

Article de recherche

Reçu: 6 Janvier 2021/Accepté: 17 Janvier 2021

Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches bactériennes nodulant *Acacia ehrenbergiana*

H. Tarek ., S. Amrani

Laboratoire de Biologie du Sol, Faculté des Sciences Biologiques- Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Bab-Ezzouar, Alger

* Auteur correspondant : Tarek.h2021@yahoo.com

ملخص

سمحت لنا دراسة أجريت على 27 سلالة من نبات الريزوبيا المرتبطة بنباتات صغيرة من السنط الأرنبرغي مأخوذة من 9 مواقع طبيعية في الصحراء ، بإظهار أن هذه البقوليات تتغذى من قبل ممثلي 3 أجناس من الريزوبيا هي جنس سينوريزوبيوم و ريزوبيوم و ميزوريزوبيوم. سمح لنا تقييم تأثير الملوحة على نمو هذه السلالات بإظهار أنها تتميز بتحمل عالٍ للإجهاد الملحي وبالتالي فهي تتكيف جيدًا مع ظروف البيئة الصحراوية. إن التعايش بين السنط الأرنبرغي والسلالات المقاومة للملوحة سيحسن مقاومة هذا النوع وعلاج التربة شديدة الملوحة.

الكلمات المفتاحية: السنط الأرنبرغي ، نمو جرثومي ، ملوحة.

Abstract

A study on 27 strains of rhizobia associated with young plants of *Acacia ehrenbergiana* taken from 9 natural sites in the Sahara has allowed us to show that this legume is nodulated by representatives of 3 genera of rhizobia. These are the genus *Sinorhizobium*, *Rhizobium* and *Mesorhizobium*. The evaluation of the effect of salinity (NaCl) on the growth of these strains has allowed us to show that they are characterized by a high tolerance to salt stress and are therefore well adapted to the conditions of the desert environment. The symbiosis between *A. ehrenbergiana* and salinity resistant strains will improve the resistance of this species and remedy highly saline soils.

Keywords: *Acacia ehrenbergiana*, bacterial growth, NaCl, Salinity

Résumé

Une étude portant sur 27 souches de rhizobia associées à de jeunes plants d'*Acacia ehrenbergiana* prélevés à partir de 9 sites naturels au niveau du Sahara nous a permis de montrer que cette légumineuse est nodulée par les représentants de 3 genres de rhizobia. Il s'agit de genre *Sinorhizobium*, *Rhizobium* et *Mesorhizobium*. L'évaluation de l'effet de la salinité (NaCl) sur la croissance de ces souches nous a permis de montrer qu'elles se caractérisent par une tolérance élevée aux stress salin et sont par conséquent bien adaptées aux conditions du milieu désertique. La symbiose entre *A. ehrenbergiana* et des souches résistante à la salinité permettrait d'améliorer la tolérance de cette espèce et de remédier les sols fortement salins.

Mots-clés : *Acacia ehrenbergiana* , croissance bactérienne , NaCl, Salinité.

1. Introduction

La salinité est classée en deux catégories, primaire et secondaire. La première résulte de processus naturels alors que la seconde résulte des activités humaines (Ghassemi et al. 1995 ; Rengasamy 2006). Sur les 1500 millions d'hectares des terres arides cultivées, 2% sont affectés par la salinité secondaire en raison du défrichage ou de l'irrigation (FAO, 2005). La salinité est la concentration de la solution du sol en Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} et NO_3^- (Hu et Schmidhalter, 2004). Dans les régions semi-arides et arides, une faible hygrométrie, une température élevée et une forte vitesse du vent favorisent le mouvement ascendant de la solution du sol et l'accumulation des sels dans les horizons superficiels aggravant ainsi ce phénomène. Dans ces régions, les types de chlorure et sulfate de sels de Na, Mg et Ca sont particulièrement concentrés (FAO 2005).

La salinité des sols est un facteur limitant majeur de la productivité des cultures dans le monde (Tani et al. 2018). En Algérie, cette contrainte caractérise les sols arides et semi-arides et les sols des cultures irrigués (Nedjimi et al. 2014 ; Aissat et al. 2019). Ces sols présentent une diminution continue de leur fertilité (Valdenegro et al. 2001 ; Tani et al. 2018). La salinité inhibe la croissance des plantes par la réduction de leur capacité d'absorption due à l'excès d'ions (effet osmotique) (Munns, 2005). C'est une contrainte majeure car la plupart des espèces cultivées ne sont pas adaptées aux conditions salines (Hu et Schmidhalter, 2004). La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par une légumineuse ligneuse tolérante au sel, comme *Acacia ehrenbergiana*, serait une alternative intéressante pour l'amélioration de la fertilité des sols salins.

Acacia ehrenbergiana est une légumineuse ligneuse parmi les plus abondantes dans les régions désertiques d'Algérie (Le Houérou et Pontanier, 1987). Il s'agit d'un arbuste bien adapté aux conditions du désert et dont l'enracinement profond permet la fixation des sables, favorise l'infiltration de l'eau ainsi que la redistribution des éléments nutritifs dans le sol. Par son effet brise-vent, son ombre, sa litière et son exsudation racinaire, il permet la création et le maintien d'un microclimat et de niches écologiques favorables à la strate herba-

cée ainsi qu'à la microflore tellurique (Ganry et Dommergues, 1995 ; Dommergues et al. 1999). A l'instar de la majorité des légumineuses, *A. ehrenbergiana* est capable de former une symbiose pour la fixation de l'azote atmosphérique avec des BNL (Bactéries nodulantes des Légumineuses) ce qui lui permet d'être une espèce pionnière pour la colonisation des sols pauvres et/ou dégradés, de les enrichir en azote et de jouer ainsi un rôle important dans la succession écologique (Ganry et Dommergues, 1995 ; Dommergues et al. 1999). En raison également de sa pérennité et de son adaptation aux conditions arides, *A. ehrenbergiana* constitue une espèce de choix pour le boisement ou le reboisement en zone saline. Pour ce faire, il est important d'optimiser sa symbiose avec des BNL tolérantes au stress salin.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet de NaCl sur la croissance des bactéries nodulantes *A. ehrenbergiana* en vue de sélectionner les souches les plus performantes. L'association symbiotique de *A. ehrenbergiana* avec les souches sélectionnées permettrait d'améliorer encore plus la tolérance de cette espèce pour remédier les sols fortement salins.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Étude de la prévalence de la symbiose à rhizobia

2.1.1. Échantillonnage

Un échantillon randomisé, constitué de jeunes arbres d'*A. ehrenbergiana* âgés d'environ 12 mois poussant à l'état naturel, a été prélevé au niveau de 9 sites situés dans les Wilayas de Béchar, Tamanrasset et Tindouf (Tableau 1). L'extraction et l'isolement de souches bactériennes ont été réalisés à partir des racines de ces jeunes arbres.

2.1.2 Extraction, isolement et purification des souches

L'extraction des souches de BNL associées à *A. ehrenbergiana* est réalisée dans des conditions

Tableau 1. Localisation et conditions climatiques des sites échantillonnés (étage bioclimatique saharienne).

Wilayas	Sites	Coordonnées	Altitude (m)	Précipitation (mm/an)	Température (°C)
Tamanrasset	Idelès	23°49' 5°55'	1393	7,3	22,3
	Essendilène	24°58' 9°00'	1192	7,3	22,5
	Hirafok	23°39' 5°43'	1507	7,3	22,3
Béchar	Taghit	30°91' -2.03	675	31,3	24
	Zeghamra	29°59' 2°48'	570	31,3	24
	Kerzaz	29°45' -1°41'	442	31,3	24
Tindouf	Tinfouchy	28°51' -5°52'	600	12,4	23,9
	Khorb El Ethel	28°50' -6°21'	562	12,4	23,9
	Naga	29°30' -2°13'	483	12,4	23,9

d'asepsie à partir d'un nodule dont la surface est préalablement stérilisée par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 5,25% pendant 3 mn suivie d'un rinçage dans 5 bains successifs d'eau distillée stérilisée afin d'éliminer les traces d'hypochlorite. Le nodule ainsi traité est écrasé à l'aide d'une tige en verre dans 0,5 ml d'eau physiologique stérilisée (NaCl 8,5‰), pour libérer les bactéroïdes qu'il renferme. L'extraction a été réalisée à partir de trois jeunes arbres nodulés et efficients pour chacun des 9 sites échantillonnés. L'extraction concerne un nodule représentatif du cortège nodulaire par plantule.

L'isolement a été réalisé à partir des aliquotes du broyat qui sont ensemencées sur milieu YEMA gélosé en boîte de Petri. Après trois à huit jours d'incubation à 25° C, les colonies présumées BNL, sont reconnaissables par leur prédominance, leur non absorption du rouge Congo ainsi que par leur aspect gommeux et translucide dû à l'excrétion abondante de polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS).

Pour leur purification, les colonies subissent des repiquages successifs sur milieu YEMA. Les prélèvements bactériens sont réalisés au niveau du primo-isolat, le type colonial prédominant et le plus représentatif. La pureté des isolats obtenus à l'issue de la procédure de repiquages successifs est vérifiée par observation microscopique des cellules à l'état frais et sur des frottis colorés selon la technique de Gram (Vincent, 1970).

Une fois purifiées, les souches isolées sont conservées à -80° C en milieu TY liquide (Tryptone Yeast Agar, Beringer, 1974) additionné de 40% de glycérol pour le souchier maître et à 4° C en tubes à essai sur milieu TY solide incliné pour la sous col-

lection de travail.

2.2. Authentification des isolats

Le rhizobium ne présente pas de caractéristique phénotypique permettant de le distinguer des autres bactéries Gram- du sol. De plus, il est fréquent d'isoler des souches non nodulantes qui peuvent être des contaminants de surface, des endophytes non symbiotiques ou des souches non rhizobiennes (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994 ; Muresu et al. 2008). Ce test demeure le moyen absolu pour l'authentification (Rivas et al. 2009), de plus, la découverte d'espèces de rhizobia non nodulante augmente la valeur de test (Zakhia et Lajudie, 2006 ; Rivas et al. 2009).

Les tests d'authentification consistent à inoculer les isolats nodulaires à des plantules axéniques de leur légumineuse d'origine ou à défaut d'une légumineuse taxonomiquement voisine et vérifier qu'ils sont capables de la re-noduler. Lorsque le test est positif, la souche est considérée comme étant un rhizobia, dans le cas contraire elle est considérée comme un contaminant ou un endophyte.

2.2.1 Obtention des plantules d'*A. ehrenbergiana*

Les plantules axéniques sont issues de graines fournies par l'INRF (station de Tamanrasset). Les graines ont été triées sur la base de la couleur, de la forme et de la taille. Les graines ont été scarifiées par incision à l'aide d'une lame pour lever la dormance tégumentaire. La surface des graines est stérilisée par immersion durant 5 min dans de l'hy-



Figure 1. Germinations d'*Acacia ehrenbergiana* en boîtes de Petri sur un mélange agar/eau.

pochlorite de calcium à 5,25%. Elles sont alors rincées avec de l'eau distillée stérilisée et mises à germer en boîtes de Petri (Figure 1) sur un mélange agar/eau pendant 48 heures dans une étuve réglée à 25° C. Après émergence de la radicule, les plantules sont transférées dans des pots de 300 ml contenant 250 g de substrat (sable de rivière et tourbe : 2v/1v) (Figure 2). Le substrat est stérilisé au préalable à 121° C durant une heure, à trois reprises séparées par un séjour de 48 h à 25°C (Chao et Alexander, 1984).

2.2.2 Inoculation des plantules

Après émergence des plantules, les pots sont inoculés par 3 ml d'une suspension bactérienne obtenue en milieu TY, renfermant environ 108 cellules par ml et placés dans une chambre de culture à 25° C, une photopériode de 8/16 heures et une intensité lumineuse de 12000 Lux. Les pertes en eau résultant de l'évaporation et de l'évapotranspiration

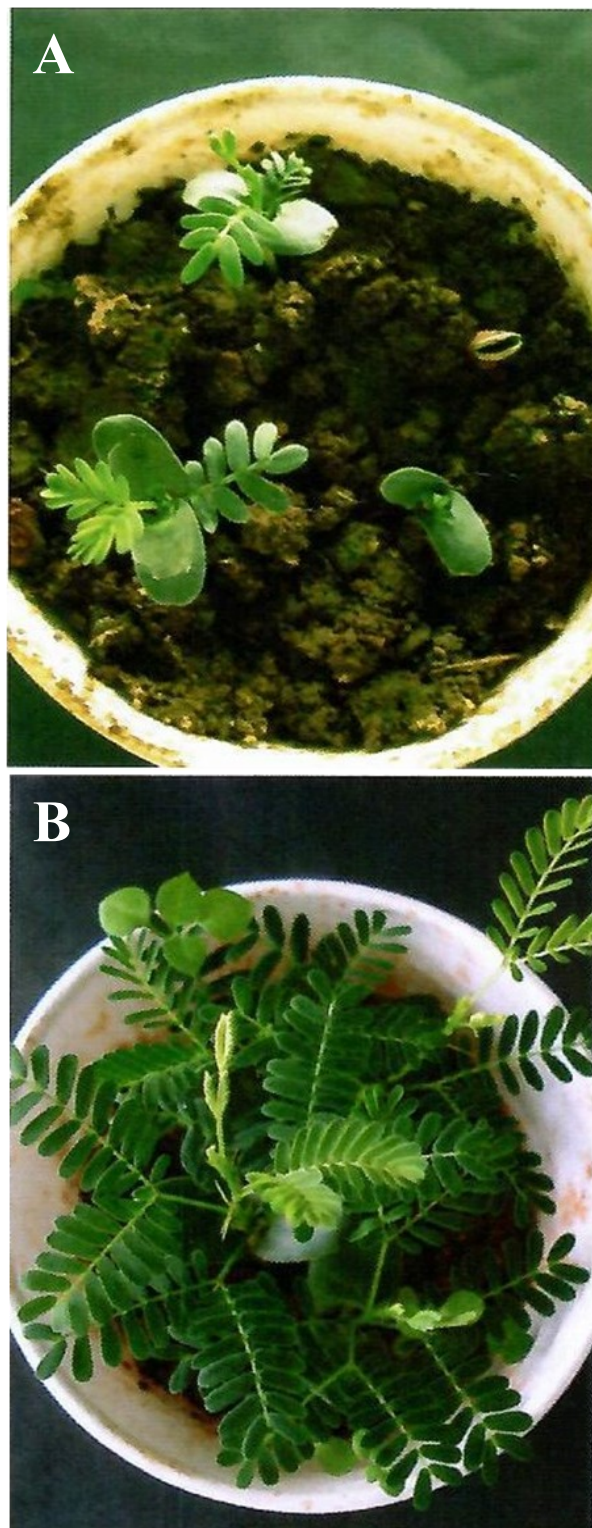


Figure 2. Plantules d'*Acacia ehrenbergiana*, une semaine (A) et 8 semaines (B).

sont déterminées toutes les 48 heures par pesée des pots et compensées par l'addition d'une quantité équivalente d'eau distillée stérilisée.

Les observations ont été réalisées à raison de 3 répétitions par souche comparées aux témoins qui sont des plantules non-inoculées.

La vérification de l'efficacité de la symbiose a été réalisée par l'observation de traces de légghémoglobine au sein des nodosités car cette hémoprotéine n'est produite que par les nodules efficaces facilement discernables à l'œil nu ou à la loupe sur une coupe à main levée. légghémoglobine confère au tissu de la zone centrale des nodules une coloration rose à rouge sombre selon son état d'oxydation. À l'inverse, ces traces sont absentes des nodules inefficaces dont la zone centrale montre alors une coloration blanchâtre ou jaunâtre (Prévost et Antoun, 2006).

3.2. Croissance des rhizobia nodulant à *A. ehrenbergiana*

La vitesse de croissance sera observée sur 27 isolats cultivés sur milieu YEMA à 25° C. la vitesse sera mesurée par la durée d'incubation nécessaire à la formation des colonies visibles à l'œil nu.

La taille de la colonie est mesurée par le diamètre (cm) de celle-ci à l'aide d'un pied à coulisse après 72 heures de l'ensemencement.

Le temps de génération (heure) sera déterminé par extrapolation graphique à partir de la phase exponentielle de croissance de cultures menée à 28° C dans le milieu YEMB. Ce paramètre sera déterminé selon la méthode de Bradford (1976) qui est basée sur la particularité du Bleu de Coomassie qui existe sous deux formes, une forme bleue et une forme rouge. La forme rouge est convertie en forme bleue lorsqu'elle se fixe aux protéines. Cette conversion s'accompagne par une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel dans le jaune (couleur complémentaire du bleu). Le complexe bleu de Coomassie-Protéines a un haut coefficient d'extinction molaire, responsable de la meilleure sensibilité de cette technique comparativement à la méthode de Lowry et al. (1951). En outre, la technique de Bradford est moins sujette aux interférences avec les constituants chimiques et/ou biochimiques présents dans les milieux complexes comme c'est le cas des milieux de culture après avoir supporté, une croissance bactérienne. La fixation du Bleu de Coomassie aux protéines est un processus

très rapide puisqu'elle s'achève en 2-3 minutes. Le complexe Bleu de Coomassie-Protéines reste dispersé dans le mélange réactionnel pendant environ 1 heure.

Un volume de 0,2 ml NaOH est ajouté à volume égal du culot. Le mélange est mis en agitation au vortex pour remettre le culot en suspension et porter le mélange au bain-marie à 100° C pendant 30mn. Pour le dosage, 1ml de réactif au Bleu de Coomassie est ajouté à 0,1 ml d'échantillon pur ou dilué. Le mélange est mis en agitation. Après 3 minutes de l'arrêt de l'agitation, l'absorbance est lue à $\lambda = 595\text{nm}$.

2.4. Effet de la salinité sur la croissance des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont mises en suspension dans le milieu YEMB additionné de 8 concentrations croissantes de NaCl : 0 – 0,2 – 0,6 – 0,8 – 1 – 1,2 – 1,4 et 1,6 M. Après 5 jours d'incubation en agitateur réglé à 25° C et 120 rpm, le niveau de croissance est déterminé par le dosage des protéines cellulaires sur les culots de suspension. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance par rapport aux témoins.

2.5. Logiciel utilisé.

Le logiciel utilisé pour les analyses statistiques est Orln version 4 (Microcal, Etats-Unis).

3. Résultats et discussions

3.1. Prévalence de la symbiose à rhizobia

La plupart des jeunes arbres examinés montrent la présence de nodules sur leur système racinaire. Sur les 45 plants examinés, 96% plants présentent des nodulations. Le nombre moyen maximal de nodules par plant est enregistré pour les 3 sites de Béchar (Taghit, Zeghamra et Kerzaz). Quarante-vingt pour cent (80%) des plantules d'*A. ehrenbergiana* présentent des nodules efficaces (Tableau 2).

Les nodules efficaces sont reconnaissables grâce à la couleur rose à rouge conférée par la présence de légghémoglobine (Figure 3).

Ces résultats montrent que les pools de BNL des sols échantillonnés sont assez riches en souches compétentes pour assurer la nodulation d'*A. ehren-*

Tableau 2. Statut symbiotique des sujets d'*Acacia ehrenbergiana* utilisés dans le cadre de cette étude.

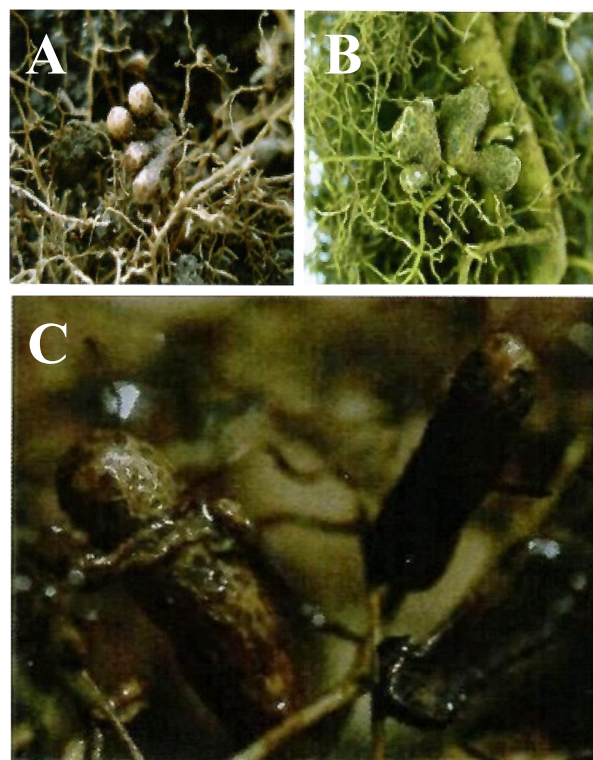
wilayas	Sites	Nombre de Sujet*	Nombre de Sujets nodulés	Nombre de Nodules par sujet	Nombre de sujets efficients
Tamnasset	Idelès	5	5	3,2	5
	Essendilène	5	5	2,8	5
	Hirafok	5	5	4,4	3
Béchar	Taghit	5	5	5,8	5
	Zeghamra	5	5	6,4	5
	Kerzaz	5	5	6,6	5
Tindouf	Tinfouchy	5	4	1,75	3
	Khorb El Ethel	5	5	2,2	3
	Naga	5	4	1,5	3

*sujet : jeunes arbres échantillonnés.

**Figure 3.** Coupe longitudinale d'un nodule coralloïde (Essendilène - W. de Tamanrasset).

bergiana. De plus, ces jeunes arbres sont capables de réduire l'azote moléculaire.

La plupart des nodules observés sur le système racinaire des plants d'*A. ehrenbergiana* sont lignifiés (Figure 4, A, B, C). Cette lignification confère aux légumineuses ligneuses un certain nombre d'avantages par rapport aux herbacées telles qu'une durée de vie plus longue et une activité fixatrice plus efficace dans un environnement stressant (Dommergues et al. 1999).

**Figure 4.** Aspects morphologiques des nodules lignifiés d'*Acacia ehrenbergiana* sur des plants prélevés en milieu naturel. **A** : Nodules racinaires en amas coralloïdes (Essendilène - W. de Tamanrasset). **B** : Nodules racinaires en amas coralloïdes (Tinfouchy - W. de Tindouf). **C** : Nodules racinaires non branchés (Kerzaz - W. de Béchar).

3.2 Authentification des isolats

La ré-inoculation des isolats à des plantules d'*A. ehrenbergiana* en conditions contrôlées nous a per-

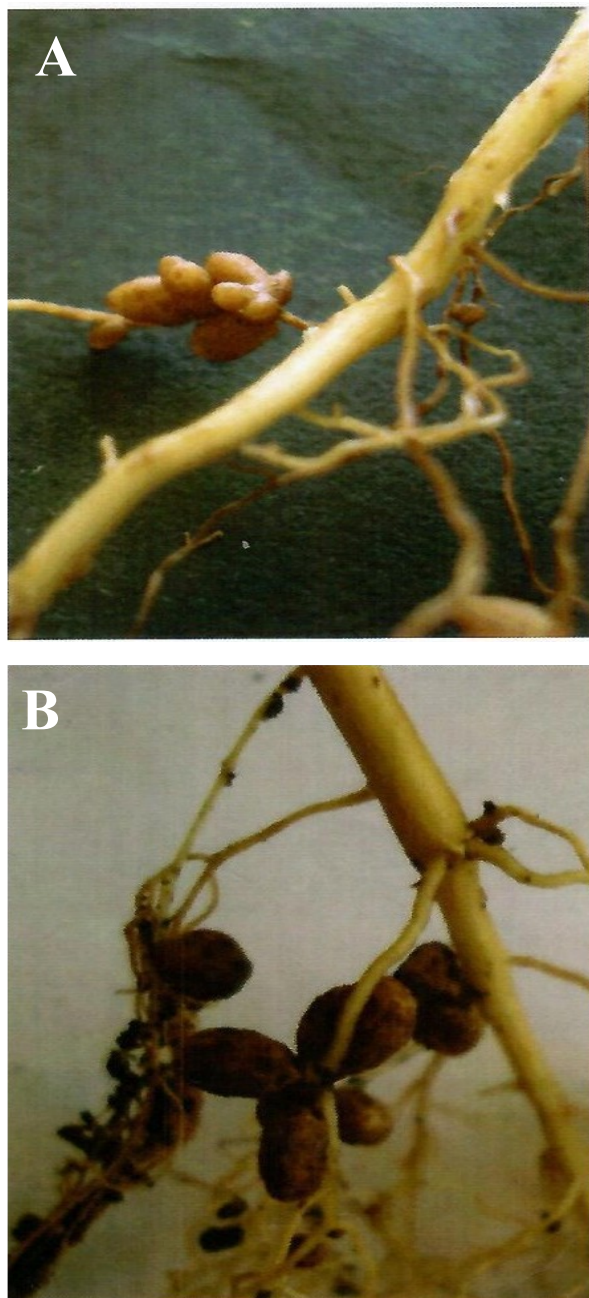


Figure 5 . Nodules racinaires âgés d'environ huit semaines obtenus en laboratoire après inoculation des plantules par la souche EH-ZEG-N3 (A) et la souche EH-ESS-N2 (B).

mis de tous les authentifier comme étant des rhizobia. En effet, elles se sont toutes montrées capables de re-noduler des plantules d'*A. ehrenbergiana* obtenues au laboratoire sur un substrat de culture (sable/tourbe stérilisé) (Figure 5).

Tous les couples symbiotiques obtenus au laboratoire se sont montrés efficaces puisque une coupe longitudinale de leur nodule a montré une zone colorée en rose, en rouge ou en brun qui atteste de la présence en leur sein de légghémoglobine, hémoprotéine qui ne se rencontre que dans les nodules qui fixent effectivement l'azote moléculaire. Ces résultats, au demeurant prévisibles, confirment que les plants d'*A. ehrenbergiana* sont assez sélectifs pour ne contracter la symbiose rhizobiale-légumineuse qu'avec des souches compétentes capables d'assurer non seulement leur nodulation mais aussi de leur conférer la capacité de fixer l'azote moléculaire.

3.3. Croissance des rhizobia nodulant à *A. ehrenbergiana*

Les caractéristiques de croissance de 27 isolats bactériens nodulaires obtenus sont reportées dans le Tableau 3.

La vitesse de croissance la plus élevée enregistrée est celle de EH-TNF-N3. Le temps de génération le plus faible est celui de EH-KHO-N2 alors que le plus élevé est celui de EH-TAG-N1. Les tailles des colonies varient de 0,6 cm (EH-IDE-N2) à 3,1 cm (EH-NAG-N1) (Tableau 3). Toutes les souches présentent une forme de colonie circulaire et une élévation convexe.

La plupart des isolats forment des colonies visibles à l'œil nu après seulement 2 à 3 jours d'incubation à 25° C sur milieu YEMA ce qui indique qu'ils représentent vraisemblablement des rhizobia à croissance rapide (fast growing rhizobia) appartenant aux genres *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. Seulement trois souches (EH-IDE-N2, EH-TAG-N1, EH-TNF-N3) nécessitent 4 à 5 jours d'incubation à 25 °C pour former des colonies visibles à l'œil nu sur milieu YEMA et pourraient de ce fait correspondre à des souches de *Mesorhizobium*, un genre de rhizobia dont les représentants présentent typiquement une vitesse de croissance intermédiaire entre les rhizobia à croissance lente et ceux à croissance rapide (Jarvis et al. 1982 et 1997).

Ces variations de la vitesse d'apparition de colonies visibles à l'œil nu sont confirmées par la détec-

Tableau 3. Caractéristiques de croissance des bactéries nodulant *Acacia ehrenbergiana*.

Wilayas	Sites	Souches	Durées d'incubation* (jours)	Taille des Colonies (cm)	TG sur milieu YEMB (Heure)
Tamanrasset	Idelès	EH-IDE-N1	2	1,8	2,1
		EH-IDE-N2	5	0,6	3,6
		EH-IDE-N3	3	2,1	1,9
	Essendilène	EH-ESS-N1	4	1,1	3,1
		EH-ESS-N2	5	0,7	2,7
		EH-ESS-N3	4	0,9	2,9
	Hirafok	EH-HER-N1	2	2,3	1,8
		EH-HER-N2	2	2,5	1,9
		EH-HER-N3	5	1,7	3,4
Béchar	Taghit	EH-TAG-N1	5	0,7	3,8
		EH-TAG-N2	2	2,9	2,3
		EH-TAG-N3	2	2,7	2,1
	Zeghamra	EH-ZEG.f41	3	1,7	1,8
		EH-ZEG-N2	2	2,5	2,0
		EH-ZEG.f43	2	2,7	1,8
	Kerzaz	EH-KER-N1	3	1,6	2,1
		EH-KER-N2	2	1,4	2,2
		EH-KER-N3	3	1,4	1,9
Tindouf	Tinfouchy	EH-TNF-N1	2	1,9	2,1
		EH-TNF-N2	3	1,7	1,9
		EH-TNF-N3	6	1,1	3,7
	Khorb El Ethel	EH-KHO-N1	3	2,2	1,8
		EH-KHO-N2	3	3,0	1,6
		EH-KHO-N3	2	2,8	1,8
	Naga	EH-NAG-N1	2	3,1	1,9
		EH-NAG-N2	4	1,5	2,8
		EH-NAG-N3	3	1,3	2,6

*Durées d'incubation nécessaire à la formation des colonies visibles à l'œil nu. **TG**: Temps de génération.

mination du temps de génération. En effet, le temps de génération des isolats est variable selon la souche considérée. La souche EH-KHO-N2 est la plus rapide avec un temps de génération de l'ordre de 1,6 heure. La souche EH-TAG-N1 est la plus lente avec un temps de génération de l'ordre de 3,8 heures (Tableau 3).

3.4 Effet de la salinité sur la croissance des souches bactériennes

Les résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des souches bactériennes nodulant *Acacia ehrenbergiana* sont reportés dans le Tableau 4:

L'augmentation de la concentration du milieu YEMB en NaCl se traduit chez l'ensemble des souches examinées par une diminution progressive puis par un arrêt de la croissance des souches. Le niveau de réduction de la biomasse protéique des cultures est variable selon la souche et la concentration du milieu en NaCl (Tableau 4).

Nos résultats indiquent par ailleurs qu'il existe une grande variabilité du niveau de tolérance de nos souches vis-à-vis de la salinité. En effet, la croissance de certaines d'entre elles est totalement inhibée lorsque la concentration du milieu en sel excède 0,6 M dans le cas des souches appartenant aux genres *Rhizobium* et *Mesorhizobium* tandis que

Tableau 4. Effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia associées à *Acacia ehrenbergiana*.

Wilayas	sites	codes	souches	Pourcentage de croissance par rapport aux témoins observé en fonction des concentration du NaCl (M)							
				0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Tamanrasset	Idelès	EH-IDE-N1	<i>E. mefifoti</i>	107,2	101,2	91,2	78,7	50,4	13,1	0	0
		EH-IDE-N2	<i>M. plurifarium</i>	74,6	41,1	17,3	5,4	0	0	0	0
		EH-IDE-N3	<i>E. mefifoti</i>	97,7	87,5	74,6	58,2	37,6	8,4	0	0
	Essendilène	EH-ESS-N1	<i>R. tropici</i>	81,2	48,2	27,5	0	0	0	0	0
		EH-ESS-N2	<i>R. tropici</i>	75,6	33,8	11,6	0	0	0	0	0
		EH-ESS-N3	<i>R. tropici</i>	85,3	37,4	9,7	0	0	0	0	0
	Hirafok	EH-HER-N1	<i>E. mefifoti</i>	93,4	98,3	84,2	61,6	41,2	8	0	0
		EH-HER-N2	<i>E. mefifoti</i>	97,2	98,4	80,6	70,2	47,6	9,3	0	0
		EH-HER-N3	<i>R. tropici</i>	99,1	58,6	29,8	7,8	0	0	0	0
Béchar	Taghit	EH-TAG-N1	<i>M. plurifarium</i>	78,6	53,3	18,7	0	0	0	0	0
		EH-TAG-N2	<i>E. fredii</i>	93,2	87,3	51,4	23,4	5,2	0	0	0
		EH-TAG-N3	<i>E. fredii</i>	97,4	89,2	63,8	32,9	7,1	0	0	0
	Zeghamra	EH-ZEG-N1	<i>E. mefifoti</i>	108,4	117,6	91,2	80,6	56,1	19,8	0	0
		EH-ZEG-N2	<i>E. mefifoti</i>	111,2	107,3	86,8	73,4	44,6	11,5	0	0
		EH-ZEG-N3	<i>E. meliloti</i>	105,8	99,4	93,4	82,2	41,8	10,4	0	0
	Kerzaz	EH-KER-N1	<i>E. freiji</i>	98,3	88,7	76,4	41,5	11,2	0	0	0
		EH-KER-N2	<i>E. freiji</i>	97,9	91,1	78,1	34,7	9,3	0	0	0
		EH-KER-N3	<i>E. freiji</i>	98,2	93,2	66,5	39,1	6,9	0	0	0
Tindouf	Tinfouchy	EH-TNF-N1	<i>E. terangae</i>	92,5	81,4	48,3	18,5	0	0	0	0
		EH-TNF-N2	<i>E. terangae</i>	95,4	84,6	15,1	0	0	0	0	0
		EH-TNF-N3	<i>M. plurifarium</i>	92,2	73,8	37,6	11,2	0	0	0	0
	Khorb El Ethel	EH-KHO-N1	<i>E. meliloti</i>	103,2	108,8	91,1	78,4	60,6	39,7	13,4	0
		EH-KHO-N2	<i>E. mefifoti</i>	98,8	101,8	93,8	83,1	66,4	40,9	22,1	3,7
		EH-KHO-N3	<i>E. meliloti</i>	99	111,3	97,2	88,6	60,5	35,7	9,6	0
	Naga	EH-NAG-N1	<i>E. meliloti</i>	102,3	105,4	95,4	85,8	71,3	61,8	34,1	13,7
		EH-NAG-N2	<i>R. tropici</i>	92,2	78,8	41,5	17,5	0	0	0	0
		EH-NAG-N3	<i>R. tropici</i>	93,2	74,6	36,4	20,3	0	0	0	0

celles appartenant au genre *Sinorhizobium* se sont toutes révélées capables de proliférer aux concentrations du milieu en NaCl égales ou supérieures à 1,0 M avec une limite à 1,6 M, un niveau de salinité considérable pour des bactéries non halophiles. La réduction de croissance la plus importante a été enregistrée pour le genre *Mesorhizobium* suivi par le genre *Rhizobium* alors que pour le genre *Sinorhizobium*, la réduction est presque 3 fois moindre.

Les résultats indiquent que le souchier examiné est relativement tolérant à la salinité. En effet, toutes les souches se sont révélées capables de proliférer en présence de 0,6 mM alors que la limite de tolérance reconnues pour les BNL des régions tempérées d'Europe et d'Amérique du Nord n'excéderait pas 250 mM de NaCl (Breedveld et al. 1990, Pereira et al. 2008, Zahran, 2010). Cette tolérance élevée indique que les sols d'Algérie, pour la plu-

part affectés par la salinité, renferment une proportion élevée de BNL adaptées à ces contraintes. De nombreux auteurs qui ont étudié la tolérance des souches de rhizobia associées à des légumineuses des régions désertiques du Maghreb, du Sahel et d'Inde ont abouti à la même conclusion pour expliquer les niveaux de tolérance particulièrement élevés de leurs souches vis-à-vis du déficit hydrique, de la salinité et de la dessiccation (Brhada et al. 2001, Mahobia et Mahna 2002; Cacciari et al. 2003 ; Essendoubi et al. 2007; Ali et al. 2009).

Parmi tous les rhizobia, ceux appartenant au genre *Sinorhizobium* et plus particulièrement à l'espèce *S. meliloti* sont les plus tolérants à la salinité. Cette tolérance est due à la mise en œuvre par ces bactéries de réponses osmoadaptatives particulièrement efficaces qui mettent en œuvre des

osmolytes compatibles et des osmoprotectants que l'on trouve souvent chez les bactéries halophiles et qui sont relativement rares chez la majorité des eubactéries (Yancey 2005). L'augmentation de la pression osmotique interne peut être rendue possible par l'accumulation de solutés dits compatibles (qui ne sont pas fortement inhibiteurs des processus cellulaires). C'est le cas du potassium (K^+) et de quelques acides aminés (glutamate, proline) ou d'autres composés organiques comme le tréhalose, des polyamines, des oligosaccharides comme les f3 1-2 glucanes cycliques (Botsford 1984, csonka 1989 et 1991 ; Yancey, 2005 ; Vargas et al. 2008).

4. Conclusion

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude indiquent que les jeunes arbres d'*Acacia ehrenbergiana* prélevés au niveau de 9 sites naturels situés dans des zones désertiques (Béchar, Tamanrasset et Tindouf) sont généralement nodulés et fixateurs d'azote. Les résultats indiquent que les conditions du milieu désertique ne constituent pas une limite absolue à la présence de populations rhizobiennes compétentes avec cette espèce ou à l'établissement de la symbiose chez cette dernière. L'évaluation de l'effet de la salinité (NaCl) sur la croissance de souches bactériennes montre qu'elles se caractérisent par une tolérance élevée au stress salin et par conséquent bien adaptées aux conditions du milieu désertique. L'inoculation d'*Acacia ehrenbergiana* avec les souches EH-KHO-N2 ou EH-NAG-N1 permettra d'améliorer encore plus la tolérance de cette espèce au stress salin.

L'amélioration de la productivité dans des conditions de stress salin passe par une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance au stress dont la synthèse d'osmoprotecteurs et d'antioxydantes pour contrôler les dommages cellulaires. L'efficacité de l'interaction *M. arborea*-microorganisme et son adaptation aux contraintes abiotiques par la recherche des meilleures associations *M. arborea*-microorganismes est une voie intéressante qui devrait impliquer un travail pluridisciplinaire entre agronomes, bactériologistes et phytogénéticiens.

Références

- Aissat, A., Mehdadi, Z., Leogrande, R., & Stellacci, A. M. (2019). Characterization of *Medicago arborea* L. Response to Water and Salt Stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 15(4).
- Ali, S. F., Rawat, L. S., Meghvansi, M. K., & Mahna, S. K. (2009). Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 4(1), 13-18.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 84(1), 188-198.
- Botsford, J. L. (1984). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Archives of microbiology*, 137(2), 124-127.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., & Zehnder, A. J. B. (1990). Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. *Microbiology*, 136(12), 2511-2519.
- Brhada, F., Poggi, M., Van de Sybe, G., & Le Rudulier, D. (2001). Osmoprotection mechanisms in rhizobia isolated from *Vicia faba* var. major and *Cicer arietinum*.
- Cacciari, I., Di Mattia, E., Quatrini, P., Moscatelli, M. C., Grego, S., Lippi, D., & De Paolis, M. R. (2003). Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. Un arbre au désert, *Acacia raddiana*. IRD, Paris, 183-200.
- Chao, W. L., & Alexander, M. (1984). Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 94-97.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1), 121-147.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual review of microbiology*, 45(1), 569-606.
- Dommergues, Y., Duhoux, E., & Diem, H. G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. *Espaces* 34.
- Essendoubi, M., Brhada, F., Eljamali, J. E., Filali-Maltouf, A., Bonnassie, S., Georgeault, S., ... & Jebbar, M. (2007). Osmoadaptive responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environmental microbiology*, 9(3), 603-611.
- FAO (2005) Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils.

- FAO land and plant nutrition management service, Rome.
- Ganry, F., & Dommergues, Y. R. (1995). Arbres fixateurs d'azote : champ ouvert pour la recherche.
- Ghassemi, F., Jakeman, A. J., & Nix, H. A. (1995). Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. CAB international.
- Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2004). Limitation of salt stress to plant growth. *Plant toxicology*, 4, 191-224.
- Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., & Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 32(3), 378-380.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895-898.
- Le Houérou, H. N., & Pontanier, R. (1987). Les plantations sylvo-pastorales dans la zone aride de Tunisie. Unesco.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Mahobia, V., & Mahna, S. K. (2002). Characterization of *rhizobia* isolated from *Prosopis cineraria* in Jodhpur region, Rajasthan, India. *NFT News*, 5, 3-5.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., ... & Benguedouar, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable *rhizobia* with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS microbiology ecology*, 63(3), 383-400.
- Nedjimi, B., Mohammedi, N., & Belkheiri, S. (2014). Germination responses of medic tree (*Medicago arborea*) seeds to salinity and temperature. *Agricultural Research*, 3(4), 308-312.
- Pereira, S. I. A., Lima, A. I. G., & Figueira, E. M. A. P. (2008). *Rhizobium leguminosarum* isolated from agricultural ecosystems subjected to different climatic influences: the relation between genetic diversity, salt tolerance and nodulation efficiency. *Soil Ecol. Res. Dev. Nova Science*, New York, 247-263.
- Prevost, D., & Antoun, H. (2006). Root nodule bacteria and symbiotic nitrogen fixation Laval University.
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of experimental botany*, 57(5), 1017-1023.
- Rivas, R., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*, 2, MBI-S3137.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Quantifying the growth of *rhizobia*. In *Handbook for rhizobia* (pp. 47-57). Springer, New York, NY.
- Tani, E., Sarri, E., Goufa, M., Asimakopoulou, G., Psychogiou, M., Bingham, E., ... & Abraham, E. M. (2018). Seedling growth and transcriptional responses to salt shock and stress in *Medicago sativa* L., *Medicago arborea* L., and Their Hybrid (*Alborea*). *Agronomy*, 8(10), 231.
- Valdenegro, M., Barea, J. M., & Azcón, R. (2001). Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for revegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. *Plant Growth Regulation*, 34(2), 233-240.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., & Nieto, J. J. (2008). Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems*, 4(1), 14.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology*, 208(15), 2819-2830.
- Zahran, H. H. (2017). Legume-Microbe Interactions Under Stressed Environments. In *Microbes for legume improvement* (pp. 301-339). Springer, Cham.
- Zakhia, F., & de Lajudie, P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulantes des légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*, 52(3), 169-181.