRANÇOIS, H.F. TERENCEI.** 1991. Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **283**: 19-22.
- NICHOLS D.S., T.A. McMEEKIN and P.D. NICHOLS.** 1994. Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and *trans*-fatty acid production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *Microbiology* **140**: 577-584.
- NISHI T.and T. YAGI.** 1992. A transient and rapid activation of plasma-membrane ATPase during the initial stages of osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 95-100.
- NISHIYAMA M., K. SENOO and S. MATSUMOTO.** 1995. Survival of a bacterium in microporous glass in soil. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 1359-1361.
- NORDSTRÖM K.M.** 1992. Effects of growth phase on the fatty acid composition of *Thermus* spp. *Arch. Microbiol.* **158**: 452-455.
- NYBROE O.** 1995. Assessment of metabolic activity of single bacterial cells - new developments in microcolony and dehydrogenase assays. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 77-84.



- NYSTRÖM T., N.H. ALBERTSON, K. FLÄRDH and S. KJELLEBERG.** 1990. Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio* sp. S14. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 129-140.
- OCHIN D.** 1980. La production en masse et la préparation de cellules déshydratées de *Rhizobium*. Thèse de Troisième Cycle n° 831, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandre Artois.
- OCHIN D., J.-P. HORNEZ, B. COURTOIS et J.C. DERIEUX.** 1983. Conservation de la viabilité de *Rhizobium meliloti* par lyophilisation. *Bio-Sciences.* **2**: 114-115.
- OCHIN D., R. TAILLIEZ et J.B. GUILLAUME.** 1986. Conservation de la viabilité de *Rhizobium meliloti* par atomisation. *Bio-Sciences.* **5**: 179-180.
- OLIVER J.D. and W.F. STRINGER.** 1984. Lipid composition of a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 461-466.
- OPHIR T. and D.L. GUTNICK.** 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 740-745.
- ORGAMBIDE G.G., R.N. REUSCH and F.B. DAZZO.** 1993a. Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalyzed transesterification procedures. *J. Bacteriol.* **175**: 4922-4926.
- ORGAMBIDE G.G., Z.-H. HUANG, D.A. GAGE and F.B. DAZZO.** 1993b. Phospholipid and fatty acid compositions of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 in relation to flavone-activated pSym *nod* gene expression. *Lipids.* **28**: 975-979.
- OSA-AFIANA L.O. and M. ALEXANDER.** 1982a. Clays and the survival of *Rhizobium* in soil during desiccation. *Soil Sci. Soci. Am. J.* **46**: 285-288.
- OSA-AFIANA L.O. and M. ALEXANDER.** 1982b. Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 435-439.
- OZAWA T. and M. YAMAGUCHI.** 1986. Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 911-914.
- PARK S., L.T. SMITH and G.M. SMITH.** 1995. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4378-4381.
- PATCHETT R.A., A.F. KELLY and R.G. KROLL.** 1992. Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3959-3963.
- PAUL E., J. FAGES, P. BLANC, G. GOMA and A. PAREILLEUX.** 1994. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 34-39.

- PEDERSEN J.C. and C.S. JACOBSEN.** 1993. Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) in soil during water stress: effects on culturability and viability. 1993. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1560-1564.
- PENA-CABRIALES J.J. and M. ALEXANDER.** 1979. Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. Soil Sci. Soc. Am. J. **43**: 962-966.
- POCARD J.-A., L.T. SMITH, G.M. SMITH and D. LE RUDULIER.** 1994. A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. J. Bacteriol. **176**: 6877-6884.
- POSPISIL S. and T. REZANKA.** 1994. Changes in fatty acid branching and unsaturation of *Streptomyces cinnamonensis* as a response to NaCl concentration. Folia Microbiol. **39**: 187-190.
- POSTMA J., J.D. VAN ELSAS, J.M. GOVAERT and J.A. VAN VEEN.** 1988. The dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil as determined by immunofluorescence and selective plating techniques. FEMS Microbiol. Ecol. **53**: 251-260.
- POSTMA J., J.A. VAN VEEN and S. WALTER.** 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Soil. Biol. Biochem. **21**: 437-442.
- POSTMA J., C.H. HOK-A-HIN and J.H. OUDE VOSHAAR.** 1990. Influence of the inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. FEMS Microbiol. Ecol. **73**: 49-58.
- POSTMA J., C.H. HOK-A-HIN, J.M.T. SCHOTMAN, C.A. WIJFFELMAN and J.A. VAN VEEN.** 1991. Population dynamics of *Rhizobium leguminosarum* Tn5 mutants with altered cell surface properties introduced into sterile and nonsterile soils. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 649-654.
- POTTS M., J.J. OLIE, J.S. NICKELS, J. PARSONS and D.C. WHITE.** 1987. Variation in phospholipid ester-linked fatty acids and carotenoids of desiccated *Nostoc commune* (cyanobacteria) from different geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 4-9.
- POTTS M.** 1994. Desiccation tolerance of procaryotes. Microbiol. Rev. **58**: 755-805.
- PÜTTMANN M., N ADE and H. HOF.** 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. Res. Microbiol. **144**: 279-283.
- RAYNAL L., BARNWELL P. and P. GERVAIS.** 1994. The use of epi-fluorescence to determine the viability of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to osmotic shifts. J. Biotechnol. **36**: 121-127.
- RIETVELD A.G., J.A.KILLIAN, W. DOWHAN and B. D. KRUIJFF.** 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **268**: 12427-12433.

- ROBERSON E.B. and M.K. FIRESTONE.** 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1284-1291.
- RODRIGUEZ G.G., D. PHIPPS, K. ISHIGURO and H.F. RIDGWAY.** 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1801-1808.
- ROUGHLEY R.J., R.D.M. SIMANUNGKALIT, L.G. GEMELL, E.J. HARTLEY and P. CAIN.** 1995. Growth and survival of root-nodule bacteria in legume inoculants stored at high temperatures. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 707-712.
- RYZNAR L. and V. DRASIL.** 1991. Influence of repeated lyophilization on the survival of *Dienococcus proteolyticus*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* **36**: 71-74.
- SAJBIDOR J., M. LAMACKA, E. BREIREROVA, A. CHRASTINA, P. POKREISZ and M. CERTIK.** 1994. Effect of salt stress on fatty acid alterations in some strains of *Dipodascopsis* and *Dipodascus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 184-186.
- SAKANE T. , I. FUKUDA, T. ITOH and A. YOKOTA.** 1992. Long term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying. *J. Microbiol. Methods.* **16**: 281-287.
- SALEMA M.P., C.A. PARKER, D.K. KIDBY, D.L. CHATEL and T.M. ARMITAGE.** 1982. Rupture of nodule bacteria on drying and rehydration. *Soil Biol. Biochem.* **14**: 15-22.
- SANGINGA N., S.K.A. DANSO, K. MULONGOY and A.A. OJEIFO.** 1994. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an alfisol in southwestern Nigeria. *Plant Soil* **160**: 189-204.
- SANTOS J., T.-M. LOPEZ-DIAZ, M.-L. GARCIA-LOPEZ, M.-C. GARCIA-FERNANDEZ and A. OTERO.** 1994. Minimum water activity for the growth of *Aeromonas hydrophila* as affected by strain, temperature and humectant. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 76-78.
- SCHUBERT S.** 1995. Nitrogen assimilation by legumes: processes and ecological limitations. *Fert. Res.* **42**: 99-107.
- SHERWOOD J.E., J.M.VASSE, F.B. DAZZO, G.L. TRUCHET.** 1984. Development and trifoliin a-binding ability of the capsule of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* **159**: 145-152.
- SIDYAKINA T.M., F.M. KHASAEVA, S.D. TAPTIKOVA and L.V. MODYANOVA.** 1991. Viability and biochemical activity of bacterium *Arthrobacter crystallopoietes* VKM Ac-1098 after freeze-drying and cryopreservation in various protective media. *Cryo.- Letters.* **12**: 3-10.
- SIEGELE D.A. and R. KOLTER.** 1992. Life after Log. *J. Bacteriol.* **174**: 345-348.
- SINGH S., B. KOEHLER and W.F. FETT.** 1992. Effect of osmolarity and dehydration on alginate production by fluorescent pseudomonads. *Curr. Microbiol.* **25**: 335-339.

- SINGH S. and W.F. FETT.** 1995. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**: 301-306.
- SKJERDAL O.T., H. SLETTA, S.G. FLENSTAD, K.D. JOSEFSEN, D.W. LEVINE and T.E. ELLINGSEN.** 1995. Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1099-1106.
- SLININGER P.J., J.E. VAN CAUWENBERGE, R.J. BOTHAST, D.M. WELLER, L.S. THOMASHOW and R.J. COOK.** 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 391-398.
- SMITH L.T., A.A. ALLAITH and G.M. SMITH.** 1994a. Mechanism of osmotically regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil.* **161**: 103-108.
- SMITH L.T., G.M. SMITH, M.R. D'SOUZA, J.-A. POCARD, D. LE RUDULIER and M.A. MADKOUR.** 1994 b. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *J. Exper. Zool.* **268**: 162-165.
- SMITH R.S.** 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* **38**: 485-492.
- SO R.B., J.K. LADHA and J.P.W. YOUNG.** 1994. Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 392-403.
- SOUGOUFARA B., H.G. DIEM and Y.R. DOMMERGUES.** 1989. Response of field grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. *Plant Soil.* **118**: 133-137.
- SOUZU H.** 1986. Fluorescence polarization studies on *Escherichia coli* membrane stability and its relation to the resistance of the cell to freeze-thawing. II. Stabilization of the membranes by polyamines. *Biochim. Biophys. Acta.* **861**: 361-367.
- SPECTOR M.P.** 1990. Gene expression in response to multiple nutrient-starvation conditions in *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 175-184.
- STARK J. and M.K. FIRSTONE.** 1995. Mechanisms for soil moisture effect on activity of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 218-221.
- STEAD D.E.** 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 281-295.
- STEWART M.H. and B.H. OLSON.** 1992. Physiological studies of chloramine resistance developed by *Klebsiella pneumoniae* under low-nutrient growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2918-2927.

- STREETER J.G.**. 1985. Accumulation of  $\alpha,\alpha$ -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J. Bacteriol.* **164**: 78-84.
- STREETER J.G.**. 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 513-522.
- SUTHERLAND I.W.**. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **8**: 143-213.
- SUTHERLAND I.W.**. 1994. Structure function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **12**: 393-448.
- SUUTARI M. and S. LAAKSO.** 1992. Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterulic acids. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 445-450.
- SUUTARI M. and S. LAAKSO.** 1993. Effect of growth temperature on the fatty acids composition of *Mycobacterium phlei*. *Arch. Microbiol.* **159**: 119-123.
- SWEENEY E.T.E. and C.A. BEUCHAT.** 1993. Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am. J. Physiol.* **264**: R469-R480.
- TALAGA P., B. FOURNET and J.-P. BOHIN.** 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**: 6538-6544.
- TEIXEIRA P., M.H. CASTRO and R.M. KIRBY.** 1995a. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 456-462.
- TEIXEIRA P.C., M.H. CASTRO, F.X. MALCATA and R.M. KIRBY.** 1995b. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* following spray-drying. *J. Dairy Sci.* **78**: 1025-1031.
- TEIXEIRA P., H. CASTRO and R. KIRBY.** 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 34-38.
- THEUNISSEN H.J.H., N.A. LEMMENS-DEN-TOOM, A. BURGGRAAF, E. STOLZ and M. F. MICHEL.** 1993. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamydia pneumoniae* in aerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2589-2593.
- TROTMAN A.P. and R.W. WEAVER.** 1995. Tolerance of clover rhizobia to heat and desiccation stresses in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**: 466-470.
- TSUCHIDO T., H. TAKEUCHI, H. KAWAHARA and H. OBATA.** 1994. Evaluation of bacterial injury by image analysis of cell motion. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 185-187.
- TSUJI T., Y. KAWASAKI, S. TAKESHIMA, T. SEKIYA and S. TANAKA.** 1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3415-3421.
- TULLY R.E., D.L. KEISTER and K.C. GROSS.** 1990. Fractionation of the  $\beta$ -linked glucans of *Bradyrhizobium japonicum* and their response to osmotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1518-1522.

**URBANIK-SYPNIEWSKA T., U. SEYDEL, M. GRECK, J. WECKESSER and H. MAYER.** 1989. Chemical studies on the lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* 10406 and its lipide A region. Arch. Microbiol. **152**: 527-532.

**VALIK L. and F. GÖRNER.** 1995. Effect of water activity adjusted with different solutes on growth and lactic acid production by *Lactobacillus helveticus*. Folia Microbiol. **40**: 472-474.

**VAN GESTEL M., R. MERCKX and K. VLASSAK.** 1996. Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. Soil Biol. Biochem. **28**: 503-510.

**VAN OVERBEEK L.S., L. EBERL, M. GIVSKOV, S. MOLIN and J.D. VAN ELSAS.** 1995. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4202-4208.

**VAN RENSBURG J.H. and B.W. STRIJDOM.** 1980. Survival of fast- and slow growing *Rhizobium* spp under conditions of relatively mild desiccation. Soil Biol. Biochem. **12**: 353-356.

**VANDEPITTE V., P. QUATAERT, H. DE RORE and W. VERSTRAETE.** 1995. Evaluation of the gompertz function to model survival of bacteria introduced into soils. Soil Biol. Biochem. **27**: 365-372.

**VASSE J.M., F.B. DAZZO and G.L. TRUCHET.** 1984. Re-examination of capsule development and lectin-binding sites on *Rhizobium japonicum* 311B110 by the glutaraldehyde/ruthenium red/uranyl acetate staining method. J. Gen. Microbiol. **130**: 3037-3047.

**VÖLKER U., H. MACH, R. SCHMID and M. HECKER.** 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. **138**: 2125-2135.

**WADA M., N. FUKUNAGA and S. SASAKI.** 1991. Aerobic synthesis of unsaturated fatty acids in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain E-3, having two mechanisms for unsaturated fatty acid synthesis. J. Gen. Appl. Microbiol. **37**: 355-362.

**WADA H., Z. GOMBOS and N. MURATA.** 1994. Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **91**: 4273-4277.

**WANG A.-Y., D.W. GROGAN and J.E CRONAN JR.** 1992. Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification and studies of the enzyme active site. Biochemistry. **31**: 11020-11028.

**WEBER F.J., S. ISKEN and J.A.M. DE BONT.** 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. Microbiology. **140**: 2013-2017.

**WEIBGEN U., R. RUSSA, A. YOKOTA and H. MAYER.** 1993. Taxonomic significance of the lipopolysaccharide composition of the biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. System. Appl. Microbiol. **16**: 177-182.

- WELSH D.F.** 1991. Application of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 422-438.
- WELSH D.T. and R.A. HERBERT.** 1993 a. Identification of organic solutes accumulated by purple and green sulphur bacteria during osmotic stress using natural abundance  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 145-150.
- WELSH D.T. and R.A. HERBERT.** 1993b. Osmoadaptation of *Thiocapsa roseopersicina* OP-1 in batch and continuous culture: accumulation of  $\text{K}^+$  and sucrose in response to osmotic stress. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 151-158.
- WESSENDORF J. and F. LINGENS.** 1989. Effect of culture and soil conditions on survival of *Pseudomonas fluorescens* R1 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 97-102.
- WILLIAMSON G., K. DAMANI, P. DEVENNEY, C.B. FAULDS, V.J. MORRIS and B.J.H. STEVENS.** 1992. Mechanism of action of cyclic  $\beta$ -1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: competition between cyclisation and elongation reactions. *J. Bacteriol.* **174**: 7941-7947.
- WILSON M. and S.E. LINDOW.** 1992. Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3908-3913.
- YANCEY P.H., M.E. CLARK, S.C. HAND, R.D. BOWLUS and G.N. SOMERO.** 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**: 1214-1222.
- YOSHIKAWA S., N. MITSUI, K.-I. CHIKARA, H. HASHIMOTO, M. SHIMOSAKA and M. OKASAKI.** 1995. Effect of salt-stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 131-135.
- YOUNG J.P.W. and K.E. HAUKKA.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**: 87-94.
- ZAHRAN H.H., L.A. RASANEN, M. KARSISTO and K. LINDSTRÖM.** 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 100-105.
- ZECHMAN J.M. and L.E. CASEDA, JR.** 1982. Death of *Pseudomonas aeruginosa* in soil. *Can. J. Microbiol.* **28**: 788-794.
- ZIKMANIS P.B., L.P. AUZINA, S.I. AUZANE and M.J. BEKER.** 1982. Relationship between fatty acid composition of lipids and the viability of dried yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 100-103.
- ZWIETERING M.H., I. JONGENBURGER, F.M. ROMBOUTS and K. VAN'T RIET.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1875-1881.

# Annexes



## Annexe 1

Acides gras susceptibles d'être rencontrés chez les bactéries

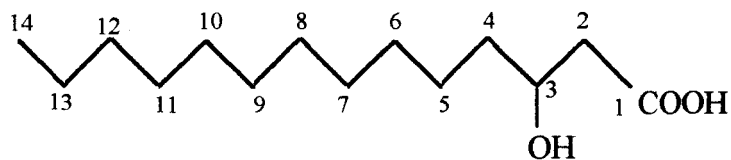
Formule Simplifiée	Nom Systématique	Nom Commun
<b>Saturés</b>		
C10:0	Décanoïque	Caprique
C12:0	Dodécanoïque	Laurique
C14:0	Tétradécanoïque	Myristique
C15:0	Pentadécanoïque	
C16:0	Hexadécanoïque	Palmitique
C17:0	Heptadécanoïque	Margarique
C18:0	Octadécanoïque	Stéarique
<b>Insaturés</b>		
C16:1w7c*	<i>cis</i> -9-Hexadécénoïque	Palmitoléique
C16:1w7t	<i>trans</i> -9-Hexadécénoïque	Palmitélaïdique
C18:1w9c	<i>cis</i> -9-Octadécénoïque	Oléique
C18:1w7c	<i>cis</i> -11-Octadécénoïque	<i>cis</i> -Vaccinique
<b>Branchés</b>		
C11:0 iso	9- Méthyle décanoïque	
C13:0 iso	11-Méthyle dodécanoïque	
C14:0 iso	12-Méthyle tridécanoïque	Isomyristique
C15:0 iso	13-Méthyle tétradécanoïque	
C15:0 anteiso	12-Méthyle tétradécanoïque	
C16:0 iso	14-Méthyle pentadécanoïque	Isopalmitique
C17:0 iso	15-Méthyle hexadécanoïque	Isomargarique
C17:0 anteiso	14-Méthyle hexadécanoïque	Anteismargarique
<b>Cycliques</b>		
C17:0 cyclo 9-10	<i>cis</i> -9,10-Méthylène hexadécanoïque	
C19:0 cyclo 9-10	<i>cis</i> -9,10-Méthylène octadécanoïque	Dihydrostérulique
C19:0 cyclo 11-12	<i>cis</i> -11,12-Méthylène octadécanoïque	Lactobacillique
<b>Hydroxylés</b>		
C10:0 3OH	3-Hydroxydécanoïque	3-Hydroxycaprique
C11: iso 3OH	3-Hydroxy-9-méthyle décanoïque	
C12:0 2OH	2-Hydroxydodécanoïque	2-Hydroxylaurique
C12:1 3OH	3-Hydroxydodécénoïque	
C12:0 3OH	3-Hydroxydodécanoïque	3-Hydroxylaurique
C13: iso 3OH	3-Hydroxy-11-méthyle dodécanoïque	
C13:0 2OH	2-Hydroxytridécanoïque	
C14:0 2OH	2-Hydroxytétradécanoïque	2-Hydroxymyristique
C14:0 3OH	3-Hydroxytétradécanoïque	3-Hydroxymyristique
C15:0 2OH	2-Hydroxypentadécanoïque	
C16:1 2OH	2-Hydroxyhexadécénoïque	
C16:0 2OH	2-Hydroxyhexadécanoïque	2-Hydroxypalmitique
C16:0 3OH	3-Hydroxydécanoïque	3-Hydroxypalmitique
C18:1 2OH	2-Hydroxyoctadécénoïque	

\* « w »: la numérotation s'effectue à partir du groupement CH<sub>3</sub> terminal.

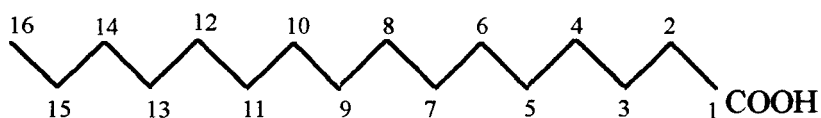
## Annexe 2

Structure de quelques acides gras (ASSELINEAU, 1966)

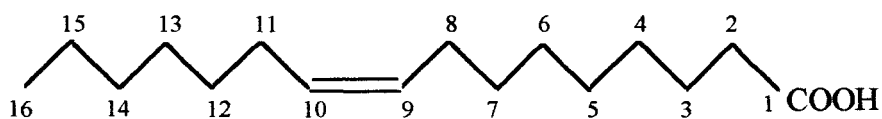
---



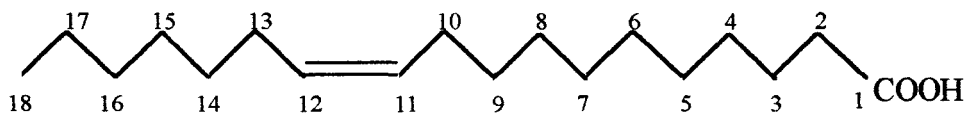
acide 3-Hydroxymyristique (C14:0 3OH)



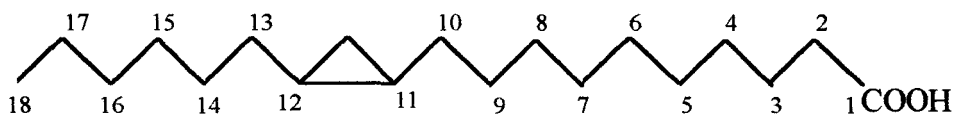
acide palmitique (C16:0)



acide palmitoléique (C16:1w7c)



acide *cis* vaccinique (C18:1w7cis)



acide lactobacillique (C19:0 cyclo 11-12)

---

