

# Caractérisation phénotypique d'une collection d'isolats de rhizobium sp. nodulant le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.)

## Phenotypic characterisation of a collection of rhizobium sp. isolates nodulating Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

F. MELKI<sup>1,2</sup>, S. JEDER<sup>1,2</sup>, F. LOUATI<sup>1</sup>, I. NOUAIRI<sup>1</sup>, H. MHADHBI<sup>1</sup>, K. ZRIBI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Légumineuses et Agrosystèmes Durables, Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, BP 901, 2050 Hammam Lif, Tunisie

<sup>2</sup>Faculté des Sciences de Gabès, Université de Gabès, cité Erriadh 6072 Zrig, Gabès, Tunisie

\*Corresponding author: zribi\_k@yahoo.fr

**Abstract-** Fenugreek is a species of the legume's family having several beneficial interests for the soil, agriculture and human health (fodder, edaphic, medical, aromatic and food). This plant is naturally in nitrogen fixing symbiosis in association with *Sinorhizobium meliloti*, its specific rhizobial partner. In this work, we present a phenotypic characterization of a collection of isolates of this plant subjected to two types of stress, metallic and saline. Our results showed that most of the isolates tolerate a concentration of 400 mM NaCl and this tolerance gradually decreases with increasing concentrations. Only four isolates were able to grow at 1.2 M NaCl. Regarding heavy metals (Cadmium, Lead and Zinc), it is important to note that isolates from Gzala soil (soil near a mining site) are relatively more tolerant than those from Mateur one (agricultural soil). These isolates tolerate up to 700 µM Cd, 1.5 mM Zn and 2 mM Pb. Likewise, Gzala soil isolates are capable of producing siderophores.

**Key words:** Heavy metals, rhizobium, Fenugreek, salt stress, fixing nitrogen symbiosis

**Resumé-** Le fenugrec est une plante de la famille des légumineuses rassemblant plusieurs intérêts bénéfiques pour le sol, l'agriculture et la santé humaine (fourrager, édaphique, médical, aromatique et alimentaire). Cette plante mène une symbiose fixatrice d'azote en association avec *Sinorhizobium meliloti*, son partenaire rhizobial spécifique. Dans ce travail, on présente une caractérisation phénotypique d'une collection d'isolats de cette plante soumise à deux types de stress, métallique et salin. Nos résultats ont montré que la plus part des isolats tolèrent une concentration de 400 mM de NaCl et cette tolérance diminue progressivement avec les concentrations ascendantes. Seuls quatre isolats ont pu croître à 1,2 M NaCl. Concernant les métaux lourds (Cadmium, Plomb et Zinc), il est à noter que les isolats du sol Gzala (sol à proximité de site minier) sont relativement plus tolérants que ceux du sol de Mateur (sol d'agriculture). Ces isolats tolèrent jusqu'à 700µM Cd, 1,5 mM Zn et 2 mM Pb. De même ce sont les isolats du sol de Gzala qui sont capables de produire des sidérophores.

**Mots clés :** Métaux lourds, rhizobium, Fenugrec, salinité, symbiose fixatrice d'azote

### 1. Introduction

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) est une plante dicotylédone appartenant à la sous-famille des Papilionacées, famille des légumineuses (= Fabacées). C'est une espèce annuelle qui présente un intérêt et sa culture gagne en importance parmi les épices de graines en raison de sa demande dans le marché international (Anonyme 2009). Elle est cultivée en Inde, qui est le plus grand producteur au monde (Zandi et al. 2015), et dans d'autres régions du monde en raison de ses légumes à feuilles, ses performances aromatiques, ses intérêts médicinaux et la fourniture de fourrages. En outre les graines de fenugrec sont utilisées comme épice pour la préparation de différents plats savoureux (Rai et Yadav 2005). Le fenugrec est devenu l'une des cultures des zones semi-arides qui sont marquées par de multiples stress liés à l'irrégularité des précipitations et la faiblesse de la fertilité des sols (Ali et al. 2012). Comme il est membre de la famille des légumineuses, le fenugrec mène une symbiose fixatrice d'azote avec les bactéries du sol du genre rhizobium en induisant une formation racinaire appelée 'nodule' dans lequel se réalise la réduction de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>). Le fenugrec est majoritairement nodulé par *Sinorhizobium meliloti* (*Ensifer meliloti*) comme d'autre espèce telle que les *Medicago* et *Melilotus* (Jordan 1984). En plus de l'amélioration de la production végétale et la fertilisation des sols, la symbiose légumineuse – rhizobium pourrait être bénéfique pour la remédiation des sols modérément contaminés que ce soit avec des métaux lourds ou avec des contaminants organiques, particulièrement les pesticides. En effet, plusieurs études ont montré que l'association légumineuse–rhizobium pourrait être utile pour ces sols, via les deux processus, la bioremédiation et la fertilisation. En outre

l'établissement de la symbiose va induire la sécrétion des exsudats racinaires qui vont stimuler l'activité microbienne dans le sol ce qui va être bénéfique pour la dégradation et/ou la stabilisation des polluants dans le sol. L'exploitation de la symbiose légumineuse – rhizobium dans le processus de la bioremédiation nécessite en premier lieu l'identification d'une association plante – bactérie performante de point de vue efficacité symbiotique et adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques et en second lieu l'exploration des potentialités des deux partenaires de cette symbiose de tolérer, d'accumuler et/ou de dégrader certains polluants. Par ailleurs, les effets néfastes des métaux lourds sur les communautés microbiennes pourraient se traduire par une diminution de la minéralisation du carbone et de la fixation d'azote et des activités enzymatiques du sol. Par ailleurs la contamination par les métaux lourds entraîne une diminution du nombre et de la biomasse des communautés microbiennes (CFU), ou une augmentation de la fréquence des bactéries résistantes au stress métalliques (Müller et al. 2001). En ce qui concerne les rhizobiums, les effets des métaux lourds peuvent toucher la densité, l'infectivité et la diversité génétique des populations natives des sols contaminés. Une étude faite sur les caractéristiques phénotypiques et génétiques des isolats de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* nodulant *Trifolium pratense* sur un sol contaminé avec du Zn et du Cd, a mis en évidence que le nombre de rhizobium dans ce sol estimé par 'Most Probable Number' (MPN) est similaire à celui d'un sol témoin non contaminé (Delorme et al. 2003). Selon ces auteurs, ceci pourrait être expliqué par la présence de la plante hôte qui peut faciliter aux rhizobiums à échapper des effets toxiques des métaux lourds dans la rhizosphère en lui offrant des 'microniches'. Dans cette même étude tous les isolats du sol contaminé ont été efficaces avec la plante hôte et la diversité génétique n'a pas été influencée par la contamination métallique et a été très élevée suggérant ainsi la probabilité d'un développement de nouveaux mécanismes de résistance aux stress métalliques au lieu d'une sélection de nouveaux génotypes résistants. Un résultat similaire a été observé avec Broos et al. (2005) qui ont montré que la contamination avec le Cd n'affecte pas la survie des *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Cependant dans le même travail la contamination avec le Zn a affecté négativement la survie des rhizobiums, ceci a été confirmé par une récente étude sur le même partenaire bactérien sur des sols contaminés avec le Zn, le Cd et Cu (Stan et al. 2011). Dans ce travail on explore la variabilité de réponse des isolats de rhizobium sp. nodulant le fenugrec sur un sol agricole et un sol contaminé vis-à-vis du stress métallique et salin ainsi que leurs capacités à produire des sidérophores.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Isolement des bactéries

Le fenugrec (cv. Rayhan) a été cultivé sur deux types de sols, un sol d'agriculture provenant de la région de Mateur (M) (37° 2' 24" Nord 9° 39' 59" Est de Tunisie) et un sol contaminé issu de la région de Gzala (G) (37°04'13,6" Nord 9°31'38,4" Est de Tunisie) à proximité d'un site minier. La récolte des plantes de fenugrec a été effectuée après 45 jours (stade floraison) et les nodules de couleur rose à blanchâtre claires ont été prélevés afin d'isoler les souches de rhizobiums nodulant cette plante. Les nodules ont été désinfectés superficiellement avec du HgCl<sub>2</sub> pendant deux minutes puis rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, ils sont écrasés soigneusement à l'aide d'une pince stérilisée, et le macérât de nodule est strié dans des boîtes de Pétrie contenant un milieu YEMA (Vincent 1970). Trois jours après l'incubation dans l'étuve à 28°C, les colonies bactériennes ont été isolées puis purifiées par des repiquages successifs (chaque 48 h d'intervalle). Après la purification, les isolats ont été conservés dans du glycérol 20% à - 80°C. Il est à noter que l'étape de la purification des isolats nodulaires se fait selon un principe essentiel, c'est la purification du type de colonie majoritaire, étant donné que ce type représente l'espèce de rhizobium qui occupe la nodosité. Les isolats récupérés ont été ré-inoculés à la plante hôte : le fenugrec, pour la confirmation de leur aptitude à former des nodules sur les racines de cette plante.

### 2.2. Test de tolérance aux métaux lourds

Le but de ce test est de distinguer les bactéries qui sont tolérantes et celles qui sont plus sensibles aux différentes concentrations de Cadmium (Cd), Plomb (Pb) et Zinc (Zn). Des colonies bactériennes ont été cultivées dans le milieu de culture YEM et incubées pendant 48 H à 28°C sous agitation permanente. Chaque suspension bactérienne a été ensemencée sur le milieu YEMA additionné de concentrations croissantes de métaux. PbCl<sub>2</sub>: C1 = 0,25 mM; C2 = 0,5 mM; C3 = 0,75 mM; C4 = 1 mM; C5 = 1,25 mM; C6 = 1,5 mM; C7 = 1,75 mM et C8 = 2 mM.

CdCl<sub>2</sub>: C1 = 100 µM; C2 = 200 µM; C3 = 300 µM; C4 = 400 µM; C5 = 500 µM; C6 = 600 µM; C7 = 700 µM et C8 = 800 µM.

ZnSO<sub>4</sub>: C1 = 0,25 mM; C2 = 0,4 mM; C3 = 0,5 mM; C4 = 0,6 mM; C5 = 0,75 mM; C6 = 0,9 mM; C7 = 1 mM et C8 = 1,5 mM.

Un témoin positif (un milieu sans métal et inoculé avec des souches bactériennes) a été utilisé comme référence. Les boîtes de Pétrie ont été incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

### 2.3. Production de sidérophores

La production des sidérophores par les souches bactériennes a été testée qualitativement selon la méthode universelle élaborée par Schwyn et Neilands (1987) sur un milieu CAS (Chrome Azurol Sigma-Aldrich). Des puits ont été perforés sur le milieu CAS et remplis par 100 µl de chaque suspension bactérienne puis incubés à l'obscurité 28°C pendant deux jours. Les résultats positifs ont été indiqués par la formation d'un halo jaune orangé autour des colonies.

### 2.4. Test de salinité

Pour chaque souche bactérienne choisie, on a préparé le milieu YEMA additionné de différentes concentrations de NaCl (0 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1M, 1,2 M). Ensuite, les bactéries ont été incubées à 28°C. Le suivi de la croissance bactérienne a été fait par la croissance des bactéries chaque 24h pendant trois jours. Trois répétitions ont été considérées pour chaque concentration de NaCl avec un témoin sans sel.

## 3. Résultats

### 3.1. Tolérance au Zinc

Les résultats ont montré que tous les isolats tolèrent jusqu'à 0,4 mM Zn. A partir de la concentration de 0,5 mM, l'effet du Zn devient plus prononcé et particulièrement chez les isolats de Mateur (Tableau 1). Trois isolats de chaque sol ont pu tolérer la concentration de 1 mM Zn alors que seuls trois isolats du sol de Gzala ont pu croître sur un milieu de culture avec 1,5 mM Zn.

**Tableau 1:** Estimation visuelle de la réponse d'une collection d'isolats de symbiotes de fenugrec aux différentes concentrations ascendantes (mM) de Zinc sur un milieu de culture YEMA. G: isolat piégé sue le sol de Gzala, M: isolat piégée sur le sol de Mateur.

N°	Isolats	0	0,25	0,4	0,5	0,6	0,75	0,9	1	1,5
1	G1	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	G2	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
3	G3	(+)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(-)	(-)
4	G4	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(-)	(-)
5	G5	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
6	G6	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	G7	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
8	G8	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	G9	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	G10	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
11	G11	(++)	(+)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	G12	(++)	(+)	(+-)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	G13	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	G14	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	G17	(++)	(+)	(+)	(+--)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
16	G18	(++)	(+)	(+)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	G19	(++)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	M1	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
19	M2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
20	M4	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	M6	(++)	(+-)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	M7	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	M8	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	M9	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)
25	M13	(++)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	M14	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	M18	(++)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M20	(++)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	M22	(++)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)
30	M25	(++)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)
31	M27	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	M29	(++)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	M32	(++)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	M34	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	M37	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	M42	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(++): croissance très forte; (+): croissance forte; (+-): croissance moyenne; (+--): croissance faible; (-): absence de croissance

### 3.2. Tolérance au Cadmium

Tous les isolats testés tolèrent jusqu'à 400µM Cd à l'exception d'un seul isolat originaire du sol de Mateur (M42) qui ne dépasse pas la concentration de 100µM (Tableau 2). La concentration 500µM a été différentielle entre les isolats provenant des deux sols. En effet parmi les 12 isolats poussant sur cette concentration, 11 sont originaire du sol de Gzala et l'autre est originaire du sol de Mateur. La concentration 600 µM a été létale pour les isolats testés à l'exception de deux isolats de Gzala et un seul isolat (G2) a pu croître à la concentration 700 µM.

### 3.3. Tolérance au Plomb

Tous les isolats testés tolèrent jusqu'à 0,75 mM Pb alors qu'avec 1 mM, six isolats (deux du sol de Gzala et quatre du sol de Mateur) n'ont pas pu croître sur ce milieu. Avec la concentration finale, 2 mM Pb, seuls quatre isolats de Gzala et deux isolats de Mateur ont pu croître (Tableau 3).

**Tableau 2:** Estimation visuelle de la réponse d'une collection d'isolats de symbiotes de fenugrec aux différentes concentrations ascendantes (µM) de Cadmium sur un milieu de culture YEMA. G: isolat piégé sue le sol de Gzala, M: isolat piégée sur le sol de Mateur.

N°	Isolats	0	100	200	300	400	500	600	700
1	G1	(++)	(++)	(++)	(+-)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
2	G2	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+-)
3	G3	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
4	G4	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
5	G5	(++)	(++)	(+)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
6	G6	(++)	(++)	(+)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
7	G7	(++)	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)
8	G8	(++)	(++)	(+)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)
9	G9	(++)	(+++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	G10	(++)	(++)	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)
11	G11	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+-)	(-)	(-)
12	G12	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+-)	(-)	(-)
13	G13	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
14	G14	(++)	(+)	(+--)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)
15	G17	(++)	(+++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+-)	(-)
16	G18	(++)	(++)	(++)	(+)	(+-)	(-)	(-)	(-)
17	G19	(++)	(+)	(+)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
18	M1	(++)	(++)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	M2	(++)	(++)	(+-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	M4	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(+-)	(-)	(-)
21	M6	(++)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	M7	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	M8	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)
24	M9	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)
25	M13	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	M14	(++)	(++)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)
27	M18	(++)	(++)	(+)	(+--)	(+--)	(-)	(-)	(-)
28	M20	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	M22	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)
30	M25	(++)	(++)	(+)	(+-)	(+-)	(-)	(-)	(-)
31	M27	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	M29	(++)	(++)	(+)	(+)	(+-)	(-)	(-)	(-)
33	M32	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	M34	(++)	(++)	(+)	(+)	(+-)	(-)	(-)	(-)
35	M37	(++)	(++)	(+-)	(+-)	(+--)	(-)	(-)	(-)
36	M42	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+++): croissance très forte; (+): croissance forte; (+-): croissance moyenne; (+--): croissance faible; (-): absence de croissance

**Tableau 3:** Estimation visuelle de la réponse d'une collection d'isolats de symbiotes de fenugrec aux différentes concentrations ascendantes (mM) de Plomb sur un milieu de culture YEMA. G: isolat piégé sue le sol de Gzala, M: isolat piégée sur le sol de Mateur.

N°	Isolats	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
1	G1	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(+ -)
2	G2	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)
3	G3	(++)	(++)	(++)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	G4	(++)	(+++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	G5	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	G6	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	G7	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	G8	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ - -)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	G9	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	G10	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)
11	G11	(++)	(++)	(++)	(+ -)	(+ - -)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	G12	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	G13	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ - -)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	G14	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+ -)
15	G17	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+ -)	(+ -)	(-)	(-)
16	G18	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	G19	(++)	(++)	(++)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	M1	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	M2	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ - -)
20	M4	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+ -)	(+ - -)	(-)	(-)
21	M6	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	M7	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ - -)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	M8	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	M9	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	M13	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	M14	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	M18	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M20	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	M22	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+ -)	(+ - -)	(-)	(-)
30	M25	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ -)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	M27	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+ - -)	(-)
32	M29	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)
33	M32	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	M34	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	M37	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	M42	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

(++): croissance très forte; (+): croissance forte; (+-): croissance moyenne; (+- -): croissance faible; (-): absence de croissance

### 3.4. Tolérance au stress salin

La soumission des isolats de fenugrec à différentes concentrations de NaCl a mis en évidence que la majorité des isolats ont toléré 400 mM (Tableau 4). L'effet de 600 mM a été remarquable sur les isolats testés, du fait que seulement 14 isolats parmi 36 ont poussé sur le milieu de culture. Uniquement quatre isolats ont toléré les trois concentrations 800 mM, 1 M et 1,2 M, qui sont G3 et G6 provenant de sol de Gzala et M1 et M32 du sol de Mateur.

**Tableau 4:** Estimation visuelle de la réponse d'une collection d'isolats de symbiotes de fenugrec aux différentes concentrations ascendantes (mM) de Zinc sur un milieu de culture YEMA. G: isolat piégé sue le sol de Gzala, M: isolat piégée sur le sol de Mateur.

N°	isolats	0	400	600	800	1000	1200
1	g1	++	-	-	-	-	-
2	g2	+	+	-	-	-	-
3	g3	+	+	+	+	+	+
4	g4	++	+	+	-	-	-
5	g5	+	+	-	-	-	-
6	g6	+	+	+	+	+	+
7	g7	++	+	+	-	-	-
8	g8	++	+	+	-	-	-
9	g9	++	+	+	-	-	-
10	g10	++	+	+	-	-	-
11	g11	+	+	+	-	-	-
12	g12	++	+	-	-	-	-
13	g13	+	+	-	-	-	-
14	g14	++	-	-	-	-	-
15	G17	++	+	-	-	-	-
16	G18	+	+	+	+	+	-
17	G19	++	-	-	-	-	-

18	M1	++	+	+	+	+	+
19	M2	+	+	+	-	-	-
20	M4	++	+	-	-	-	-
21	M6	++	+	-	-	-	-
22	M7	++	+	-	-	-	-
23	M8	++	+	-	-	-	-
24	M9	++	+	-	-	-	-
25	M13	++	+	+	-	-	-
26	M14	++	+	-	-	-	-
27	M18	++	+	-	-	-	-
28	M20	++	+	-	-	-	-
29	M22	++	+	-	-	-	-
30	M25	++	+	+	+	+	-
31	M27	++	-	-	-	-	-
32	M29	++	+	-	-	-	-
33	M32	++	+	+	+	+	+
34	M34	++	+	-	-	-	-
35	M37	++	+	-	-	-	-
36	M42	++	-	-	-	-	-

(++): croissance très forte; (+): croissance forte; (+-): croissance moyenne; (+--): croissance faible; (-): absence de croissance

### 3.5. Production de sidérophores

Parmi les 36 isolats testés, seuls 12 isolats (11 isolats du sol de Gzala et un seul isolat de Mateur) isolats ont pu produire des sidérophores sur le milieu de culture utilisé (Tableau 5). Les résultats montrent que les isolats du sol de Gzala sont qualitativement et quantitativement plus aptes à produire les sidérophores sur le milieu de culture utilisé.

**Tableau 5** : Estimation visuelle de la production de sidérophores d'une collection d'isolats de symbiotes de fenugrec sur un milieu de culture approprié. G: isolat piégé sue le sol de Gzala, M: isolat piégée sur le sol de Mateur.

N°	Isolats	Colonie	Diamètre cm, j1	Diamètre cm, j2
1	G1	(-)	0	0
2	G2	(++)	2,1	2,2
3	G3	(-)	0	0
4	G4	(+)	1,2	1,9
5	G5	(+-)	0	1
6	G6	(+-)	0	1
7	G7	(+)	1,2	3
8	G8	(++)	2,2	2,5
9	G9	(+)	1,2	2
10	G10	(++)	2,1	2,1
11	G11	(-)	0	0
12	G12	(-)	0	0
13	G13	(-)	0	0
14	G14	(-)	0	0
15	G17	(-)	0	0
16	G18	(++)	2,4	2,5
17	G19	(-)	0	0
18	M1	(-)	0	0
19	M2	(+)	1,3	1,7
20	M4	(-)	0	0
21	M6	(-)	0	0
22	M7	(-)	0	0
23	M8	(-)	0	0
24	M9	(-)	0	0
25	M13	(+)	1,3	1,8
26	M14	(-)	0	0
27	M18	(-)	0	0
28	M20	(-)	0	0
29	M22	(-)	0	0
30	M25	(-)	0	0
31	M27	(-)	0	0
32	M29	(-)	0	0
33	M32	(-)	0	0
34	M34	(-)	0	0
35	M37	(-)	0	0
36	M42	(+)	1,3	1,7

(++): croissance très forte; (+): croissance forte; (+-): croissance moyenne; (+--): croissance faible; (-): absence de croissance



#### 4. Discussion

Plusieurs travaux de recherche ont porté sur la réponse des rhizobiums vis-à-vis des stress métallique, biotique, antibiotiques, salin et hydrique (Chaud et al. 2000; Abbas and Kamel 2004; Degefu et al. 2018). Ces études se sont basées sur la certitude que les rhizobiums ayant des potentialités de tolérance pourraient être bénéfiques pour la symbiose légumineuse-rhizobium sur les sols salins ou les sols contaminés et même contre les attaques biotiques. Dans ce cadre, Mrabet et al. (2011) ont mis en évidence que certaines souches de *Sinorhizobium meliloti* peuvent protéger *Medicago truncatula* contre les attaques fongiques du *Phoma medicaginis* en réduisant sa croissance de 60%. Ces effets avantageux des rhizobiums ont été répertoriés chez les souches tolérantes au stress salin (Dhan et al. 2012a), les souches tolérantes au Cuivre (Nouairi et al. 2015) et les souches tolérantes au Zinc (Zribi et al. 2015). Dans ce travail, on teste les isolats de fenugrec contre certains métaux lourds (le Cd, le Pb et le Zn), le stress salin et la formation des sidérophores. Il est connu que cette plante est nodulée par le *Sinorhizobium meliloti*.

Les résultats montrent que la quasi-totalité des isolats testés tolèrent jusqu'à 0,4 mM Zn et trois isolats tolèrent jusqu'à 1,5 mM. Par ailleurs Zribi et al. (2012) ont montré qu'environ 18% des souches testées de *S. meliloti* nodulant *Medicago sativa* tolèrent jusqu'à 2,5 mM de Zn. La bibliographie concernant le comportement des rhizobiums vis-à-vis du Zinc montre une variabilité de réponse selon les sols d'origine et la plante hôte. En effet des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* collectés du *Vicia faba* ne dépassent pas 1 mM de Zn (Abdel-lateif 2017). Nos résultats montrent que les trois isolats qui ont pu tolérer la concentration maximale utilisée (1,5 mM) sont originaires du sol de Gzala, collecté à proximité d'un ancien site minier riche en Zinc en comparaison avec le sol Mateur provenant d'un site agricole (Zribi et al 2012). Ceci pourrait suggérer une certaine adaptation des populations naturelles de rhizobium avec les caractéristiques chimiques et physiques des sols. Dans ce sens, Grison et al. (2015) ont mis une évidence une nouvelle souche de rhizobium, isolée de l' *Anthyllis vulneraria* Zn-hyper-accumulateur qui peut tolérer jusqu'à 35 mM.

Le Zinc comme la plupart des métaux de transition fonctionnent comme cofacteurs essentiels dans les voies métaboliques et sont nécessaires à la croissance microbienne. Toutefois, lorsque ces éléments dépassent un seuil bien déterminé, ils peuvent entraîner des effets néfastes chez les bactéries, y compris l'inhibition enzymatique, l'hydrolyse des biopolymères et des réactions incontrôlées d'oxydo-réduction au sein de la cellule.

Bien que le Zn à faible dose, soit un élément essentiel pour la survie et la croissance des bactéries, le Cd est un élément néfaste aux bactéries même à très faible dose car il n'a aucun rôle biologique connu pour les êtres vivants (Nies 2007). Dans notre travail, les isolats de rhizobium du fenugrec tolèrent jusqu'à 500 µM de Cd et un seul isolat a pu tolérer 700 µM de Cd. Des isolats de *Medicago sativa* ont toléré des concentrations similaires de Cd (Zribi et al. 2012). Le seul isolat qui a pu tolérer la concentration maximale (originaire du sol de Gzala) pourrait être considéré comme tolérant au Cd. En fait les bactéries tolèrent le Cd par son expulsion de la cellule bactérienne à travers des transporteurs de cations avec différents mécanismes (Anton et al. 1999). Il semble que les populations naturelles de rhizobiums originaires des sols relativement contaminés ou à proximité des sites miniers ou des sites industriels ont accueilli une certaine tolérance vis-à-vis des métaux lourds. Ferreira et al. (2018) ont découvert des souches de rhizobiums isolées sur des plantes de *Vicia sativa* cultivées sur des sols issus des mines de charbon, qui peuvent tolérer jusqu'à 3 mM de Cd. La tolérance au Cd pourrait être aussi liée à une base génétique où des séquences similaires à *cadA* et *cadC* ont été identifiés chez *R. leguminosarum* (Reeve et al. 2010) et *Mesorhizobium* sp.

Concernant la réponse au Pb, les résultats montrent que cinq isolats ont toléré la concentration maximale de Pb (2 mM), quatre parmi eux sont originaire du sol de Gzala. Cette même concentration a été tolérée par deux souches parmi 10 souches de *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolées sur *Vicia faba* sur différents sols égyptiens (Abdel-lateif 2017). La tolérance au Pb peut aller jusqu'à 3 mM avec des souches originaire des sites contaminés (Pereira et al. 2006).

Dans ce travail on a associé l'étude de la réponse des isolats de rhizobiums aux métaux lourds à l'étude de la réponse à au stress salin. Les isolats tolérants aux stress métallique ne montrent pas les mêmes potentialités vis-à-vis le stress salin et vice versa. En effet il serait motivant d'avoir des isolats multi-tolérants et efficaces avec leurs plantes hôte. Plusieurs travaux de recherches ont mis en évidence que la salinité du sol favorise la mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol (Violante et al. 2010).

Par ailleurs la sélection des souches tolérantes au stress salin s'avère importante car elle pourrait améliorer la fixation symbiotique d'azote essentiellement l'étape de l'infection racinaire (Mhadhbi et al. 2008). Il a été démontré que les rhizobiums tolérants au stress améliorent la productivité des plantes

dans les sols salins et leurs effets bénéfiques sont liés à une accumulation plus élevée d'osmolytes (Dodd et Perez-Alfocea 2012).

Dans notre travail certains isolats de fenugrec peuvent tolérer jusqu'à 1.2 M NaCl, ce qui représente une potentialité importante de tolérance au stress salin. Il est à noter que *S. meliloti* est considéré parmi les espèces les plus tolérantes au stress salin et qui peut tolérer jusqu'à 1000 mM NaCl (Trabelsi et al. 2010). Par ailleurs Dhane-Fitouri et al. (2012) ont montré que les rhizobiums isolés de nodosités de *Sulla coronaria* tolèrent uniquement jusqu'à 700 Mm NaCl.

Un autre paramètre qui a été investigué dans ce travail, c'est la capacité des isolats de fenugrec à produire les sidérophores. Nos résultats ont mis en évidence que les isolats du sol contaminés de Gzala sont de meilleurs producteurs de sidérophore sur le milieu de culture. Les rhizobiums dans le sol sont en symbiose avec les différentes espèces de légumineuses, ce système favorise la sécrétion par multiples types de composés par les rhizobiums en réponse à la plante hôte et aussi aux conditions environnementales (Zahran 1992). Dans ce travail, on a examiné la sécrétion des sidérophores qui sont des composés organiques à faible masses moléculaires produites par des micro-organismes et des plantes poussant dans des conditions de faible teneur en fer. La fonction principale de ces composés est de chélater le fer ferrique [Fe (III)] et ainsi le rendre disponible pour cellules microbiennes et végétales. Il est à noter que la production de sidérophores est un critère discriminatoire entre les bactéries et même entre les souches de la même espèce bactérienne. En fait Berraho et al. (1997) ont montré que seulement deux souches parmi 53 souches testées de *R. ciceri* spécifique de pois chiche ont pu produire des sidérophores sur un milieu limité en fer.

## 5. Conclusion

La caractérisation phénotypique basée sur la tolérance à certains métaux lourds d'une collection de 36 isolats de fenugrec a montré que les isolats les plus tolérants aux métaux lourds testés sont originaires du sol contaminé ce qui pourrait être justifié par l'acquisition de ces rhizobiums d'une tolérance sur ces sols pollués. De même la production des sidérophores a été relativement restreinte aux isolats du sol contaminé. Par contre la réponse au stress salin n'était pas liée à l'origine des sols et les résultats ont révélé quelques isolats fortement tolérants. Le suivi de ce travail sera l'identification moléculaire des isolats et la caractérisation génétique des souches d'intérêt. En parallèle, les souches tolérantes vont être testées au niveau de leur efficacité symbiotique avec leur plante hôte.

## Références

- Abbas SM, Kamel EA (2004)** *Rhizobium* as a biological agent for preventing heavy metals stress. Asian J Plant Sci 3(4): 416-424.
- Abdel-lateif KS (2017)** Isolation and characterization of heavy metals resistant Rhizobium isolates from different governorates in Egypt. Afr J Biotechnol 16(13): 643-647.
- Ali SF, Lal G, Aishwath O, Chahar O, Choudhary S, Mathews C, Anwar M (2012)** Possibilities and potential of rhizobial inoculants in organic production of fenugreek in arid and semiarid regions of Rajasthan. Int J Seed Spices 39-45.
- Anonyme (1999)** Who monographs on selected medicinal plants. Vol III, World Health Organization, Geneva, pp 338-48.
- Anton A, Grosse C, Reissmann C, Pribyl T, Nies DH (1999)** Czcd is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. J Bacteriol 181:6876-6881.
- Berraho EL, Lesueur D, Diem HG, Sasson A (1997)** Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium. World J Microbiol Biotechnol 13: 501-510.
- Broos K, Beyens H, Smolders E (2005)** Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biol Biochem 37: 573-579.
- Chaudri AM, Allain CMG, Barbosa-Jefferson VL, Nicholson FA, Chambers BJ, McGrath SP (2000)** A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. Plant Soil 221: 167-179.
- Degefu T, Wolde-meskel E, Adem M, Fikre A, Amede T, Ojiewo C (2018)** Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) growing in Ethiopia. Afr J Biotechnol 17(6): 167-177.
- Delorme CA, Gagliardi JV, Angle JS, van Berkum P, Chaney RL (2003)** Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of Clover grown in a Zinc and Cadmium contaminated soil. Soil Sci Soc Am J 67: 1746-1754.



- Dhane Fitouri S, Trabelsi D, Saïdi S, Zribi K, Ben Jeddi F, Mhamdi R (2012)** Diversity of rhizobia nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Ann Microbiol* 62: 77-84.
- Dodd IC, Perez-Alfocea F (2012)** Microbial amelioration of crop salinity stress. *J Exp Bot* 63 3415-3428.
- Ferreira PAA, Dahmer SFB, Backes T, Silveira AO, Jacques RJS, Zafar M, Pauletto EA, Santos MAO, Silva K, Giachini AJ, Antonioli ZI (2018)** Isolation, characterization and symbiotic efficiency of nitrogen fixing and heavy metal-tolerant bacteria from a coalmine wasteland. *Rev Bras Cienc Solo* 42: e0170171.
- Gordon SA, Weber RP (1951)** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192-195.
- Grisson CM, Jackson S, Merlot S, Dobson A, Grison C (2015)** *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 1525-1530.
- Jordan DC (1984)** Family III. Rhizobiaceae Conn 1938 p 234-254. In: NR Kreig and JH Holt (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1 The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Mhadhbi H, Jebara M, Zitoun A, Limam F, Aouani ME (2008)** Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia associations. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1027-1035.
- Mrabet M, Abdellatif E, Zribi K, Mhamdi R, Djebali N (2011)** *Sinorhizobium meliloti* can protect *Medicago truncatula* from infection by *Phoma medicaginis*. *Phytopathol Mediterr* 50: 183-191.
- Muller AK, Rasmussen LD, Sorensen SJ (2001)** Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiol Lett* 101(24): 1-5.
- Nies DH (2007)** Bacterial transition metal homeostasis, p. 118-142. In D. H. Nies and S. Silver (ed.), *Molecular microbiology of heavy metals*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Pereira SIA, Lima AIG, Figueira EMAP (2006)** Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy metal contamination: effect on protein expression. *Appl Soil Ecol* 33: 286-293.
- Rai N, Yadav DS (2005)** *Advances in vegetable production*, Research Book Centre, New Delhi: 878-886.
- Reeve W, O'Hara G, Chain P et al (2010)** Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Stand Genom Sci* 2: 66-76.
- Schwyn B, Neilands JB (1987)** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160: 47-56.
- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M (2008)** Characterization of Heavy Metal-resistant endophytic bacteria from Rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut* 156(3): 1164-1170.
- Stan V, Gament E, Cornea CP, Voaides C, Dusa M, Plopeanu G (2011)** Effects of heavy metal from polluted soils on the Rhizobium diversity. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 39: 88-95.
- Trabelsi D, Mengoni A, Aouani ME, Bazzicalupo M, Mhamdi R (2010)** Genetic diversity and salt tolerance of *Sinorhizobium* populations from two Tunisian soils. *Ann. Microbiol* 60: 541-547.
- Vincent, JM (1970)** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Violante A, Cozzolino V, Perelomov L, Caporale AG, Pigna M (2010)** Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J Soil Sci Plant Nutr* 10(3): 268-292.
- Zahrán HH (1999)** Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *American Society for Microbiology (ed.) Microbiol Mol Biol Rev* 63(4): 968-989.
- Zandi P, Basu SK, Khatibani LB, Balogun MO, Aremu MO, Sharma M, Kumar A, Sengupta R, Li X, Li Y, Tashi S, Hedi A, Cetzal-Ix W (2015)** Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed: a review of physiological and biochemical properties and their genetic improvement. *Acta Physiol Plant* 37:1714.
- Zribi K, Djébal N, Mrabet M, Khayat N, Smaoui A, Mlayah A, et al (2012)** Physiological responses to cadmium, copper, lead, and zinc of *Sinorhizobium* sp. strains nodulating *Medicago sativa* grown in Tunisian mining soils. *Ann Microbiol* 62: 1181-1188.
- Zribi K, Nouairi I, Slama I, Talbi-Zribi O, Mhadhbi H (2015)** *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis Promotes the Bioaccumulation of Zinc in Nodulated Roots. *Int J Phytoremediation* 17: 49-55.