

Tolérance à l'acidité *in vitro* de rhizobia isolés de *Vigna unguiculata* au Cameroun en comparaison avec *Bradyrhizobium japonicum*

Dieudonné Nwaga, Laurette Ngo Nkot

La plupart des sols tropicaux sont ferrugineux et ferralitiques, souvent peu fertiles et acides. L'acidité de ces sols est parfois à l'origine des faibles rendements des cultures, du fait de la réduction de l'activité microbienne, de la faible disponibilité des nutriments comme le phosphore, de la déficience en molybdène, de la toxicité des ions aluminium et manganèse.

Les bactéries symbiotiques des racines de légumineuses appartenant aux genres *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* peuvent fixer l'azote atmosphérique, notamment chez le niébé (*Vigna unguiculata*), une légumineuse tropicale à graine capable de fixer l'azote à raison de 73 à 354 kg/ha/an [1]. Certains facteurs environnementaux, comme l'acidité du sol, limitent la croissance et l'activité de ces bactéries symbiotiques [2]. Une enquête menée en Côte d'Ivoire montre que la fixation de l'azote par *Bradyrhizobium* chez le niébé est limitée par l'acidité et la pauvreté en phosphore assimilable du sol alors que, pour le soja, c'est la rareté des souches spécifiques de *Bradyrhizobium* qui constitue le facteur limitant [3]. La

limitation de fixation de l'azote par les bactéries symbiotiques peut provenir de leur petit nombre, de leur faible efficacité ou encore de leur sensibilité aux contraintes du sol. La plupart des légumineuses de zones tempérées ont une croissance et une nodulation plus actives sur sols neutres ou légèrement acides. En revanche, les légumineuses de zones tropicales comme le niébé et l'arachide (*Arachis hypogaea*) ont un optimum de croissance à un pH de 5 à 6,5, alors qu'il est de 6 à 7 pour le soja [1]. Pour le haricot, une baisse du pH de 5,5 à 5 réduit le nombre de nodules de 60 à 10 par plante [4]. Comparés aux rhizobia des pays tempérés, ceux des pays tropicaux résistent mieux à l'acidité et sont capables de fixer l'azote à pH de 4,5. Mais même pour les souches acido-tolérantes, il y a une baisse de la nodulation sur les sols riches en aluminium [4]. Nous avons comparé *in vitro* l'aptitude à la tolérance à l'acidité de souches isolées des nodosités du niébé au Cameroun et de celle de *Bradyrhizobium japonicum*, souche de collection provenant de l'université agricole de Zhejiang, en Chine.

Le milieu liquide de culture MSY est composé comme suit (en g/l) : mannitol (10) ; extrait de levure (1) ; KH_2PO_4 (0,3) ; Na_2HPO_4 (0,3) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1) ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05) ; (en mg/l) : H_2BO_3 (10) ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5) ; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5) ; MoO_4 (0,1) ; $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1) ; biotine (0,2). Après dissolution des constituants, le milieu est filtré avec le papier Whatman, puis le pH est ajusté à 3, 4, 5 ou 6 avec 0,1 mol de

HCl ou NaOH avant autoclavage, lequel ne modifie pas le pH.

Trois souches de *Rhizobium* conservées à 4 °C sur milieu MSY gélosé en tube ont été utilisées : la souche VUXY₁ (isolée de nodule de *Vigna unguiculata* sur un sol de pH 4 de Yaoundé, Cameroun) ; la souche VUID₁ (isolée, après piégeage, de *Vigna unguiculata* sur un sol de pH 9 de Douala, Cameroun) et la souche GMXC provenant de l'université agricole de Zhejiang en Chine. Ces isolats purifiés et authentifiés ont les caractéristiques suivantes, après 6 jours de croissance à 28 °C en milieu MSY gélosé : la souche VUXY₁ est à croissance rapide (colonies à 4-6 mm de diamètre), transparente, granuleuse, de forme plate et irrégulière ; la souche VUID₁ est à croissance lente (colonies à 0,5-1,0 mm de diamètre), brillante, de forme ronde et régulière ; la souche GMXC est à croissance très lente (colonies de diamètre < 0,5 mm), blanchâtre, de forme ronde et régulière. En symbiose avec *V. unguiculata* sur substrat stérilisé, elles produisent en moyenne 48 et 79 mg de matière sèche de nodules et fournissent 0,55 et 0,81 g de matière sèche végétale par plante pour les souches VUXY₁ et VUID₁ respectivement. Une pré-culture des souches est réalisée en milieu gélosé MSY en boîte de Pétri, puis 1 colonie bactérienne est introduite par Erlenmeyer de 100 ml contenant 50 ml de milieu de culture stérilisé à 120 °C pendant 20 min. Après homogénéisation, les milieux ensemencés sont incubés à 28 ± 2 °C sous agitation à 125 t/min à l'obscurité (trois répétitions par traitement).

D. Nwaga, L. Ngo Nkot : Unité de microbiologie appliquée et biofertilisants (UMAB) et Laboratoire de microbiologie, Centre de biotechnologie, Département de biologie et physiologie végétales, Faculté des sciences, Université de Yaoundé I, BP 812 Yaoundé, Cameroun.

Tirés à part : D. Nwaga

Summary

In vitro acidity tolerance of rhizobia isolated from *Vigna unguiculata* in Cameroon in comparison to *Bradyrhizobium japonicum*

D. Nwaga, L. Ngo Nkot

In Cameroon, soils are generally acidic, i.e. pH 3.8-4 is common in the humid forest zone. In tropical areas, soil acidity is often responsible for low crop yields because of low nutrient availability and reduced soil microbial activity. Grain legumes such as cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) have a high nitrogen fixing ability in symbiosis with rhizobia present in soil. Effective cowpea rhizobia can fix more than 150 kg N/ha and contribute to 80-90% of plants' nitrogen requirements. Beneficial microorganisms have shown different degrees of adaptation to acid soils. In this *in vitro* study, acidity tolerance was compared in two rhizobial strains isolated from cowpea nodules in Cameroon (VUXY₁ and VUID₁) and one *Bradyrhizobium japonicum* strain (GMXC) from China, grown in liquid medium at pH 3-6. Rhizobial growth was monitored for 4 days using optic density (OD) measurements for growth kinetics and biomass after harvest. The results revealed that the growth medium pH had an important influence on rhizobial growth, the latter being very low at pH 3 (Figure 1). At pH 4, only the VUXY₁ strain was able to grow. At pH 5, the two Cameroonian strains (VUXY₁ and VUID₁) were able to grow within the first 2 days. At pH 6, all strains showed active growth kinetics, but growth started only after 4 days for the Chinese strain (GMXC). After 4 days of growth, very low dry mass was observed at pH 3 for the three strains (Table 1). The optimum dry mass corresponded to pH 5 (highest value for the VUID₁ strain), while the optimum level for the GMXC strain was above pH 6. In culture, the VUXY₁ strain strongly acidified the medium, VUID₁ was neutral and the GMXC strain strongly alkalinized it (Figure 2).

These results suggest that Cameroonian rhizobial strains were better adapted to acidity than the *B. japonicum* strain. VUXY₁ was the only strain able to grow at pH 4, which is particularly acid-tolerant; it also produced a considerable amount of acid when grown in culture media, in contrast to the general opinion that tropical rhizobia produce alkali to control acidity. Our findings also support the hypothesis that fast-growing rhizobia are more acid-tolerant than slow-growing *Bradyrhizobium*. It could be useful to select acid-tolerant rhizobia strains, but sensitivity to aluminium is an important additional factor which should be taken into consideration when growing acid-tolerant strains.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 407-10.

La croissance est mesurée quotidiennement, pendant 4 jours, par prélèvement en conditions aseptiques sous hotte à flux laminaire de 1 ml de culture et détermination de la densité optique (DO) au spectrophotomètre Shimadzu UV visible 1 205 à 420 nm. Les bactéries sont par ailleurs étalées en boîte de Pétri et observées quotidiennement au microscope, après coloration de Gram, pour rechercher d'éventuelles contaminations. Pour les dénombrements, les dilutions ont été effectuées avec une solution stérilisée de NaCl à 0,9 % contenant du Tween 20 à 0,02 %.

Le pH du milieu de culture est mesuré au début puis à la fin de l'expérience à l'aide d'un pH-mètre digital Schott

préalablement étalonné. La biomasse microbienne est mesurée, après récolte au 4^e jour de culture et centrifugation à 8 000 t/min pendant 15 min à 4 °C. Le poids frais du culot est déterminé, puis le poids sec est mesuré après lyophilisation, avec une balance de précision Mettler. La mesure de la croissance bactérienne sur la base de la DO de la culture (ou de la biomasse finale) montre une très forte influence du pH pour toutes les souches de *Rhizobium* (figure 1 et tableau 1). À pH 3, la croissance est très faible pour toutes les souches ; à pH 4, les souches VUID₁ et GMXC ont une croissance très faible, alors que la souche VUXY₁ présente une forte croissance dès le 1^{er} jour. À pH 5, les

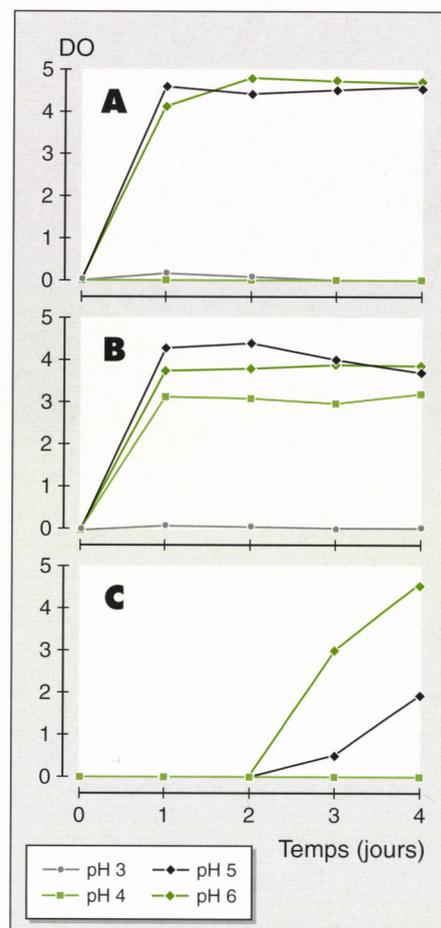


Figure 1. Croissance *in vitro* de trois souches de *Bradyrhizobium* en fonction du pH du milieu de culture.

A : souche VUID₁ ; B : souche VUXY₁ ; C : souche GMXC (A et B : rhizobium du niébé ; C : *B. japonicum*).

Figure 1. *In vitro* growth of three *Bradyrhizobium* strains according to the pH of the nutrient medium.

souches VUID₁ et VUXY₁ présentent une croissance marquée dès le 1^{er} jour, alors que la souche GMXC commence à se multiplier à partir du 3^e jour, sa croissance étant moyenne au 4^e jour. À pH 6, la croissance est forte pour la souche VUID₁, marquée pour la souche VUXY₁ ; pour la souche GMXC, elle est très faible les 1^{er} et 2^e jours, et marquée les 3^e et 4^e jours. Seule la souche VUXY₁ se développe nettement à pH 4, avec un optimum à pH 5. La souche VUID₁ a une croissance élevée aux pH 5 et 6, alors que la souche GMXC exige un pH supérieur à 6, avec un temps de latence de 2 jours.

L'acidité du milieu a aussi une grande influence sur la production de biomasse pour les trois souches (tableau 1). À

Tableau

Croissance *in vitro* de souches de *Bradyrhizobium* en fonction du pH du milieu nutritif

		pH du milieu			
		3	4	5	6
GMXC	PF	54,30 ± 1,40	62,95 ± 0,15	106,15 ± 13,15	270,95 ± 35,5
	PS	8,40 ± 0,20	11,25 ± 0,15	17,75 ± 0,95	19,30 ± 0,90
VUXY ₁	PF	86,50 ± 1,30	113,25 ± 11,85	135,85 ± 10,95	151,65 ± 16,85
	PS	9,95 ± 0,15	17,85 ± 0,35	23,25 ± 0,55	16,25 ± 0,65
VUID ₁	PF	11,45 ± 1,55	67,55 ± 5,75	176,65 ± 9,55	240,50 ± 14,80
	PS	1,20 ± 0,40	10,15 ± 0,05	28,90 ± 0,30	17,35 ± 0,45

PF : poids frais (mg) ; PS : poids sec (mg).

Valeurs moyennes de trois répétitions par traitement.

GMXC : *B. japonicum* ; VUXY₁ et VUID₁ : rhizobium du niébé isolés au Cameroun.

In vitro growth of *Bradyrhizobium* strains according to the pH of the nutrient medium

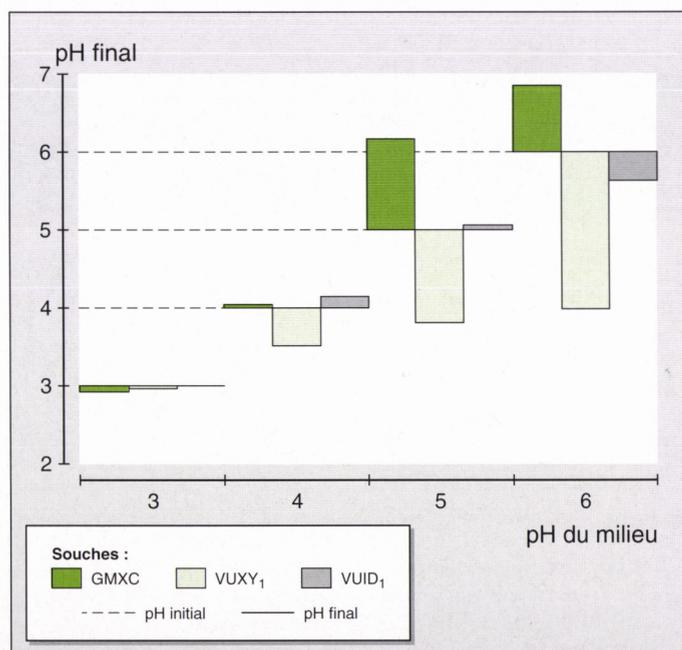


Figure 2. Influence du pH initial du milieu de culture sur le pH final avec trois souches de *Bradyrhizobium*.

Figure 2. Effect of the initial pH of the nutrient medium on the final pH with three *Bradyrhizobium* strains.

pH 3, la souche VUXY₁ présente la biomasse sèche la plus élevée, alors que celle de la souche VUID₁ est 8,3 fois moindre. À pH 4, la souche VUXY₁ est 1,8 fois plus productive que VUID₁. À pH 5, la production bactérienne est optimale pour les souches camerounaises VUXY₁ et VUID₁, cette dernière étant la plus pro-

ductive. La production de biomasse sèche est plus élevée à pH 6 pour la souche chinoise GMXC, elle est supérieure de 11 % à celle de la souche VUID₁ et de 19 % à celle de la souche VUXY₁, ce que ne révélaient pas les mesures de DO.

Les résultats de la mesure du pH final du milieu de culture après 4 jours de crois-

sance montrent que ces trois souches se distinguent nettement (figure 2). Lorsque le pH initial du milieu passe de 4 à 5 puis à 6, le pH final du milieu de croissance de la souche VUID₁ varie de 0,20 à 0,05 puis à 0,40 ; pour la souche GMXC de 0,04 à 1,20 puis 0,80 ; pour la souche VUXY₁ il passe de 0,44 à 1,18 puis 1,95 unité de pH respectivement. La souche VUXY₁ est très acidifiante, et la production de métabolites acides augmente avec le pH. La souche VUID₁ est neutralisante, elle manifeste les plus faibles variations entre le pH initial et le pH final. La souche GMXC est très alcalinisante.

Conclusion

Les résultats montrent une variabilité pour la tolérance à l'acidité *in vitro* chez les trois souches de *Rhizobium* testées, les souches camerounaises étant mieux adaptées au milieu acide. Parmi elles, la souche VUXY₁, qui se multiplie à pH 4, est particulièrement tolérante à l'acidité. Une étude portant sur l'efficacité de fixation de l'azote à pH 4,5 sur six souches [5] conclut que deux souches camerounaises de *Bradyrhizobium* sont plus tolérantes à l'acidité que deux souches brésiliennes, une malgache et une française. Il existerait une relation entre le pH du sol d'origine d'une souche et sa tolérance à l'acidité *in vitro* (croissance à pH < 4,5) [6].

La plupart des souches de *Rhizobium* du niébé (65 %) ont une activité symbiotique faible en milieu acide, ce qui reflète leur inaptitude à croître à pH 4,5 [7]. Les *Rhizobium* à croissance rapide tolèrent mieux l'acidité que les *Bradyrhizobium* à croissance lente [8]. Nos résultats montrent l'intérêt d'une évaluation préalable de la tolérance *in vitro* à l'acidité des souches de rhizobia. Leur transposition au sol demanderait de prendre en compte différents paramètres relatifs à la nodulation, à l'efficacité de la fixation symbiotique et à la tolérance à l'aluminium à pH bas [9]. Ces résultats sont également intéressants lorsqu'on souhaite produire ces rhizobia en milieu liquide comme biofertilisant des légumineuses [10] ou pour la sélection des souches (*Bradyrhizobium* sp. et *B. japonicum*) qui tolèrent l'acidité des sols, en vue de l'amélioration de la production de légumineuses cultivées, agricoles, agroforestières ou forestières ■

Références

1. FAO. *Les inoculums de légumineuses et leurs applications*. Rome : NifTal, 1985.
2. Obaton M. Facteurs pédoclimatiques limitant la fixation de l'azote chez les légumineuses. *Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture*. Ibadan : IITA, 1992 : 57-66.
3. Kimou A, Zengbe M. Facteurs limitant la fixation de l'azote chez deux espèces de légumineuses à graine (*Glycine max* et *Vigna unguiculata*) en zone tropicale humide de Côte d'Ivoire. *Recent developments in biological nitrogen fixation research in Africa*. Rabat : IAV Hassan II, 1994.
4. Franco AA, Munns DN. Acidity and aluminium restraints on nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Soil Sci Am J* 1982 ; 46 : 296-301.
5. Samson C, Montange D, Beunard P. Influence du pH du milieu nutritif sur la fixation de l'azote par l'association *Glycine max-Rhizobium japonicum*. *Agron Trop* 1984 ; 39 : 149-51.
6. Aurag J, Sasson A. Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity and drought. *World J Microbiol Biotech* 1992 ; 8 : 532-5.
7. Keyser HH, Munns DN, Hohenberg JS. Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea. *Soil Sci Soc Am J* 1979 ; 43 : 719-22.
8. Graham PH. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* 1992 ; 38 : 475-84.
9. Correa OS, Barneix AJ. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J Microbiol Biotech* 1997 ; 13 : 153-7.
10. Nwaga D. Production pilote de biofertilisants rhizobien et mycorrhizien au Cameroun : intérêt et contraintes. *Cam J Biol Biochem Sc* 1997 ; 7 : 16-23.

Regards interdisciplinaires sur les politiques de développement

Textes réunis et présentés par
Jean-François Baré,
Éditions L'Harmattan,
Paris, 1997, 384 p., 190 F

Les études réunies dans ce livre portent sur des processus humains particuliers : ceux au travers desquels des institutions publiques (ou des organisations non gouvernementales) définissent et impulsent ce qu'il est convenu d'appeler des « politiques de développement », à destination des sociétés et des espaces les plus divers de la planète.

Au-delà de la variété des approches et des sujets traités, elles peuvent sembler

unies par une interrogation méthodologique commune, consistant en somme dans la question : que se passe-t-il dans les politiques de développement ? qui donne son titre à l'introduction.

Les politiques de développement ne sont pas des données nominales du réel, dont il suffirait d'appréhender les résultats, bons ou mauvais : ce sont des constructions intellectuelles spécifiques et des processus d'action sociale. En ces domaines, le discernement des liens entre les impulsions et les résultats constitue en soi un objet de recherche. C'est seulement en admettant cette dimension empirique que l'on peut contribuer à des vues nouvelles sur l'évaluation de l'intervention publique.

Thème et variations Nouvelles recherches rurales au sud

Coordination :
Chantal Blanc-Pamard,
Jean Boutrais,
Orstom Éditions,
Paris, 1997, 368 p., 130 F

C'est le neuvième et dernier volume de la série *Dynamique des systèmes agraires*, qui ouvre, autour de la géographie rurale, sur les approches attestant la vitalité d'un champ de recherche. C'est une exploration par le croisement de plusieurs disciplines, l'émergence de nouveaux objets de recherche, le renouvellement des questions. Plusieurs recherches innovantes prennent appui sur des analyses fines d'espaces tropicaux dans des pays très divers (Madagascar, Côte d'Ivoire, Mali, Guinée, Cameroun, Mexique, Pérou, Java) et tirent parti d'expériences européennes. Un va-et-vient entre observation empirique et construction théorique, entre renouvellement des questions et évolution des terrains fonde la plupart des démarches. Inscription des systèmes agricoles dans la durée, flexibilité des activités, réévaluation des rapports ville-campagne constituent des domaines de prédilection des géo-

graphes. S'y greffent des apports de démographes, économistes et sociologues qui reconsidèrent des concepts comme les stratégies d'acteurs, prospectent les composantes d'un changement global comme la transition démographique, intègrent des objets biologiques dans une analyse économique. L'enrichissement des procédures de recherche tire également profit des actions conduites par des spécialistes de sciences techniques. L'intelligence de l'action produit de nouvelles connaissances.

En conjuguant richesse d'informations documentaires et réflexions théoriques, cet ouvrage témoigne de la variété des recherches et des révisions en cours. Les changements et les fonctions des paysannes du Nord et du Sud s'éclairaient mutuellement : construction des paysages, promotion de l'environnement, production de qualité...

Thème et variations signe la clôture d'un séminaire par une revue des recherches sur les systèmes agraires, une remise en cause des clivages disciplinaires et une relance d'intérêt pour le devenir des sociétés paysannes dans les pays du Sud.