

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option: Microbiologie appliquée

Intitulé

*Isolement et caractérisation des souches de Rhizobia à partir des
légumineuses sauvages Lotus ornithopodioides L., vicia stativa ssp
segetalis)*

Présenté Par :

- Bouaziz Karima
- Bouguedah Hind
- Chennik Amira
- Chettoum Samah

Membre de Jury

Mme. Laib Imen	Président	MCA	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Zadri Fethia	Promoteur	MCB	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Labid Asma	Examineur	MCB	Université du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2021/2022

Dédicace



S'il faut beaucoup de motivation, de rigueur et d'enthousiasme pour mener à bien ce mémoire, alors, ce travail de recherche a eu besoin de la contribution de plusieurs personnes, qu'on tient à remercier !

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la force et l'abnégation pour terminer nos études et le présent travail.

A nos chers parents,

Quoi qu'on dise,

On n'arriva jamais à vous remercier comme il se doit, merci beaucoup.

Une dédicace spéciale pour les parents de Karima Bouaziz, (ALLAH YERHAMHOUM).

A nos chers frères et sœurs,

Merci pour vos soutiens moraux, vos confiances et vos conseils précieux,

On vous souhaite le bonheur et la réussite dans vos vies.

A toutes nos familles et nos amies.

À travers ses lignes on ne peut pas vous décrire tous nos sentiments d'amour, le seul mot qu'on peut le dire est merci, vraiment merci beaucoup à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire.

Résumé

L'objectif de ce travail était d'isoler et de caractériser des isolats bactériens fixateurs d'azote. L'isolement a été réalisé à partir des nodules de deux légumineuses sauvages *Lotus ornithopodioides* et *vicia stativa ssp segetalis*, la purification et la caractérisation ont été établies sur la base d'observation macroscopique et microscopique ainsi que sur la caractérisation de leur métabolisme par une série de tests biochimiques et physiologique.

Douze souches de bactéries appartenant à la bactérie symbiotique *Rhizobium* ont été identifiées ; six étaient à croissance lente et cinq à croissance rapide. Ces isolats présentant une morphologie comparable à celle des *Rhizobia* connus, et une bonne résistance à la température jusqu'à 45°C.

Malheureusement, trois isolats ont été obtenus après une grande série de contamination environnementale accidentelle de nos boîtes.

Mots clés : Nodules, fixation symbiotique, *Rhizobia*, *Lotus ornithopodioides*, *Vicia stativa ssp segetalis*.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل وتوصيف العزلات البكتيرية المثبتة للأزوت. تم إجراء العزل من عقيدتين من البقوليات البرية *Lotus ornithopodioides* و *Vicia sativa ssp segetalis*، وتم إجراء التنقية والتوصيف على أساس الملاحظة العانية والميكروسكوبية وكذلك على توصيف عملية التمثيل الغذائي من خلال سلسلة بيوكيميائية وفسيلوجية. تم التعرف على اثني عشر سلالة من البكتيريا تنتمي إلى البكتيريا التكافلية *Rhizobia*، ستة منها كانت بطيئة النمو وخمسة تنمو بسرعة. هذه العزلات لها شكل مشابه لمورفولوجيا ريزوبيا المعروفة، ومقاومة جيدة لدرجة الحرارة حتى 45 درجة مئوية.

لسوء الحظ، تم الحصول على ثلاث عزلات بعد سلسلة كبيرة من التلوث المحيطي العرضي لعيوانتا.

الكلمات الأساسية: العقيدات، التعلق التكافلي، *Lotus ornithopodioides* و *Vicia sativa ssp segetalis* ،

Rhizobia

Abstract

The objective of this work was to isolate and characterize nitrogen-fixing bacterial isolates. The isolation was carried out from the nodules of two wild legumes *Lotus ornithopodioides* and *Vicia stativa ssp segetalis*, the purification and the characterization were established on the basis of macroscopic and microscopic observation as well as on the characterization of their metabolism by a series biochemical and physiological tests.

Twelve strains of bacteria belonging to the symbiotic bacterium *Rhizobium* have been identified; six were slow growing and five fast growing. These isolates have morphology comparable to that of known *Rhizobia*, and good resistance to temperature up to 45°C.

Unfortunately, three isolates were obtained after a large series of accidental environmental contamination of our boxes.

Key words: Nodules, symbiotic attachment, *Rhizobia*, *Lotus ornithopodioides*, *Vicia stativa ssp segetalis*.

Liste d'abréviation :

- 1) °C : Le degré Celsius
- 2) BTB ; Bleu de Bromothymol
- 3) Ca²⁺ : calcium
- 4) CO₂ : Dioxyde de carbone
- 5) CO²⁺ : Cobalt
- 6) Fe²⁺ : 'ion ferreux
- 7) g : gramme
- 8) GN : Gélose nutritif
- 9) GNA : Gélose Nutritif Alcalin
- 10) H : Heure
- 11) H₂O
- 12) HcP : Heatshockproteins
- 13) HcP : Heatshockproteins
- 14) Hsn : Host specific Nodulation
- 15) Min : Minute
- 16) ml : millilitre
- 17) NH₃ : Ammoniac
- 18) NH₄⁺ : Ammonium
- 19) NO₃ : Nitrate
- 20) RC : Rouge de Congo
- 21) S : Seconde
- 22) Ssp : espèce
- 23) YMA + RC : Yeast Manitol Agar + Rouge Congo
- 24) YMA : Yeast Mannitol Agar
- 25) YMA+ CaCO₃ : Yeast Manitol Agar + Carbonate de Calcium
- 26) YMB : Yeast Manitol Broth

Liste du tableau :

Tableau 1 : La diversité des Rhizobia identifiés à partir de cette nouvelle approche en 2009 ..	5
Tableau 2 : Caractéristique macroscopique des isolats non Rhizobia sur le milieu YMA+R..	30
Tableau3 : Aspect microscopique des isolats non Rhizobium.....	30
Tableau 4 : Caractérisation macroscopique des Rhizobia sur le milieu YMA+RC	32
Tableau 5 : Aspects microscopique des Rhizobia.....	33
Tableau 6 : présentation du résultat des caractères morphologiques sur le milieu YMA.....	35
Tableau 7 : Test d'acidification ou alcalinisation (BTB) (vitesse de croissance).	35
Tableau 8 : Représente les résultats du test de mannitol mobilité :	38
Tableau 9 : Résultats du test de température.....	39

Listes des Figures :

Figure 1 : Cycle d'azote.....	1
Figure 2: Arbre phylogénétique de séquences d'ADNr 16s,.....	5
Figure 3: phylogénie des légumineuses	7
Figure 4: plante lotus.....	9
Figure 5: plante lotus.....	9
Figure6 : plante vicia stativa	10
Figure 7: Dialogue moléculaire entre les deux partenaires	12
Figure 8: Ramification du cordon d'infection	14
Figure 9: Carte géographique du site d'accueil	16
Figure 10: Site d'échantillonnage	17
Figure 11: Photo de <i>Vicia stativa</i>	18
Figure 12: Photo de <i>lotus Orthopodiodes</i>	18
Figure 13: Conservation des Nodules	19
Figure 14: Stérilisation des Nodules	20
Figure 15: Isolement par méthode de quatre quadrants	22
Figure 16: Isolement sur des tubes contenant le milieu YMA+CACO3	25
Figure 17: Technique de la mise en évidence de la fermentation du mannitol.....	27
Figure18 : Test de stérilisation des nodules de l'espèce lotus et vicia	30
Figure 19: Aspect macroscopique des isolats non Rhizobium sur le milieu (YMA+RC)	31
Figure20 : Observation microscopique des isolats non <i>Rhizobia</i> après coloration de Gram...33	33
Figure 21 : Aspect macroscopique des Rhizobia sur le milieu (YMA+RC).....	35
Figure22: Observation microscopique des rhizobia après coloration de Gram.....	36
Figure 23: La croissance sur le milieu YMA	37
Figure24 : Test de BTB de quelques isolats.....	39
Figure 25 : Photos des résultats du test de 3-cétolactose	40
Figure 26: Mannitol +, mobilité	41
Figure 27 : Résultat de test catalase (oxydase)	41

Table de la matière :

Dédicace

Résumé

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographie :

1. Le cycle de l'azote :	1
1.1 La fixation biologique de l'azote :	2
1.2. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique :	2
2. Généralités sur les <i>Rhizobia</i> :	3
2.1 Découverte du <i>Rhizobia</i> :	3
2.3. Classification et taxonomie du <i>Rhizobia</i> :	4
2.4. Notion de phylogénie et caractères génétiques des <i>Rhizobia</i> :	4
2.5. Classification récente du <i>Rhizobia</i> :	4
2.6. Caractères biotechnologiques du <i>Rhizobia</i> :	6
3. Légumineuse :	6
3.1 Généralité	6
3.2. La présence des légumineuses naturelles dans le bassin méditerrané :	6
3.3 Taxonomie des légumineuses :	7
3.4. Intérêts des légumineuses	8
4. L'espèce <i>Lotus ornithopodioides</i> :	9
4. 1. Description de la plante :	9
4. 2. Taxonomie de <i>Lotus ornithopodioides</i> :	9
4. 3. Ecologie :	9
5. L'espèce <i>vicia stativa ssp segetalis</i> :	10
5. 1. Description de la plante :	10

5.2. Taxonomie de <i>vicia stativa ssp segetalis</i> :.....	11
5.3. Ecologie :.....	11
6. Formation de symbiose/nodulation.....	11
6.1. Les substances responsables de la nodulation	11
6.2. Le processus de nodulation.....	13
7. Facteurs influençant la fixation d'Azote :.....	14
7.1. Ph du sol	14
7.2 Stress salin :	15
7.3 Stress hydrique :	15
7.4 Stress thermique :.....	15
7.5 Métaux lourds :.....	15
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	
I. Isolement des bactéries à partir des nodules :	16
1 . Description du site d'accueil :.....	16
2. Site d'échantillonnage :	17
3. Matériel Biologique	17
4. Méthodes :	17
4.1 La collecte des Nodules	17
4.2 Conservation des nodules par déshydratation :.....	19
4.3 Stérilisation des nodules :	20
4.4 Test de stérilisation :.....	21
4.4.1 La première méthode	21
4.4.2 La deuxième méthode.....	21
II. Isolement et caractérisation phénotypique des isolats :	23
1. Milieux de culture principale :	23
2. Purification des isolats.....	23
3. Examen microscopique	23
4. Caractères cultureux des isolats	24

4.1 Croissance sur milieu YMA	24
4.2 Absorption du rouge Congo :.....	24
4.3 Test de bleu Bromothymol	25
4.4 Conservation des souches :	26
5. Caractérisation phénotypique des isolats	26
6. Caractérisation biochimique des isolats.....	26
6.1 Distinction entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> (Test du 3-cétolactose) :.....	26
6.2 La recherche de catalase	26
6.3 Fermentation du mannitol (test de mobilité) :.....	27
7. Caractères physiologiques (Températures) :.....	28

Chapitre 3 : Résultat et discussion

1. Caractérisation des nodules collecte :	29
1.1 chez <i>vicia sativa ssp segetalis</i>	29
1.2 chez <i>Lotus ornithopodioides</i>	29
2. Test de stérilisation :.....	30
3. Croissance des non Rizobia sur le milieu YMA+RC	31
4. Croissance des <i>Rizobia</i> sur le milieu YMA+RC.....	34
5. Caractères morphologiques et cultureux :	37
5.1 Caractérisation cultural sur milieu YMA :.....	37
5.2 La vitesse de croissance (test du BTB) :.....	37
6. Caractères biochimique des souches :.....	39
6.1 Distinction entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	39
6.2 Le teste de test de mobilité (la fermentation du mannitol) :	40
6.3 Le test catalase.....	40
7. Tests physiologiques	41
Effet de température :.....	41

Conclusion

Introduction

Introduction

L'azote est le principal facteur limitant de la production agricole alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80% d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N₂) est une molécule très stable que seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes peuvent réduire en formes assimilables. Les systèmes de fixation les plus efficaces sont les symbiotes qui combinent fixation d'azote et photosynthèse, **(Sebihi, 2008)**

Les relations symbiotiques sont très diverses, représentant près de la moitié de la fixation biologique de l'azote moléculaire sur terre, et les plus connues et les mieux étudiées sont celles établies entre les bactéries du sol de type rhizobium et les légumineuses. **(Faria, et al. 1989)**. Cette symbiose se manifeste par la formation de nodosités racinaires, organes spécialisés dans lesquelles l'azote atmosphérique est réduit en ammoniac suite à l'infection par les Rhizobia. **(Bergen et al., 2001)**

En Algérie, les légumineuses jouent un rôle très important et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien. Il se caractérise par une grande variété de légumineuses spontanées et cultivées **(Bensalama, 2015)**.

Parmi les espèces sauvages figurent celles du genre *Vicia* ou les vesces, dans les régions céréalières, sont d'une grande utilité car elles fournissent un excellent engrais vert en culture dérobée. L'introduction de *Vicia* spp. Dans les rotations améliore la production des ressources alimentaires et par la même la capacité de charge des terres de manière durable. Elle fixe jusqu'à 200 kg d'azote dans le sol **(Matic, 2005 ; Rochester et Peoples, 2005)** ; améliore la structure du sol et assure un meilleur contrôle des maladies et des parasites par rapport à la monoculture de céréales, **(Puckridge et French, 1983; Bahhady et al., 1997)**

Le genre *Lotus* est l'une des légumineuses fourragères utilisées en mélange avec des graminées pour la rénovation des prairies, de 15 à 20 cm de hauteur, **(anonyme2, 2022)**

Les facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité le pH, et la salinité du sol peuvent avoir un effet négatif ou positif sur la symbiose Légumineuse- rhizobia. **(Zeribi, 2020)**

Introduction

Dans ce contexte notre travail aura pour objectifs d'isoler et d'étudier les caractéristiques biochimiques, symbiotiques et physiologiques des bactéries à partir des nodules racinaires de la légumineuse afin de rechercher des souches performantes fixatrice d'azote pour l'utiliser dans l'inoculum.

Lotus ornithopodioides, *Vicia stativa ssp segetalis* qui poussent spontanément dans la région d'El- Hadayak-Skikda.

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- ❖ Isolement des bactéries à partir des nodules,
 - ❖ Etude morphologique et microscopique,
 - ❖ Caractérisation biochimique et Physiologique des isolats comprenant une série de tests.
-



Chapitre 1 : synthèse bibliographie

1. Le cycle de l'azote :

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% d'azote (N_2). L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier, (Zahra,1999).

Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou, parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol, (J.J. Drevon, 2004), le cycle d'azote se résume dans les étapes suivantes représentées dans la figure 01.

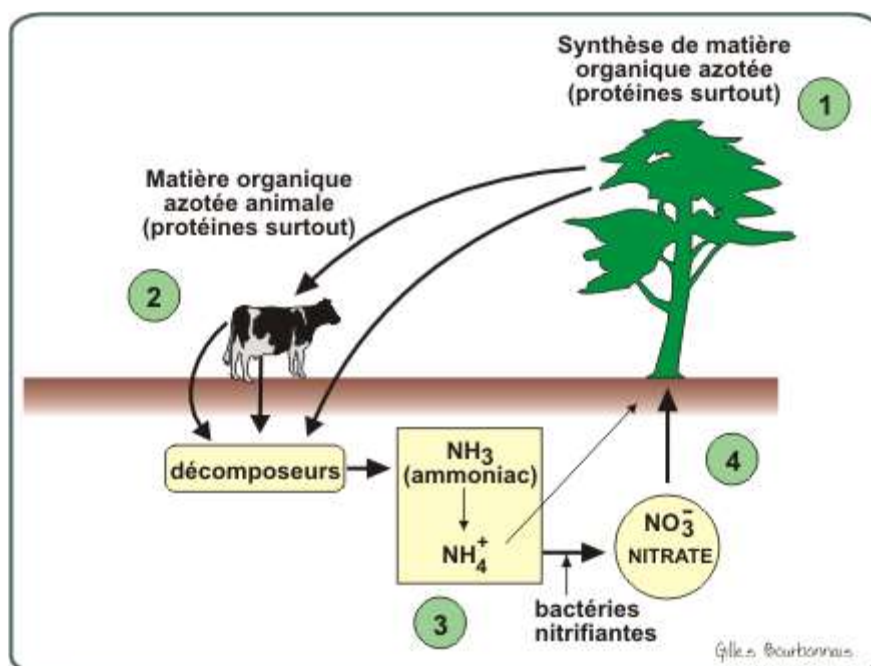


Figure 1 : Cycle de l'azote

1. Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions NO_3^- puisés dans le sol.
2. Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal.

3. Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée, Provenant des plantes ou des animaux morts en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Au contact de, l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+ .
4. D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le NH_4^+ en nitrate (NO_3^-) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH_4^+ se forme directement à partir d'ammoniac, (**Anonyme1, 2022**).

1.1. La fixation biologique de l'azote :

Au même degré que la photosynthèse, la fixation biologique de l'azote est une activité microbienne importante qui soutient la vie sur Terre. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduites dans le cycle de vie par la bio-fixation chaque année, (**Pierre. R,1996**). La fixation biologique de l'azote (**BNF**) a été découverte par Beijerinck en 1901, (**Beijerinck,1901**) est réalisée par un groupe spécialisé de procaryotes. Ces organismes utilisent la nitrogénase pour catalyser la conversion de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3). Outre la croissance et la production végétale, l'azote est l'élément limitant fondamental pour toutes les formes de vie sur Terre. C'est le composant principal de la chlorophylle, le pigment le plus important nécessaire à la photosynthèse, ainsi que des acides aminés, le composant principal des protéines. Il est également présent dans d'autres biomolécules importantes telles que l'ATP et les acides nucléiques. Bien qu'il soit l'un des éléments les plus abondants (principalement sous forme (N_2) dans l'atmosphère terrestre), les plantes ne peuvent utiliser que la forme réduite de cet élément, (**Stephen.C,2011**).

Les organismes assimilateurs de N_2 sont des eubactéries archées procaryotes, réparties dans plus de 100 genres ; certains fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font en symbiose, (**plemont,2005**).

1.2. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique :

Les bactéries symbiotiques introduites dans le cycle biologique fixent annuellement 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport des bactéries libres, (**Davet, 1996**). De telles symbioses se réalisent naturellement. La plus connue est celle qui se manifeste entre les légumineuses (luzerne, trèfle, lupin, pois, haricot, féverole, soja, etc.) et une bactérie du sol, le rhizobium. Dans une relation symbiotique, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien représente le symbiote. La forme d'association symbiotique la plus connue se traduit par la formation de structures multicellulaires hypertrophiques appelées nodules sur les racines (ou parfois les tiges) de la plante hôte, (**Hopkins,2003**).

La plante fournit des conditions anaérobies et des nutriments aux bactéries, qui à leur tour fixent les protéines végétales contenant de l'azote, Pour cela elle met à disposition des bactéries une grande quantité d'ATP issu de la photosynthèse, et elle maintient dans le nodule un microenvironnement anoxique grâce à ses molécules de leghémoglobine qui fixent l'O₂, (Tortora et al.,2003 ; Anonyme2,2022).

2. La *Rhizobia*

2.1. Généralités sur les *Rhizobia* :

Les rhizobiums sont des bactéries du sol capable de former des nodules racinaires et d'établir une relation symbiotique avec les racines ou les tiges des légumineuses.

Lors de la symbiose, les rhizobiums réduisent l'azote atmosphérique en une forme (ammonium) directement utilisable par les plantes, (Berrada. H et Benrahim. K.,2014).

Les *Rhizobia* sont des bactéries non sporulant, aérobie, a gram négatif, chimio-organotrophe, neutrophile (pH entre 6 et 7), mésophile (température optimale de la croissance est entre 25 et 30°), apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 1,2 à 3 µm et de longueur, et de 0,5 à 0,9 de largeur, ce sont des bactéries mobiles par un mécanisme de mouvement qui se présente par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien par 2 à 6 flagelles périt riches, (sadowsky et al.,1983 ; somasegaran et hoben.,1985).

Les espèces de *Rhizobia* en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux, (Somasegaran et Hoben., 1994).

En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobiums et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le Ca²⁺, Fe²⁺ et Co²⁺, leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate, (Werner,1992)

2.2. Découverte du *Rhizobia* :

Premier isolement de bactéries fixatrices d'azote en culture pure était à la fin du XIXe siècle, (Beijerinck,1888). L'année suivante, Cette bactérie est connue sous le nom de *Rhizobium* légumineux, Ces bactéries induisent la formation de Nodules dans les légumineuses. Ils ont un taux de croissance rapide ou lent, puis Reconnu comme « *Rhizobia* » et regroupé en un genre : *Rhizobium*, (Frank,1889).

2.3. Classification et taxonomie du *Rhizobia* :

La première classification des *Rhizobia* a été basée sur les tests de l'inoculation croisée entre les *Rhizobia* et leurs plantes hôte et sur d'autres critères morphologiques et culturales, (Willems, 2006 ; Berrada. H et Benrahim.K, 2014).

L'isolement des *Rhizobia* associés aux légumineuses non prises en compte auparavant, a souvent conduit au bouleversement de leur taxonomie. Ces modifications constantes de la taxonomie ont conduit à la recherche des critères à prendre en compte pour la description de nouveaux taxons, (Berrada. H et Benrahim. K, 2014).

2.4. Notion de phylogénie et caractères génétiques des *Rhizobia* :

La comparaison des données obtenues sur les souches ou les espèces bactériennes par différentes approches moléculaires permet l'identification de groupes ou de taxons. Les différents taxons obtenus peuvent être comparés et utilisés pour le traçage de lignées de filiation reconnues communément sous le nom d'arbre phylogénétique, (Olsen et al., 1994 ; Young et haukka, 1996 ; Terefe,2002).

Le génome du *Rhizobium* est intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un méga plasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces, (Laranjo et al., 2002).

D'après l'analyse des séquençages d'ADNr 16s tous les *Rhizobia* appartiennent à trois sous classes phylogénétiques lesquelles : α ; Alpha, β ; Beta, γ ; gamma –*Rhizobia*, (Willems, 2006 ; Masson-Boivin et al., 2009 ; Berrada. H et Benrahim. K., 2014 ; Peix et al., 2015).

Les gènes responsables de la nodulation (**Nod**) et de la fixation de l'azote (**Fix, Nif**) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur un simple réplicon symbiotique, des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présents, (Werner, 1992 ; Pelmont, 1995 ; Patrícia et al., 1998).

2.5. Classification récente du *Rhizobia* :

La combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a permis de modifier considérablement la taxonomie des *Rhizobia* ces dernières années. (Tableau 1)

Tableau 1 : la diversité des *Rhizobia* identifiés à partir de cette nouvelle approche en 2009 (NOE, 2009)

Sous –classe	<i>Alpha-Proteobacteria</i>	<i>Beta- Proteobacteria</i>	<i>Gamma-Proteobacteria</i>
Genre	<i>Rhizobium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Mezorhizobium</i>	<i>Cupriavidus</i>	
	<i>Ensifer</i>		
	<i>Baradyrhizobium</i>		
	<i>Phyllobacterium</i>		
	<i>Microvigra</i>		
	<i>Azorhizobium</i>		
	<i>Ochrhobacterium</i>		
	<i>Methylobacterium</i>		
	<i>Devosia</i>		
	<i>Shinella</i>		

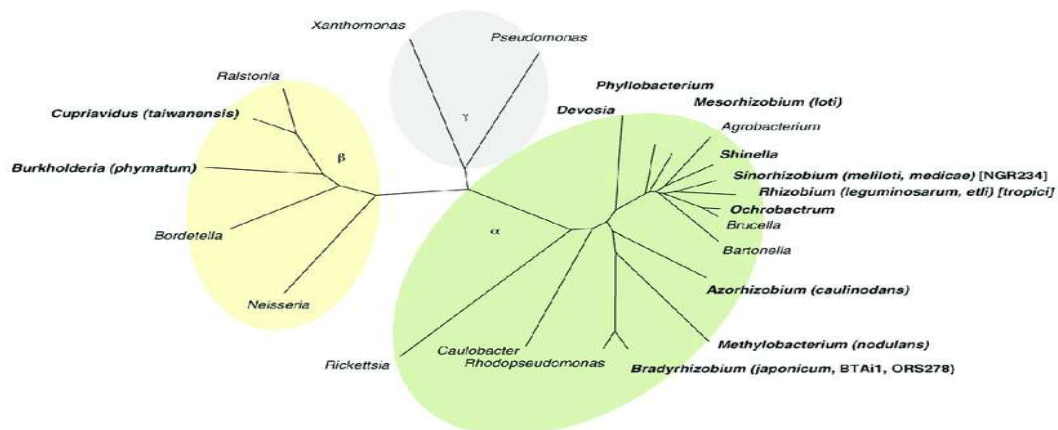


Figure 2 : Arbre phylogénétique de séquences d'ADNr 16s provenant d' α -, β -et γ -protéo-bactéries. (Masson B et al., 2009).

2.6. Caractères biotechnologiques du *Rhizobia* :

Rhizobium a une énorme importance agricole et économique car elle fournit à la plante la source majeure de l'azote, outre que leur pouvoir promoteur de la croissance des plantes, (Gopalakrishnan et al.,2015), qui s'incarne dans la production des phytohormones (**auxine**), aussi bien que la solubilisation des formes insolubles de phosphate. Pour ce fait, la sélection des souches de *Rhizobium* efficaces permet de mettre au profit de l'Homme les différents traits bénéfiques des bactéries telles que leur utilisation comme inoculant, (Malusá et Vassilev, 2014).

3. Légumineuse :

3.1. Généralité

Les légumineuses ou les fabacées sont l'une des familles les plus remarquables du règne végétal, (Candolle, 1825), qui ont la capacité de fixer l'azote par relation de symbiose avec les rhizobiums, (Zeribi, 2020 ; Selami, 2015).

La grande famille de *Fabaceae* doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue, (Kaliche et Djemoui,2014). Les légumineuses sont l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs et ont plus 19 400 espèces réparties en 730 genres, elles se trouvent en milieux tempérés et tropicaux, (Wojciechowski et al., 2004). Les formes arborescentes prédominent les pays chauds tandis que les formes herbacées caractérisent les régions tempérées, (Guignard et Dupont, 2005 ; Michel et al. 2005). Ses racines et ses tiges où se trouvent les bactéries présentent des nodules qui fixent l'azote atmosphérique, (Murielle et Daniel, 2004 ; caratini, 1984).

3.2. La présence des légumineuses naturelles dans le bassin méditerranéen :

Le bassin méditerranéen est le berceau d'une grande diversité d'espèces végétales d'intérêts fourragères et/ou pastoraux. Les genres *Trifolium*, *Medicago*, *Vicia*, *Astragalus*, *Lathyrus*, *Ononis*, *Avena*, *Eragrostis*, *Hordeum*, *Dactylis*, *lotus*..., (SAOUDI, 2008 ; Bekki et al., 2006 ; Merabt et al., 2006). Leur endémisme est très élevé, avec 976 espèces réparties dans 18 genres de légumineuses fourragères et/ou pastorales, 336 sont endémiques de la région méditerranéenne, (Saoudi, 2008 ; A. Abdelguerfi et M. Abdelguerfi-Laouar).

En Algérie, l'endémisme est très important chez les légumineuses et les graminées. En raison de sa situation particulière dans la région méditerranéenne, (Quézel et Santa,1962 ;Bensalama,2015).

3.3. Taxonomie des légumineuses :

La famille des légumineuses est classée comme suit :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Trachéobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsidia*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous famille : *Papilionoideae ; Mimosoideae ; Caesalpinioideae.* (Chaïch et al., 2016)

En effet, En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinieae*), (Guignard et Dupont, 2005).

3.4. Sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* :

C'est la plus grand sous famille avec 463 genres et 18000 espèces caractérisées par des fleurs irrégulières regroupent presque toutes les légumineuses économiquement importantes. La majorité sont des herbes mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, (Tiziri, 2012 ; Saoudi, 2017 ; Zeribi, 2020).

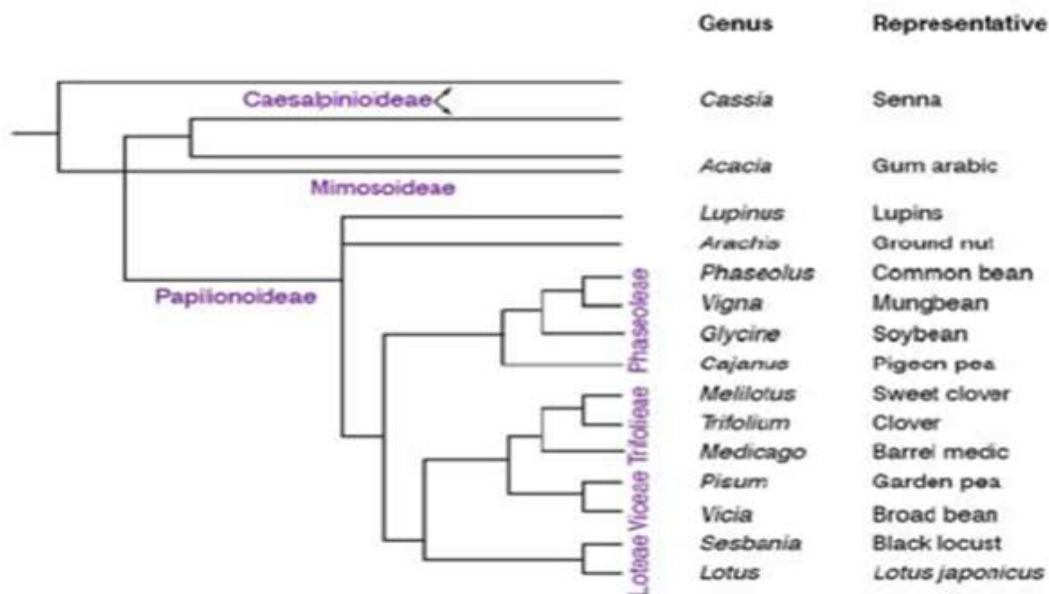


Figure 3 : Phylogénie-des-Légumineuses (d'après Doyl et al., 1998)

3.5. Intérêts des légumineuses

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie.

❖ Intérêt agronomique :

- 1- La fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azoté.
- 2- Dans le cadre d'une agriculture "durable préservation et enrichissement des sols en azote (réduction des intrants).
- 3- Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de Rhizobium.
- 4- Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures, **(Benselama, 2015)**.

❖ Intérêt alimentaire :

Les légumineuses constituent un trésor pour notre alimentation. Ce sont des graines ayant perdus leurs excès d'humidité grâce à un séchage naturel. Ainsi, se trouve concentré le réservoir énergétique de la plante. Le fruit de la légumineuse comporte une cosse qui la protège, **(Lecerf, 2016)**.

- a) La sécurité alimentaire, car elles constituent une source essentielle et peu onéreuse de protéines d'origine végétale, de vitamines et de minéraux pour les populations du monde entier, notamment les petits exploitants.
- b) La santé, car leur consommation favorise la prévention et la gestion de l'obésité, du diabète et des maladies coronariennes.
- c) L'adaptation au changement climatique, car leur grande diversité génétique permet de sélectionner ou de créer des variétés résistantes aux phénomènes climatiques, **(COAG, 2016)**.

4. L'espèce *Lotus ornithopodioides* :

4.1. Description de la plante :

C'est une plante annuelle de 10-40 cm, pubescente, dressée ou ascendante, ces fleurs jaunes, assez petites, 2-5 sur des pédoncules dépassant peu la feuille, avec stipules largement ovales-rhomboidales, dépassant un peu le pétiole, ces folioles sont larges et rhomboïdales en coin, (Anonyme, 2022).

4.2. Taxonomie de *Lotus ornithopodioides* :

Ordre : Fabales, (Bromhead, 1838).

Famille : *Fabaceae*, (Lindl, 1836)

Sous-Famille : *Papilionidé*, (DC., 1825)

Genre : *Lotus* (L., 1753).

Espèce : *Lotus ornithopodioides*, (L., 1753).



Figure 4 et 5 : plante du *Lotus ornithopodioides*

4.3. Ecologie :

Les conditions écologiques:

1. Caractéristiques climatiques :

La plante de *lotus ornithopodioides* a besoin d'un éclairage relativement fort et d'une chaleur élevée, mais quant à l'humidité et la continentalité, elle est proche de la moyenne

2. Caractéristiques du sol :

- Elle possède une réaction de pH presque basique.
- La texture est entre argile et rochers
- La salinité est non tolérante
- La matière grasse est presque inexistante ou pauvre (Anonyme, 2022).

5. L'espèce *Vicia Stativa ssp Segetalis* :

5.1. Description de la plante :

Cette plante se rencontre sur les Tlaus et au bord des chemins ainsi que dans les friches. Ses feuilles sont alternes, constituées de 3 à 8 paires de folioles de forme plus ou moins ovales (rapport L/l < 10), tronquées sur le haut. Chaque feuille possède une petite stipule portant deux nectaires noirs assez caractéristiques. (Anonyme, 2022)



Figure6 : plante *vicia stativa ssp segetalis*, (anonyme,2022)

5.2. Taxonomie de *vicia stativa ssp segetalis* :

Famille : *Fabaceae* (Lindl., 1836).

Sous-Famille : *Papilionoideae* (DC., 1825).

Super-Tribu : *Robinioids*

Genre : *Vicia* (1753).

Espèce : *Vicia sativa* (L., 1753).

Sous-espèce : *vicia stativa segetalis*.

5.3. Ecologie :

1. Caractéristique climatique :

La plante *vicia stativa ssp segetalis* a besoin d'un éclairage relativement fort et d'une chaleur élevée, leur humidité et moyenne (entre le sec et humide), leur température et moins chaude, et leur continentalité marine.

2. Caractéristique du sol :

- Elle possède un ph basique
- Riche en nutriments
- Une texture argile

- Une salinité non tolérante
- La matière grâce est presque inexistante ou pauvre. (**Anonyme,2022**).

6. Formation de symbiose/nodulation

La mise en place d'associations implique des mécanismes de reconnaissance spécifiques qui initient un véritable dialogue en plusieurs étapes entre les bactéries et les plantes hôte.

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique se manifeste par l'apparition de nodules qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (**Figueiredo et al, 2008 ; Lohar et al, 2009**).

6.1. Les substances responsables de la nodulation

❖ Flavonoïdes :

Les flavonoïdes produits par les plantes hôtes ont longtemps été suspectés de jouer un rôle direct dans la formation des nodules. Les flavonoïdes sont des produits polyphénoliques du métabolisme secondaire chez les plantes. Leur structure de base est un squelette à deux cycles aromatiques A et B, séparés par un hétérocycle C (**Hirsch, 1992**). Chaque plante émet un mélange de différents flavonoïdes dont des isoflavones spécifiques aux légumineuses (**Riah, 2014**). En effet, l'énorme diversité des flavonoïdes constitue le premier signal de l'hôte où ils induisent le mécanisme de chimiotactisme chez les rhizobiums et déclenchent en eux l'expression de gènes qui régulent la nodulation, (**Peters et Verma, 1990 ; Dixon et al. 2002 ; Cooper, 2004**), et interagit avec la protéine Nod en tant que sonde environnementale et activateur transcriptionnel (**Broughton et al., 2000**). En plus à l'induction des gènes Nod, les flavonoïdes semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (**Terefework, 2002**), et leur production limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir des nodules.

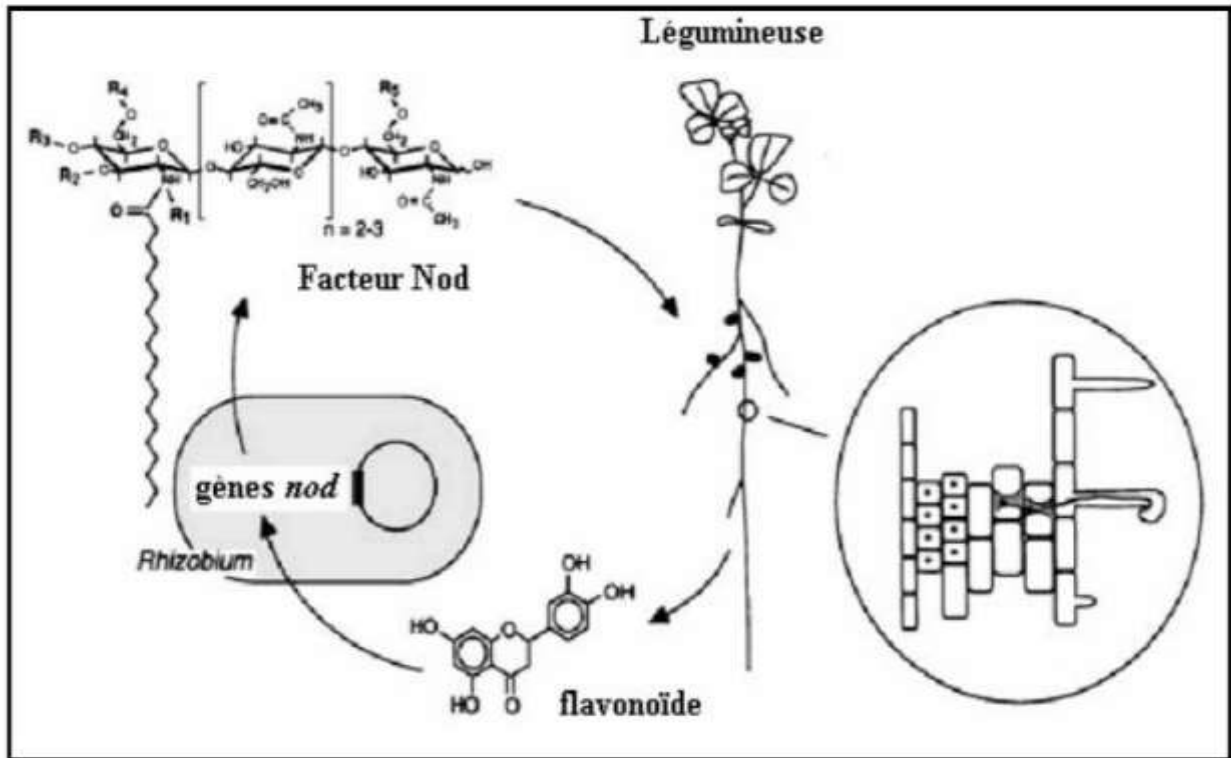


Figure 7 : Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique l'action Des facteurs Nod (Shultze et kondorosi,1998)

❖ Facteur Nod

Les facteurs Nod produits sont impliqués dans la reconnaissance de la plante hôte ; ils se lient à des récepteurs spécifiques situés sur l'épiderme racinaire puis déclenchent une réponse infectante des racines en immobilisant les bactéries commensales (dédifférenciation des cellules corticales à l'intérieur de la racine, annonçant la formation des nodules) produit de la noduline, une protéine spécifiquement associée à l'attachement symbiotique, (Anne.S et al.,2017).Facteur Nod sont des molécules lipochito-oligosaccharidiques(Terefework,2002), Est constitué de 3 à 5 de résidus de N-acétyle-D- glucosamine, substitution d'une chaîne acyle sur glucosamine extrémités non réductrices, (Roche et al ,1991b).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs nod sont l'expression des gènes spécifique de la nodulation ou Les gènes nod ABCD codent pour la synthèse du noyau lipo-oligosacchrde de tous les facteurs Nod, les gènes hsn pour les diverses substitutions des facteurs Nod. Le produit du gens Nod C, N'acétyle glucosamyl -transférase permet

l'élongation de la chaîne. Le gène Nod B code une N-deacétylase responsable du clivage du résidu N'acétyle de la glucosamine terminale non réductrice, le produit du gène Nod, à permet ajouter la chaîne d'acide gras, (**Spaink, 2000 ; DHaez et Holsters, 2007**).

6.2. Le processus de nodulation

1. Echange de signal d'infection :

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et les bactéries. En présence des racines de l'hôte, la multiplication bactérienne et la colonisation de la rhizosphère sont augmentées. L'attraction des bactéries vers les racines des plantes hôtes semblait initialement impliquer un chimiotactisme positif. Dans des conditions limitant l'azote, les exsudats des racines de la plante contiennent une variété des substances, principalement des flavonoïdes, qui activent la transcription du gène Nod chez Rhizobia, (**Iskounen, 2012**).

2. Infection :

Les bactéries se fixent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhesine ainsi que d'autres protéines spécifiques situées à la surface des cellules, (**Dardanelli et al., 2003 ; Perry et al., 2004**). Le facteur Nod émis par les rhizobiums induit une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'oscillations du flux de Ca^{2+} . Cette étape va ensuite induire l'expression de gènes spécifiques, (**Pelmont, 1995 ; Gage, 2004**) et modifier la croissance des poils absorbants racinaires polaires pour former des structures dites « en courbure de berger » qui entourent les rhizobiums, (**Esseling et al., 2003**).

3. Développement du nodule et la maturation des bactéroïdes :

La dernière étape de la formation des nodules implique la libération de rhizobiums des cordons infectieux à l'intérieur des cellules corticales, suivie d'une division et d'une différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote, en appelées bactéroïdes. La plupart des populations bactériennes sont transformées en bactéroïdes ramifiés, sphériques ou en forme de bâtonnets. Une membrane peri-bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes. Il protège les plantes des effets potentiellement pathogènes de l'ammoniac produit et des bactéries, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote, (**Aouadj et Saidi Siel, 2015**).

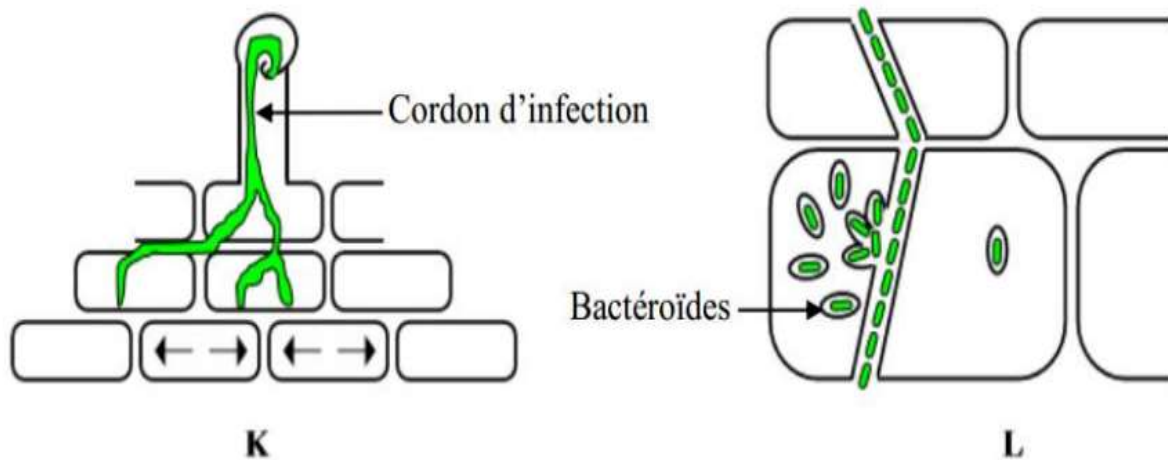


Figure8 : Ramification du cordon d'infection (Selami ,2017).

7. Facteurs influençant la fixation d'Azote :

7.1.Ph du sol :

Le Ph extrême affecte les deux partenaires (*Rhizobiums* et légumineuses). Cependant, selon **Fitouri (2011)**, la majorité des légumineuses nécessitent un Ph neutre ou légèrement acide pour établir une relation symbiotique efficace.

La solubilité des éléments minéraux et la perturbation de la nutrition minérale sont dues à la forte acidité du sol, qui affecte la croissance des plantes hôtes d'une part et l'efficacité des *Rhizobiums* d'autre part, entraînant une diminution des nœuds (**Munns, 1977**).

7.2.Stress salin :

La salinité affecte le processus d'infection, le développement et la fonction des nodules. En première lieu l'activité des nodules est plus sensible au stress salin que la nodulation, (**Payakapong ,2006 ; Rae et al.,2002**). Selon ces auteurs La réduction de l'activité de fixation d'azote consiste à :

- Une réduction de la respiration.
- Une déformation de la structure du nodule.
- Une réduction de l'activité photosynthétique.

7.3. Stress hydrique :

Le stress hydrique est toujours présent lorsque le taux de transpiration d'une plante dépasse le taux d'absorption d'eau. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les légumineuses est très sensible au manque d'eau, (**Zaharan, 1999**).

Le stress hydrique affecte la fixation de l'azote à différents niveaux :

- La formation et la croissance nodulaire
- Le métabolisme du carbone et d'azote
- L'activité de la nitrogénase et la perméabilité nodulaire à l'oxygène, (**Aguirreolea et Sanchez-dgaz, 1989 ; Sadowsky,2005**).

7.4. Stress thermique :

Des températures trop fortes aux niveaux de la rhizosphère affectent l'infection des racines par les bactéries et la fixation symbiotique de l'azote chez plusieurs légumineuses. Certains travaux ont montré que les températures élevées retardent la nodulation et réduisent l'activité de la nitrogénase et la fixation symbiotique, (**Zahran, 1999**).

7.5. Métaux lourds :

Les métaux lourds affectent négativement les micro-organismes en affectant leur croissance, leur morphologie et leur activité. Par conséquent, ils réduisent la taille des populations de rhizobiums et affectent de manière irréversible leur croissance et leurs performance symbiotique, (**Gusmao-Lima, 2005 ; Koomen et al.,1990**).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Isolement des bactéries à partir des nodules :

1. Description du site d'accueil :

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de la microbiologie du Hall technologique, université 20 août 1955, (figure 9), (latitude 36,8490887°) et (longitude 6,8898355°), Pendant une période de 2 mois, du 15 /03/2022 jusqu'au 15 /05/2022.

Les tâches effectuées sont les suivantes :

- Conservation des nodules après la collecte,
- Préparation des milieux des cultures,
- Isolement et caractérisation phénotypique (cultureux, microscopique, biochimique et physiologique).

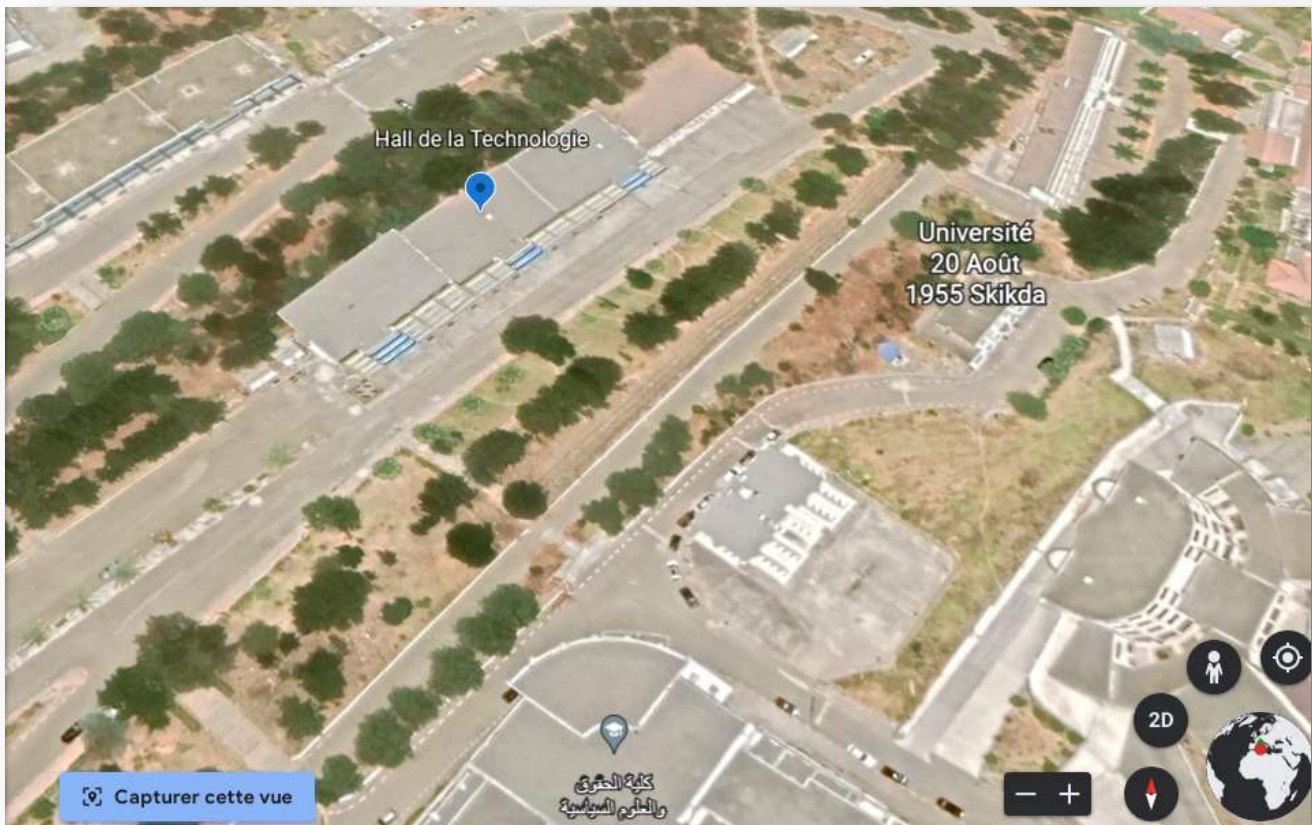


Figure 9 : Carte géographique du site de prélèvement des plantes sauvages (Google Earth, 2022)

2. Site d'échantillonnage :

Deux plantes sauvages spontanées (*Lotus ornithopodioides* L., *vicia stativa* ssp *segetalis*) ont été récoltées au niveau jardin botanique du Service Commun de Recherche pole de Vulgarisation Botanique de l'université 20 aout 1955, Skikda.



Figure 20: Site d'échantillonnage

3. Matériel Biologique :

Les Nodules des deux espèces sauvages *Lotus ornithopodioides* L., *vicia stativa* ssp *segetalis* afin d'isoler des souches microbiennes de *Rhizobium*.

4. Méthodes :

4.1. La collecte des Nodules :

Nous avons récolté les plantes durant la période s'étalant de mars à Avril,

La période de la récolte est un critère important car doit coïncider avec la maturation des nodules et bonne activité bactérienne afin de mettre l'isolement d'une variété des souches efficaces.

La collecte a été effectuée selon les techniques recommandées par (Vincent,1970 ; Somasegaran et Hoben,1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm sous terre pour extraire la plante et son système racinaire.

Manuellement, on a débarrassé la terre au niveau des racines sans abîmer les nodules, les plantes sont acheminées au laboratoire dans des sacs plastiques.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Au laboratoire, les parties aériennes sont retirées, et les racines sont Rincer délicatement sous un courant d'eau des restes des terres, puis sécher au papier absorbant. (Figure 10 et 11)
Les nodules sont coupés à 2 mm du site de fixation avec un ciseau, séchés avec du papier absorbant et stockés, (Benselama, 2015).



Figure 11 : photo de *vicia sativa ssp segatli s*; **A** : feuilles : **Racines**



Figure 12 : photo de *lotus ornithopodides* ; **A** : feuilles, **B** : **Racines**.

4.2. Conservation des nodules par déshydratation :

Le jour même du prélèvement, conserver les nodules par déshydratation dans des flacons en verre contenant du CaCl_2 . Remplissez Le flacon en verre aux deux tiers avec du chlorure de calcium et une couche de coton sur laquelle reposent les nodules (figure 13).

Chaque flacon doit être étiqueté avec les informations suivantes :

- Nom de la plante hôte
- Date de conservation
- Lieu de prélèvement.
- Ainsi conditionnés, les nodules peuvent être conservés pendant plus d'un an au réfrigérateur à $+4^\circ\text{C}$ s Les nodosités d'une même plante doivent être mises dans un même flacon.

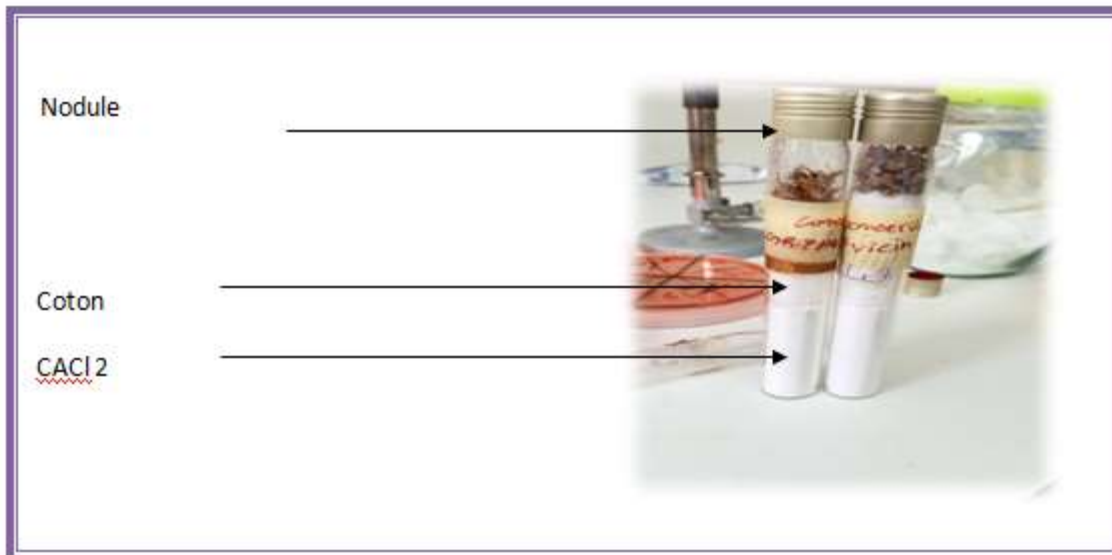


Figure 13 : conversion des nodules (*Lotus ornithopodioides*, *Vicia segetalis*) par déshydratation

5. Stérilisation des nodules :

La technique classique d'isolement des souches de *Rhizobium* décrite par (Cleyet-Marel,1989) a été adoptée. Les nodules roses (la pigmentation rose révèle la présence de la légghémoglobine), récupérés à partir des racines de *Lotus ornithopodioides* et *vicia sativa ssp segetalis* sont stérilisés superficiellement par immersion dans l'éthanol à 95° durant 30 secondes, puis dans une solution de chlorure mercurique HgCl₂ à 0,1 % ou l'eau javel pendant deux minutes pour éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère. Ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, (figure 14) (Sobti,2013).

Toutes les manipulations microbiologiques sont effectuées dans des conditions stériles c'est-à-dire autour de la flamme du bec bunsen.



Figure 14 : Stérilisation des Nodules

6. Test de stérilisation :

Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+Rouge Congo, puis l'incuber à 30°C pendant 24 heures, et cela pour de mettre à vérifier l'efficacité de la stérilisation, afin d'éliminons rapidement les souches contaminées à l'issa d'un nodule non stérilisé.

7. Isolement des bactéries selon les méthodes des nodules écrasés :

Dans notre étude on à utiliser deux méthodes :

1. La première méthode

L'isolement est réalisé selon la méthode préconisée par **Vincent, (1970)**.

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte ou deux d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile avec une pince flambée.

2. La deuxième méthode

Les nodules sont réhydratés avec de l'eau distillée stérile dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans l'éthanol pendant 3 min.

Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace. Les nodules sont ensuite écrasés dans les tubes Eppendorf stériles (dans deux gouttes d'eau stérile).

Le broyat obtenu à partir de ces deux méthodes est ensemencé à l'aide d'une Anse sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA+ Rouge Congo, l'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants et avec flambage d'anse de platine de manière à avoir des colonies bien isolées, (Figure 15). Les boît sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures, (**Nouar, M et Riab K, 2014**).

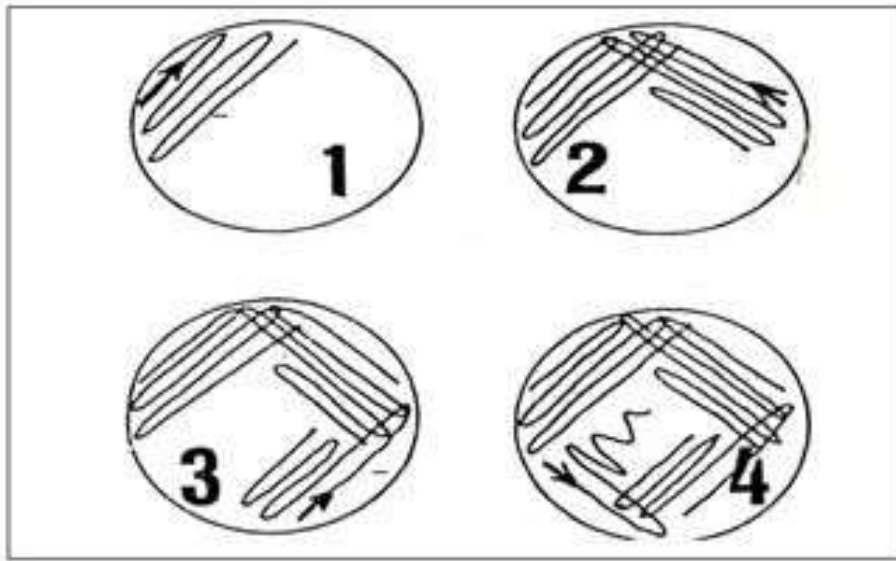


Figure 15 : isolement par la méthode des quatre quadrants, (Vincent, 1970)

II. Isolement et caractérisation phénotypique des isolats :

1. Milieux de culture principale :

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux de culture doivent contenir la source d'énergie et source de carbone nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cette raison on doit utiliser :

- Milieu liquide :

YMB (Yeast Manitol Broth) : bouillon de culture liquide ne contient pas d'agar-agar, qui possèdent la même fonction de l'YMA, Utilisé pour préparer les suspensions bactériennes. (Annex)

- Milieux solides :

YMA : Un milieu de culture solide, utilisé pour isoler et conserver les souches de bactéries fixatrices d'azote dans les nodules, et ainsi de mettre en évidence la morphologie et les caractéristiques des Colonies (couleur, texture, etc...), (Annex) L'apparition des colonies blanchâtres ou transparentes sur la surface de gélose (Vincent ,1970).

YMA + RC (Yeast Manitol Agar + Rouge Congo) : Mettre en évidence la morphologie et les caractéristiques des colonies (couleur, texture, etc...) ainsi que de vérifier la pureté des souches isolées, est aussi pour éviter toute contaminations par les bactéries (*Actinomycètes*, *Agrobacter*...), selon le degré d'absorption du colorant. (Annex)

- I. Les colonies qui absorbent fortement le colorant sont des bactéries contaminants.
- II. Les colonies qui absorbent peu ou faiblement le colorant sont des bactéries suspectées des *Rhizobia* (Somas-garan et Hoben ,1985).

YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Bleu), mettre en évidence la capacité des isolats à acidifier ou alcaliniser le milieu YMA. (Annex)

- La coloration jaune indique une acidification du milieu.

- La coloration bleuâtre indique une alcalinisation du milieu (Somasegaran et Hoben, 1985).

YMA+ CaCO₃ (Yeast Mannitol Agar + Carbonate de Calcium) :un milieu de conservation des isolats (Vincent, 1970).

Tous les milieux de culture solides sont à base d'YMA, avec lesquels des boites de pétrie sont Remplie jusqu'au trois quarts de la boite. Ainsi, l'ensemencement est réalisé sur les différents milieux solides utilisés (à l'exception le milieu de conservation), durée de l'incubation 24h à 15jrs à 30°C. (Annex)

2. Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994), des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaire pour leur purification. La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant l'YMB, puis les tubes sont vortexet incubé à 30°C pendant 24h. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram + coloration de vert de malachite) et morphologiques sont enfin réalisés.

a. Examen microscopique :

2.3.1 Examen direct à l'état frais :

Afin déterminer la mobilité, la morphologie et le mode de regroupement.

Cette méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool à l'objectif×40, (Denis et al.,2011). Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, leur mode de regroupement et leur mobilité éventuelle (Delarras,2010).

2.3.2 Examen direct après coloration de gram :

Dans notre étude, nous avons réalisé la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupe Gram positif et Gram négatif, (Tortora., 2003).

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Denis et al.,2011).

- Un frottis fixé à la chaleur :

Recouvrir la lame par un colorant basique le violet de Gentiane : 1min

- Rincer à l'eau courante.
- Chasser le violet avec le **Lugol** : 1 min
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis par la **Fushine** : 1 minute.
- Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant.
- Observer au microscope à l'objectif×100 à immersion.

i. Examen directe après coloration au vert de malachite à froid :

C'est un test de sporulation, il permet de différencier les endospores et les cellules végétatives, Les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, les sports en vert dans leurs sporanges rouges et les sports libres en vert,(**Delarras,2010**) (Technique modifié).

Protocole de la coloration :

- Faire un frottis et le fixer par la chaleur.
- Recouvrir de frottis de **vert de malachite** : 20min.
- Rincer le vert de malachite à l'eau distillée.
- Contre-colorer à la**Fushine** : 10 secondes.
- Rincer à l'eau distillée puis sécher la coloration.
- Observer à l'immersion objectif×100.

b. Caractères cultureux des isolats

i. Croissance sur le milieu YMA

Une boîte pétrie estensemencée sur le milieu YMA les caractéristiques morphologiques sont examinées à partir 48h jusqu'à 7jours, (**Vincent ,1970**).

Les critères principaux retenus sont : la taille des colonies, la forme, la couleur, l'opacité, la surface, le contour, la consistance.

ii. Absorption du rouge Congo :

Ce test consistait à cultiver des isolats et des souches témoins dans du milieux YMA + de rouge Congo et incubé à 30°C pendant 24heures.Le rouge Congo est mal absorbé par les colonies typiques de rhizobiums par rapport aux contaminants inefficaces ou aux souches occupant les nodules,(**Jordan 1984 ; Somasgaran et Hoben,1994**).

iii. Test du bleu de Bromothymol BTB (vitesse de croissance)

Les *Rhizobia*, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*...) (Jordan, 1984 ; Pagano, 2008). Pour cela nos isolats sont cultivés sur le milieu YMA + bleu de Bromothymol (BTB). Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries à croissance rapide effectuent une réaction acide qui change la couleur verte du milieu en jaune (Somasegaran et Hoben, 1994).

iv. Conservation des souches :

Les souches pures sont conservées sur des biotes et des tubes en gélose inclinée contenant des milieux YMA additionné de CaCO_3 (3 g/L), (Figure 15) comme neutralisant d'acide (Vincent, 1970). Après incubation, les souches ont été conservées au réfrigérateur à 4°C pour déterminer leur caractérisation.



Figure 15 : Ensemencement sur des tubes contenant le milieu YMA+ CaCO_3 (3g/l) incliné.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

Mesure de la vitesse de la croissance

La vitesse de croissance des *Rhizobia* ont été étudiés en cultivant sur le milieu YMA additionné de bleu de Bromothymol. Sur ce milieu, la souche provoque une acidification et la couleur vire au jaune. Le temps nécessaire à cette réaction colorimétrique différencie la croissance bactérienne rapide, le ph change après 24 heures d'incubation, par exemple (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*...); et des bactéries à croissance lente dont l'acidification peut atteindre 4-5 jours, comme dans le genre *Bradyrhizobium*.

4. Caractérisation biochimique des isolats

Les caractères biochimiques retenus et testés dans cette étude sont au nombre de 3 tests. Malheureusement, en raison de la pandémie de Corona et le manque de produits et des tests, nous n'avons pas réalisé que les trois tests suivants : la 3-cétolactose, la fermentation du mannitol, la catalase.

4.1. Distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Test du 3-cétolactose) :

Ce test permet de distinguer les colonies de *Rhizobia* et d'*Agrobacterium* dont seul ce dernier produit l'enzyme, une 3-cétoglucosidase, sur les milieux successifs suivants :

Milieu 1 : Gélose Nutritif Alcalin (GNA)

- Extrait de levure 10g
- Glucose 20g
- Carbonate de calcium 20g
- Agar 18g
- Eau distillée 1000 ml

Après 4jrs d'incubation à 30° une anse de ce milieu est repiquée sur milieu solide contenant :

Milieu 2: Lactosé

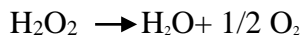
- Lactose 10g
- Extrait de levure 1g
- Agar 18g
- Eau distillée 1000 ml

Les boîtes sont incubées 4jrs à 30°C, après incubation inonder les boîtes avec une couche de la réactif Benedict.

La présence de cet enzyme se manifeste après environ 20 min par la formation d'un halo jaune de Cu_2O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

4.2. La recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), (Delarras, 2014).

4.3. Fermentation du mannitol (test de mobilité) :

L'utilisation du mannitol par la bactérie se traduit par le virage du (rouge de phénol) au jaune (production d'acide). La mobilité est interprétée par la croissance au niveau de toute la gélose molle et ont conclu que la bactérie est mobile ; la croissance autour de la piqure centrale révèle que la bactérie est immobile.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile :

- 1- Prélever à partir de la suspension bactérienne de 24 heures.
- 2- Faire une piqure centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. (Figure 16)
- 3- Incuber pendant 24 heures à $30^\circ C$ puis observer.

Ce milieu permet de voir le métabolisme énergétique des bactéries (recherche de nitrate réductase) et l'étude de la mobilité, (Cassagne, 1996).

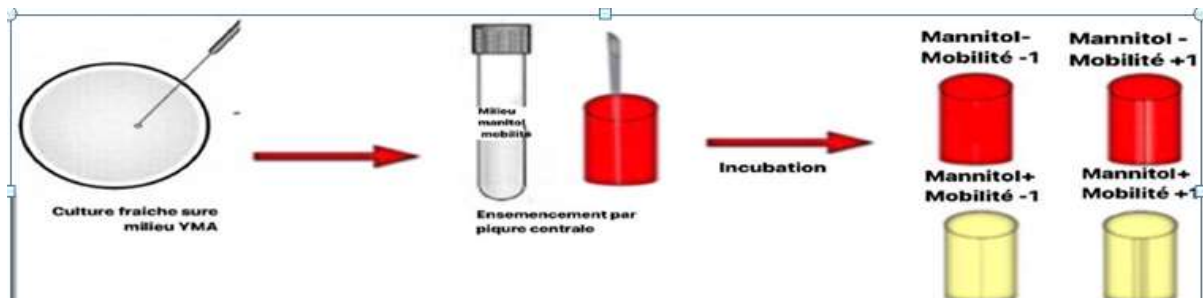


Figure 16 : technique de la mise en évidence de la fermentation du mannitol.

5. Caractères physiologiques (Températures) :

Malheureusement, pour les mêmes raisons qui nous ont limité pour les tests biochimiques nous n'avons pu réaliser que ce test parmi les tests physiologiques

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont Ensemencées sur le milieu YMA (Annexe 1) par la méthode des stries simples et incubées à différentes températures : 4°C, 27°C, 30°C, 37°C, 40°C et 45°C.

Les souches sont incubées pendant 24 à 48 heures (pour toutes les souches).

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Nous avons entrepris dans ce travail, l'isolement et la caractérisation des souches de rhizobium à partir des espèces sauvages *Vicia stativa ssp segetalis* et *Lotus ornithopodioides*, dans un but ultimum des recherches de souches performantes pouvant être des candidates à l'élaboration d'inoculum.

1. Caractérisation des nodules collecte :

Les nodules récoltés ont présenté des tailles, des formes et des couleurs différents,

1.1 Chez *vicia stativa ssp segetalis* :

Cette espèce a été caractérisée par un taux de nodulation important atteignant 30 nodules /plante, présents en amas et bilobés. Les nodules présentaient des tailles variées entre grands et petits, dont la forme était allongée pour certains et sphérique pour les autres. Nous avons remarqué une couleur rose pour les nodules collectés, à l'exception de certains récoltés en mois d'Avril, qui présentaient une coloration verte.

1.2 Chez *Lotus ornithopodioides* :

Cette espèce présente un faible taux de nodulation (5 nodules/plante), en comparaison avec la première. Elle est aussi caractérisée par des nodules sphériques de petite taille, de couleur rose.

Cette variation serait due à la différence entre les espèces rhizobiennes ayant nodulé ces légumineuses et à l'origine des sols de provenance des plantes.

Un trait fondamental de l'association *Rhizobium*-légumineuses est la spécificité de cette relation. En effet, une légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de *Rhizobium*. Au même titre, une espèce de *rhizobium* ne peut établir une relation symbiotique efficace qu'avec un spectre limité d'espèces végétales (Tilak et al.,2005).

De cette spécificité et des mécanismes de nodulation, il en résulte que le nombre de nodules est régulée par la plante, afin de maintenir un équilibre entre bénéfice (fixation symbiotique d'azote) /coût (ressources en carbone). Ainsi, des nodules en formation sur des racines en développement peuvent être bloqués(Stacey et al.,2006). Cela peut expliquer l'observation de petits nodules de taille différente de celles des nodules fonctionnels chez *V. stativa ssp segetalis*.

Chapitre 3 : Résultat et discussion

La couleur rose des nodules signifie la présence de légghémoglobine indicatrice de symbiose active, Ce pigment assure la diffusion de l'oxygène moléculaire sous une faible pression pour protéger la nitrogénase (enzyme qui assure la réduction de l'azote N_2 en ammoniac NH_3). La couleur verte signifie que les nodules sont âgés. La sénescence s'accompagne d'une baisse de la fixation de l'azote, (Chabbi, 2010). D'où notre observation de nodules verts chez l'espèce *V.stativa ssp segetalis* récoltée en mois d'Avril.

2. Test de stérilisation :

Ce test permet de vérifier l'efficacité de la technique utilisée pour la stérilisation des nodules, et ceci se manifestera par l'absence de croissance des bactéries sur le milieu YMA+RC. Nos résultats montrent que pour l'espèce *L.ornithopodioides*, le protocole de stérilisation était efficace, car peu de nodules ont été contaminés.

Contrairement, pour l'espèce *V. stativa* le grand nombre de nodules contaminés serait soit due à des erreurs de manipulations, soit à un temps de stérilisation insuffisant. En effet, les nodules de cette espèce sont plus grands, et pourront nécessiter un temps supplémentaire dans l'alcool ou l'eau de javel.

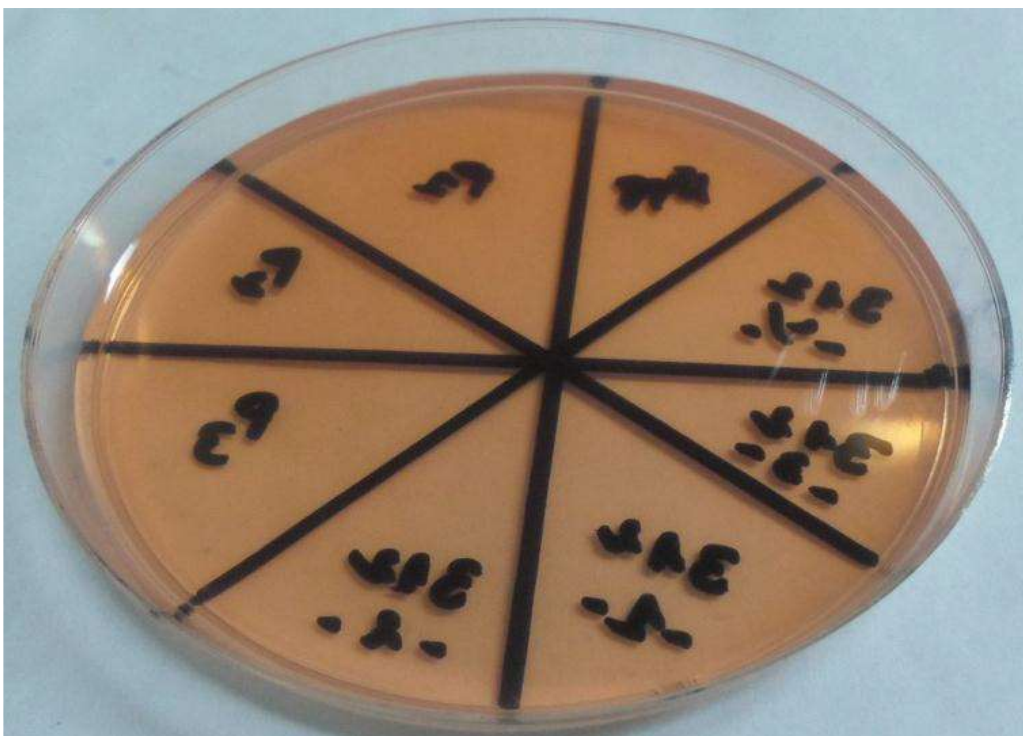


Figure 18 : Test de stérilisation des nodules de l'espèce lotus et vicia

Chapitre 3 : Résultat et discussion

3. Croissance des non *Rizobia* sur le milieu YMA+RC

Les résultats détaillés pour chaque isolat ont représenté dans le tableau (2). Quatre souches se sont révélées des non *Rhizobia* (L7, V6, V8 et V5), du fait de leur forte absorbance du rouge Congo, dont trois extraites de *Vicia* et une extraite de l'espèce *Lotus*

Tableau (2) : Caractéristique macroscopique des isolats non *Rhizobia* sur le milieu YMA+RC.

Isolats	YMA+RC
L7	Rouge (forte absorption) après 24hd'incubation
V5	Rouge (forte absorption) après 24hd'incubation
V6	Rouge (forte absorption) après 24hd'incubation
V8	Rouge (forte absorption) après 24hd'incubation



Figure19: Aspect macroscopique des isolats non *Rhizobium* sur le milieu (YMA+RC).

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Tableau (3) : Aspect microscopique des isolats non *Rhizobium*

Isolats	Mobilité	Forme	Mode de regroupement	Coloration de gram	Vert de malachite
L7	-	Bacille long	En amas	G-	Non sporulé
V5	-	Bacille	isolé	G-	Non sporulé
V6	-	Filament	Chainette	G-	Non sporulé
V8	-	Bacille longue	isolé	G-	sporulé

G- : Gram négatif.

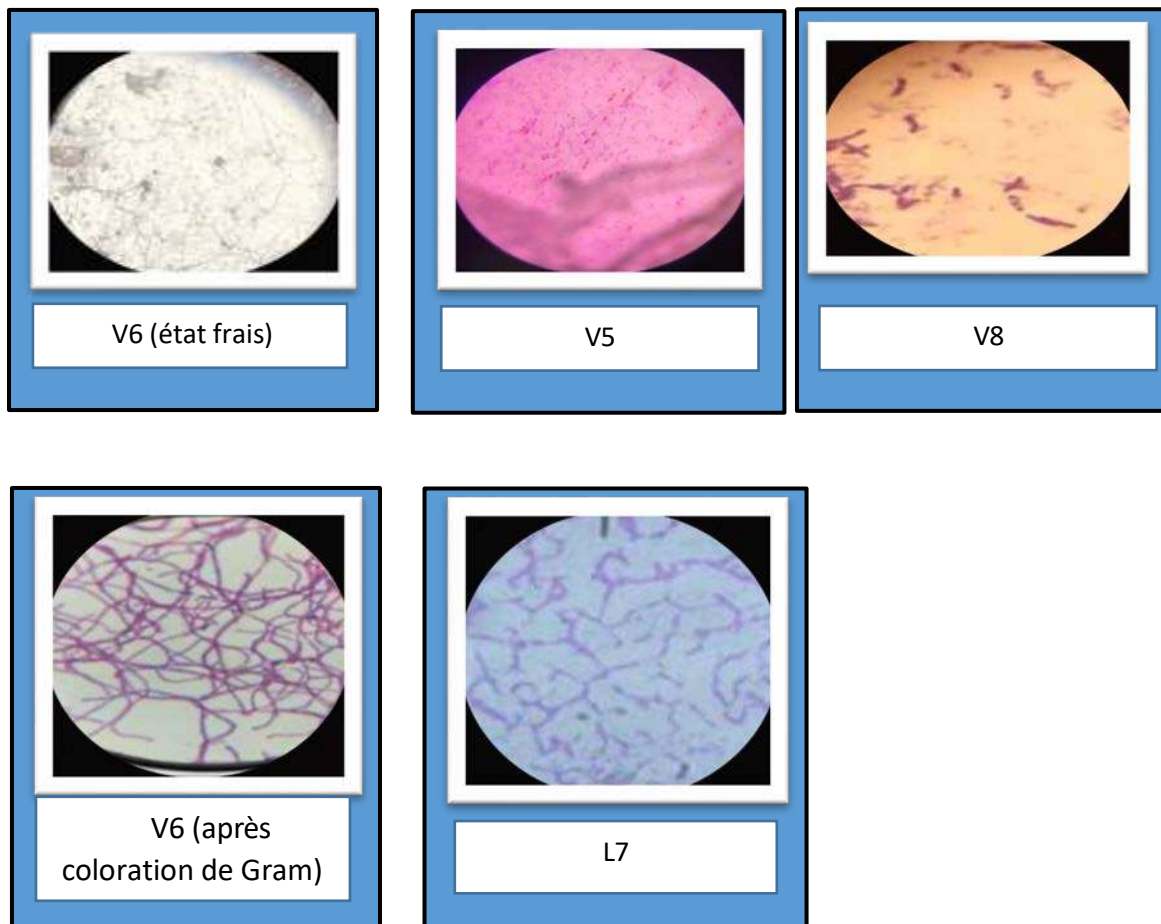


Figure 20: Observation microscopique des isolats non *Rhizobia* après coloration de Gram objectif x100

Des bactéries endophytes dans les racines, les tiges et nodule racinaire de *Melilotus dentatus* et autres légumineuses, ont été signalés (Mahdhi et al., 2007 ; Stajakovic et al., 2009). Ainsi des bactéries endophytes non *rhizobium* ont été isolées à partir de nodules racinaire stériles de *L. ornithopodiodes*, étaient des souche Gram négatif identifiées comme *Bacillus megaterium* ; *Brevibacillus choshinensis* ; *Micobacterium trichothecenolyticum* (Stajković et al., 2009). Cependant, la co-inoculation de toutes les souches non *rhizobiennes* avec *Ensifer* (*Sinorhizobium meliloti*) influence positivement le nombre de nodule chez la luzerne. (Elvera-Recueno et al., 2000; Baï et al., 2002; Benhizia et al., 2004 et Muresu et al., 2008). À travers ces résultats nous pouvons admettre que les 4 isolats sont des non *Rhizobia* endophytes des nodules des espèces de *L. ornithopodiodes* et *V. stativa*.

4. Croissance des *Rizobia* sur le milieu YMA+RC

Les résultats détaillés pour chaque isolat sont représentés dans le tableau (4). Six isolats extraient de l'espèce *L. ornithopodioides* et deux de l'espèce *V.stativa*. La faible absorption du rouge Congo de ces isolats (figure 23), concorde avec les résultats de l'absorption du rouge Congo chez les souches étudiées par **El Hilali(2006)**. Sont immobiles, Gram- et non sporulés. Donc les 12 isolats de départ sont probablement considérés comme des *Rhizobia*, (tableau 5).

Les résultats détaillés pour chaque isolats ont représentés dans les tableau (4 et 5)

Tableau (4) : Caractérisation macroscopique des *Rhizobia* sur le milieu YMA+RC

Isolats	YMA+RC
L2	Rosâtre (légère absorption)
L3	Rosâtre (légère absorption)
L4	Rosâtre (légère absorption)
L5	Rosâtre (légère absorption)
L6	Rosâtre (légère absorption)
L8	Rosâtre (légère absorption)
V9	Rosâtre (légère absorption)
V10	Rosâtre (légère absorption)

L : Extrait à partir des nodules de *Lotus*. **V** : Extrait à partir des nodules de *Vicia*.

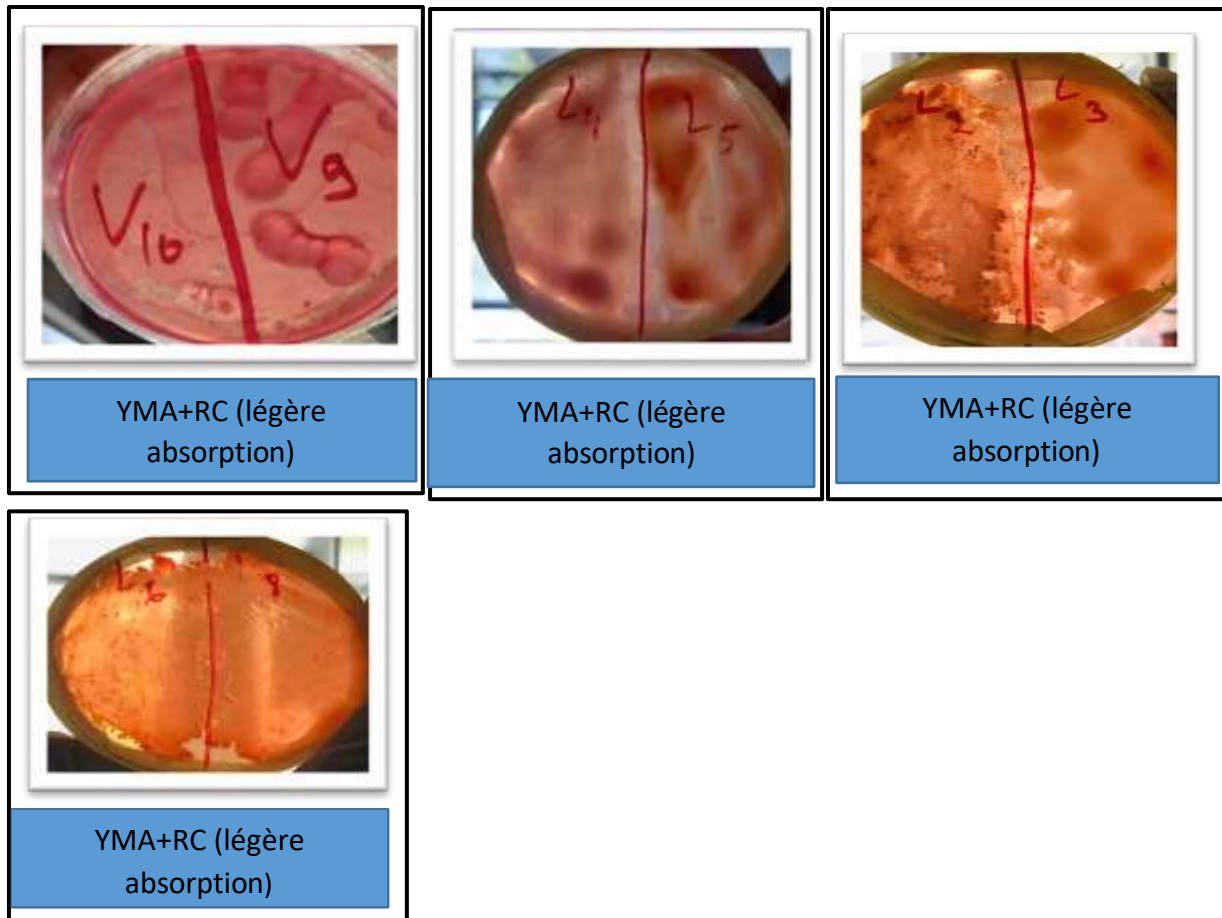


Figure21 : Aspect macroscopique des *Rhizobia* sur le milieu (YMA+RC).

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Tableau (5) : Aspects microscopique des *Rhizobia*

Isolats	Mobilité	Forme	Mode de regroupement	Coloration de Gram	Vert de malachite
L2	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé
L3	-	Bacille courte	Isolé	G-	Non sporulé
L4	-	Bacille courte	Isolé	G-	Non sporulé
L5	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé
L6	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé
L8	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé
L9	-	Bacille courte	Isolé	G-	Non sporulé
L10	-	Bacille courte	Isolé	G-	Non sporulé
V5	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé
V9	-	Bacille courte	Isolé	G-	Non sporulé
V10	-	Bacille très courte	Isolé	G-	Non sporulé

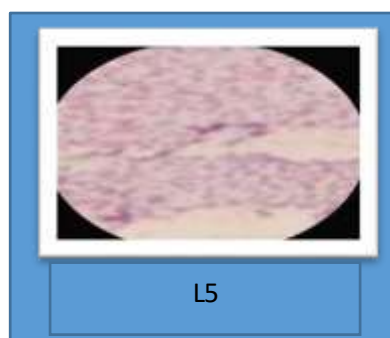
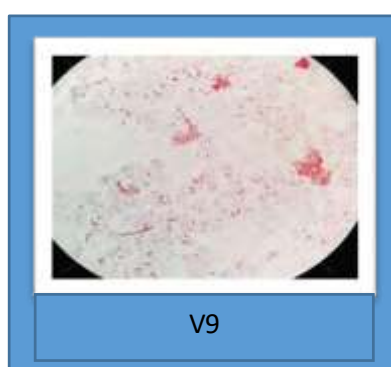


Figure22 : Observation microscopique des *Rhizobia* après coloration de Gram objectif x100

5. Caractères morphologiques et culturels :

5.1. Caractérisation culturelle sur milieu YMA :

Après une série de stérilisation sur les différents milieux de cultures et de repiquage, 3 isolats ont été obtenus. Ce petit nombre de souche isolée est expliqué par une grande série de contamination environnementale accidentelle de nos boîtes, en raison de la manipulation de souche de moisissures et leur incubation dans la même étuve, que nos échantillons.

Pour l'espèce *V.stativa*, un seul isolat est obtenu puisque déjà la majorité des nodules étaient contaminés et de ce fait exclus.

Les 3 isolats qui sont suspectés comme des bactéries *rhizobium* sont repiqués sur milieu YMA. L'observation macroscopique des isolats étudiés sur le milieu YMA a révélé la présence des caractéristiques morphologiques différentes (Diamètre de colonie, forme, Surface, Relief Opacité, Consistance et Couleur), les résultats dans (le tableau 6).

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YMA. Les colonies sont d'une couleur blanchâtre ou transparente, d'un diamètre qui varie entre 2 et 4 mm, sous forme ronde avec un contour régulier, une surface bombée ou semi bombée et lisse. Elles sont translucides, visqueuses et brillantes, avec une texture homogène.

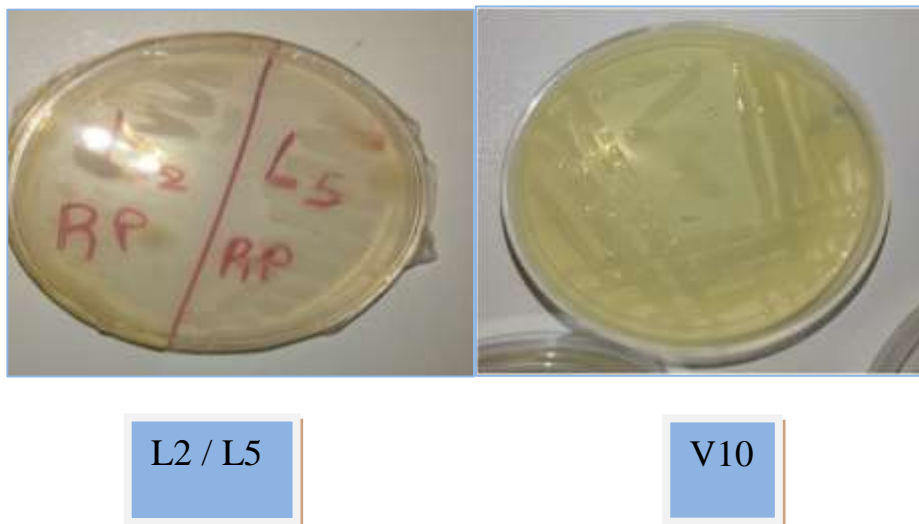


Figure 23 : la croissance sur le milieu YMA

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Tableau 6 : présentation du résultat des caractères morphologiques sur le milieu YMA :

Isolats	Diamètre de colonie	Forme	Surface	Relief	Contour	Opacité	Consistance	Couleur
V10	3mm	Ronde	Lisse, Semi-Bombé	D.B	Régulier	Trans.P	muq	Transp
L2	4mm	Ronde	Lisse Bombé	D.B	Régulier	Trans.P	muq	Blanc
L5	3mm	Ronde	Lisse Bombé	D.B	Régulier	Trans.P	muq	Blanc

5.2. La vitesse de croissance (Test du BTB) :

Les résultats de ces tests sont représentés dans le (tableau7).

Tableau (7) : Test d'acidification ou alcalinisation (BTB) ;(vitesse de croissance).

Souches	Acidification ou Alcalinisation du (YMA+BTB)	Vitesse décroissance
L2	Acidification	Croissance rapide
L3	Alcalinisation	Croissance lent
L5	Acidification	Croissance rapide
L6	Alcalinisation	Croissance lent
L8	Acidification	Croissance rapide
L9	Alcalinisation	Croissance lent
L10	Alcalinisation	Croissance lent
V5	Alcalinisation	Croissance lent
V6	Acidification	Croissance rapide
V9	Acidification	Croissance rapide
V10	Alcalinisation	Croissance lent

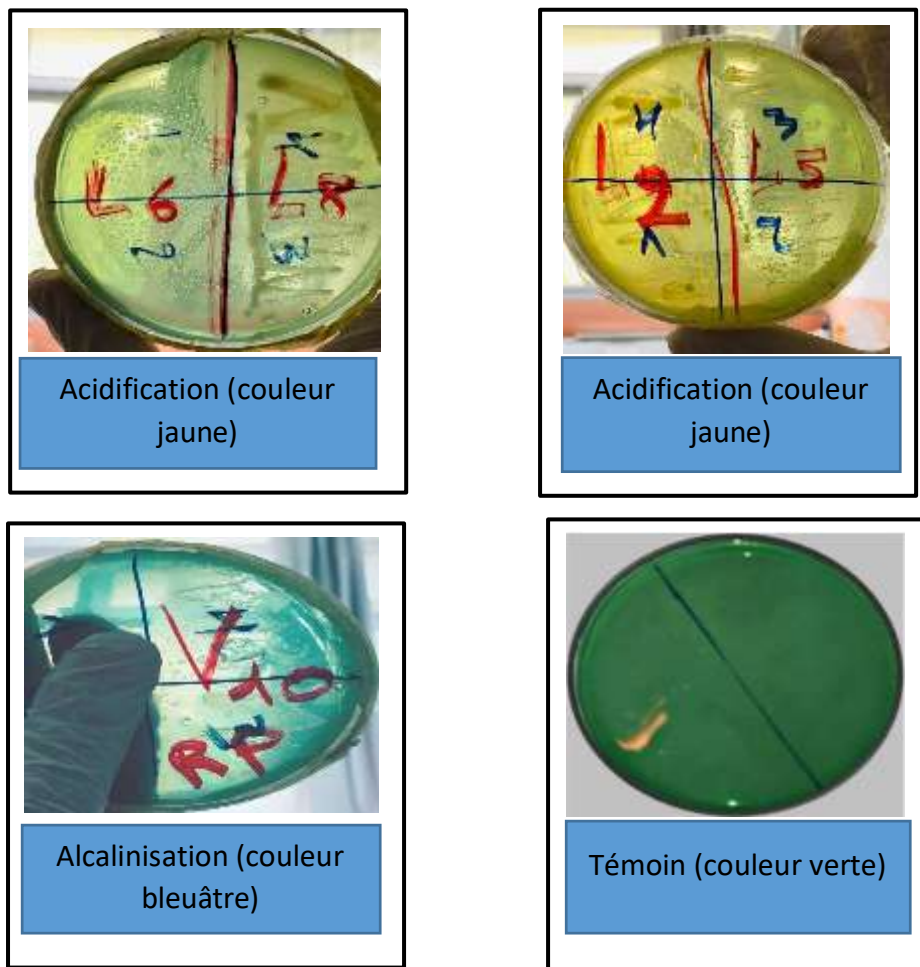


Figure 24 : Test de BTB de quelques isolats

Pour ce qui est du test d'acidification ou d'alcalinisation des milieux de culture ; les isolats testés sont acidifiants (5 isolats) ou alcalifiants (6 isolats) le milieu YMA+BTB (Figure24).

Il à noter que les *Rhizobia* à croissance rapide sont généralement acidifiantes et appartiennent au genre *Rhizobium*, *Mesorhisobium*, alors que les *Rhizobium* à la croissance lente alcalinisent le milieu de culture et appartiennent au genre *Bradyrhizobium* (Somasegaran et Hoben ,1985 ; Jordan ,1984). Ce résultat résume l'appartenance des souches du deuxième groupe aux *Bradyrhizobium* et celles du premier groupe aux autres genres (*Rhizobium*, *Mesorhisobium*).

Chapitre 3 : Résultat et discussion

6. Caractères biochimique des souches :

6.1. Distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Après addition du réactif de Benedict, aucun halo n'est formé autour des souches et ces dernières restent toujours blanchâtre, ceci signifie que tous les isolats ne produisent pas la 3-cétglycosidase et donc n'oxydent pas le C3 diglycosylde saccharides. Par conséquent, on peut conclure qu'aucune des souches isolées ne correspond à *Agrobacterium*

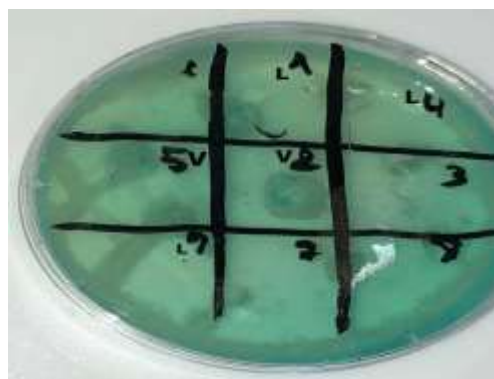


Figure 25 :Photo des résultats du test de 3-cétolactose.

Chapitre 3 : Résultat et discussion

6.2. Le test du mannitol mobilité (la fermentation du mannitol) :

Les résultats obtenus à partir de ce test seront différentielle et (le tableau 8) et (figure26), montrent l'utilisation du mannitol entre les isolats. Et pour la mobilité : toutes nos isolats à cause de leurs croissances autour de la piqure centrale se révèle que les bactéries sont immobiles.

Tableau 8 : représente les résultats du test de mannitol mobilité :

L'utilisation du mannitol	V10	L2	L5
Virage rouge de phénol	-	-	-
Virage jaune (forte production d'acide)	+	-	-
Virage orangé (production moyenne d'acide)	-	+	+



Figure 26 : mannitol +, mobilité –.

6.3. Le test catalase :

Les résultats du test révèlent que tous les isolats sont catalase positive, sont effectivement des caractères des Rhizobia (Jordon, 1984), la catalase est un enzyme qui joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres toxiques qui sont générés en particulier sous stress environnementaux.

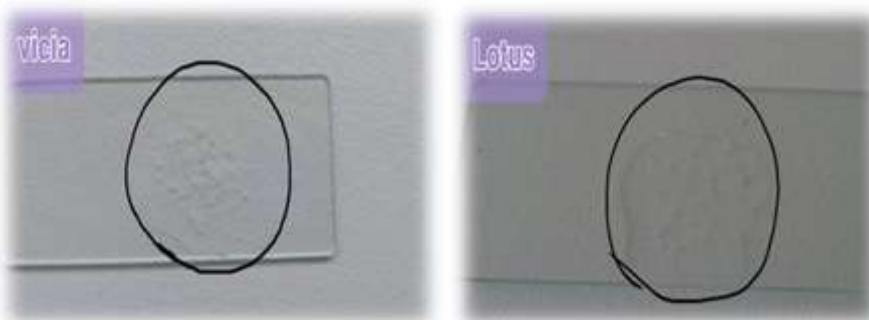


Figure 27 : résultat de test catalase (oxydase)

7. Tests physiologiques

Effet de température :

Les résultats du test de température sont représentés dans le tableau suivant (tableau 9), il montre que la plupart des souches isolées à partir de *L. ornithopodioides* et *V. stativa* sont capables de croître à des températures comprises entre 4°C et 45°C, avec une croissance optimale entre 27 à 37°C puisque les colonies sont apparues rapidement (une journée après incubation).

Tableau 9 : résultats du test de température.

T°	4°C	27°C	30°C	37°C	40°C	45°C
souche						
V10	3jrs	1j	1j	1j	2jrs	2jrs
L2	2jrs	1j	1j	1j	2jrs	2jrs
L5	2jrs	1j	1j	1j	2jrs	2jrs

La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol. L'influence de la température sur la croissance est en fait une mesure de l'influence de la température sur la turgescence et sur l'action des enzymes de la cellule (**Prévost et al., 1997**). Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries (**Young et al., 2011**). Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes, (**Hume et al. 2000**).

Bougueroua et Hamioud, (2019), ont caractérisé aussi des souches résistantes à des températures hautes. Isolées à partir de *Medicago polymorpha* et *Scorpiurus mirucatus*, récolté aussi du Campus de notre université, (**Zahran, 1999**) a rapporté que la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce.

Chapitre 3 : Résultat et discussion

Parallèlement à nos résultats, **(Bordeleau et al., (1994)** rapporte que les rhizobia sont tolérants aux basses températures de l'ordre de 4°C. Le stress thermique (non extrême) induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HcP (Heatshockproteins), qui température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce.

assurent la protection des enzymes clefs de la physiologie microbienne **(Cloutier et al., 1992)**.

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de l'espèce : '*Lotus ornithopodioides*' et '*vicia stativa ssp segetalis*', Cette recherche a pour le premier objectif de déceler les caractéristiques des souches et leurs diversités, et la détermination de l'objectif ultérieure est la recherche des souches performantes dans la nodulation et la fixation d'azote pour être utiliser dans l'inoculum.

En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**). Notre étude microscopique montre des bacilles de différentes tailles, à Gram négatif ; ces aspects sont observés par ailleurs avec les souches de référence utilisées dans nos expérimentations.

Les études phénotypiques, notamment la morphologie des colonies sur YMA, la vitesse de Croissance, culture des souches sur milieux spécifiques, nous font croire que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium*.

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse '*Lotus ornithopodioides*' ont le même aspect morphologique que les souches de '*vicia stativa ssp segetalis*' (souches appartenant au genre *Rhizobium*). Ce résultat est confirmé par la vitesse de croissance des isolats qui est rapide (obtenue en 48h sur milieu YMA+BTB) ; ce qui peut nous orienter vers le genre *Rhizobium*.

L'étude des facteurs abiotiques (température) fait ressortir que :

Dans la mesure où les racines sont prélevées d'un sol situé en zone fertile (un jardin botanique de la région d'El-Hadaiek Skikda), on note que les souches peuvent croître à des températures élevées atteignant les 44°C qui leur confèrent la propriété des bactéries thermo-tolérantes et, elles poussent à un excellent rythme à température ambiante (pour ces bactéries) 30°C et même à 37°C, Au contraire, à basse température, elles se croissent, mais à un rythme décroissant à mesure que la température diminue de 27°C à 4°C.

Conclusion

A travers ces résultats, nous pouvons admettre que nos isolats possèdent un profil de bactéries nodulant les légumineuses (**Zakhia et de Ladjudie, 2001., Benhizia et al., 2004**), ou de *rhizobia*(**Vincent,1970.,1982**). Par conséquent, nous n'avons pas pu ressortir une distinction appréciable afin de confirmer que nos isolats appartiennent au genre *Rhizobium* ou B.N.L à cause de l'absence de l'examen génotypique basé sur les techniques moléculaires, test de nodulation et le test de la nodulation croisée.



Référence Bibliographique

Référence Bibliographique

- 1- Abdelguerfi A., Abdelguerfi-Laouar M. Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza: CIHEAM, 2004. p. 29-41 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)
 - 2- Abdelguerfi A. et *all*, les légumineuses alimentaires en Algérie : situation, état des ressources phylogénétiques et cas du pois chiche à Bejaïa, journées scientifiques de l'inraa, Bejaïa, 11-12 Fév. 2001 n°3, page 171, en ligne
 - 3- Aguirreolea J et Sanchez-dgaz., (1989). CO₂ Evolution by nodulated roots in *Medicago Sativa* L. under water stress. *Journal plant physiol.* 134:598-602.
 - 4- Anonyme2, 2022 : <https://fr-academic.com/dic.nsf/frwiki/1073876>
 - 5- Aouadj R., SaidiSief O. 2015. Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes légumineuses fourragères *Hedysarum pallidum* Desf poussant dans la région de Djebel Boutaleb (Setif). Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine, p15, 16
 - 6- Bahhady F.A., Christiansen S., Thomson E.F., Harris H., Eskridge k.m., Papechristiansen A. (1997) : "Performance of Awassi lambs grazing common vetch in on-farm and on-station trials", *Proc. Symp. on Crop/Livestock Integration*, Amman, Jordan (in press).
 - 7- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D. L., & Driscoll, B. T. (2002). Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3), 230-238.
 - 8- Based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 92 Issue 6, 1043 P. (Laranjo, 2002)
 - 9- Beijerinck M.W., 1888. Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung*. 46, 797- 804 (Beijerinck, 1888).
 - 10- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., & Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and applied microbiology*, 27(4), 462-468.
 - 11- Benselama Amel, Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique, Thèse Présenté pour l'obtention du : Diplôme de doctorat 3ème
-

Référence Bibliographique

- cycle lmd en biotechnologie specialite : interaction plantes – microorganismes, 2015, page (3-8)
- 12- Berrada. H et Benbrahim. K., 2014.4 (6) : 616 – 639 (Benbrahim.k, 2014) .
- 13- Broughton W .J. ,Jabbouri S. , Perret X., 2000 . – keys to Symbiotic Harmony” Journal of Bacteriology. 182 (20): P 5641- 5649.
- 14- Brunck f., collonaj .-p., dommergues y. R., ducousso m., galian a a., prin y., roederer y., sougoufara b., 1990. La maîtrise de l'inoculation des arbres avec leurs symbioses racinaires : synthèse d'une sélection d'essais au champ en zone tropicale. Bois et forêts des tropiques 223 : 24-42.
- 15- Cassagne, H. (1966). Milieux de culture et leurs applications. Collection "Techniques de base"Entièrement revue et augmentée Techniques de base Éditions de la Tourelle 379 p
- 16- Chabbi R. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister, Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine, p. 7.
- 17- Chaïch, Khaled, « Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. » Springer, 2016, page 10
- 18- COAG, Année internationale des légumineuses : des graines pour nourrir l'avenir, Article scientifique, 2016, page 1
- 19- Cooper JE., 2004. -Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology*. 41:P 15–16.
- 20- D'Haese W., Holsters M., 2002. -Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*. 12: P 80R–98R
- 21- Dardanelli M. Fabra A. , 2003, Angelini J. , and. A calcium - dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots . *Canadian journal of microbiology* 49 : P 400
- 22- Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris.(Davet.P, 1994).
- 23- De Candolle, les Familles des légumineuse, mémoire de fin d'étude, 1825, page 3.
-

Référence Bibliographique

- 24- De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol* 111, page607
 - 25- De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* 111 page 607
 - 26- Delarras, C. (2010). *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux*. (2e ed.), ISBN :978-7430-1211-3; 300 P.
 - 27- Delarras, C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire*. Lavoisier, France.ISBN : 978-2- 7430-1565-7,757P
 - 28- Denis, F., Ploy, M. C., Martin, C., Bingen, E., & Quentin, R. (2011). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences,2 Edition - 640 P
 - 29- Dixon RA., Achnine L., Kota P., Liu C-H., Srinivasa Reddy MS., Wang L., 2002. -The phenyl propanoid pathway and plant defense, a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3: 371- 390
 - 30- Drevon, J.J., P. Hinsinger. *Nutrition phosphatée et réponse des plantes et de la symbiose rhizobienne à la déficience en phosphore (2004)- (drevon, 2004)*.
 - 31- El-Hilali I. 2006. *La symbiose Rhizobium – Lupin : Biodiversité des micro-symbiotes et mise en évidence d’une multi infection nodulaire chez Lupinus luteus*. Thèse Doctorat, Université Mohammed V. Agdal, Rabat.
 - 32- Elvira-Recuenco, M., & Van Vuurde, J. W. L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian journal of microbiology*, 46(11), 1036-1041.
 - 33- Esseling J.J. ,LhuissierFGP . , and EmonsAMC . , 2003. Nod Factor - Induced Root Hair Curling : Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application . *Plant Physiology* 132 : P 1982-1986.
 - 34- F.Dupont et J-L.Guignard , *les familles de plantes*, livre,2005 en ligne, page 3
 - 35- Figueiredo M.V.B. , Martinez C.R. , Burity H.A. , and Chanway C.P. , 2008.Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) . *World . J. Microbiol .Biotechnol .24* : P 1185-1187 .
 - 36- Françoise Caratini,*les plantes*,Edition 1984 Broché– 1 mars 1993, livre en ligne, 1984
-

Référence Bibliographique

- 37- Frank, B., 1889. Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsc. Bot. Ges. 7 pp 332 - 346. (Frank, 1889).
- 38- G Elwyn, A O'Connor, D Stacey, R Volk, A Edwards, A Coulter, ... Bmj 333 (7565), 417, 2006
- 39- Gage D. J. , 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic , nitrogen - fixing rhizobin during nodulation of temperate legumes , Microbiology and Molecular Biology Reviews 68 (2) : P 281-287
- 40- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities(gopalakrishnan, 2014).
- 41- Grama B S, Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie, 2008, page 93.
- 42- Guignard J.L and Dupont F. (2004). Botanique. 13ème Edition Masson.Sprent, pp. 164.
- 43- Gusmao-Lima, A.I., Figueira, E., de Almeida, M.P., Pereira. S.I.A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in rhizobium leguminosarum I bv. Viciae: Glutathione as a detoxifying agent. Can. J. Microbiol. 51,7-14.
- 44- Hirsch AM., 1992. -Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122: P 213–215
- 45- Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de Boeck.(Hopkins, 2003).
- 46- <https://fr-academic.com/dic.nsf/frwiki/1073876> ,le genre lotus,17juin,2022.(Anonym2)
- 47- Iskounen T. 2012. Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses Calycotomespinosa. Mémoire d'Ingénieur, Génie Biologique. Université de Bejaia, p. 16, 17
- 48- Jean-Michel Lecerf, 2016, Le génie des légumineuses, Article scientifique, page 2
- 49- Jean-Michel Lecerf, Le génie des légumineuses, Article de scientifique, 2016, en ligne, page

Référence Bibliographique

- 50- Jordan, D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. p. 234-244. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1 The Williams & Wlkins Co. Baltimore.
- 51- K Tilak, N Ranganayaki, KK Pal, R De, AK Saxena... - Current science, 2005 – JSTOR
- 52- Kaliche Fatima et Zohra DJEMOUI Fatma, Expression phytochimique des plantes (cas Fabaceae) face aux stress écologiques, Projet de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de Licence, 2014, page 2.
- 53- Koomen, I, Mc grath, S.P., Giller, K.E. (1990). Mycoorhizol infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past Sewage Sludye application. Soil.Biolo. &Biochem. 22,871-873.
- 54- Laranjo M. C. Branco., R. Soares., L. Alho., M.D.E. Carvalho., S. Oliveira., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations.
- 55- leguminosarumsymbiovarviciaeisolées du pois (*Pisumsativum*) et de la lentille (*Lensculinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'estalgérien. Th.doct en Sciences.Université Constantine 1.Algérie. p153
- 56- Lohar D. , Stiller J. , Kam J. , Stacey G. , and Gresshoff P.M. , 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus* .Ann .Bot .104 :P 277-283
- 57- Mahdhi, M., Nzoué, A., Gueye, F., Merabet, C., De Lajudie, P., & Mars, M. (2007). Phenotypic and genotypic diversity of *Genistasaharaemicrosymbionts* from the infra-arid region of Tunisia. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 604-609.
- 58- Malusá, E., &Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied microbiology and biotechnology*, (malusa, 2014).
- 59- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes. *Trends in Microbiology* 17 (10): 458-466.(Masson-Boivin, 2009)
- 60- MATIC R.(2005): Vetch in Australian Crop Rötations and Impact on Yield of Following Cereal Crops. Presented at Australian Legume Breeders, Perth, Australia Max.T., D. Enneking., 2006. Les vesces : vers une valorisation alimentaire
- 61- MORALE S. étude phytochimique et évaluation biologique de derris ferruginea benth, (Fabaceae) université d'Angers 2011 page 25-27
-

Référence Bibliographique

- 62- Munns D.N.,1977. Madigan M., Martink J. (2007). Brock Biologie des microorganismes. Edition : Person Education France. PP, 599-601. cidity and related factors. Bose (Ed). PP, 211- 236.
- 63- 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.
- 64- Murielle et Daniel, Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2004, p. 182.
- 65- Ndiaye A. A., 1996. Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'Acacia. Dakar, Diplôméd'EtudesApprofondies. UniversitéCheikh Anta Diop.(Ndiaye, 1996)
- 66- Noel., 2009. (Noel, 2009)
- 67- Olsen, A., Bloch, C., Brill, W. (1994). Developmental fate of Rhizobium meliloti(Olsen, 1994).
- 68- Patrícia P. Pinto., R. Raposeiras., A.M. Macedo., L. Seldin., E. Paiv., NadM .H .Sá., 1998. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating Rhizobium strains. Revista de Microbiologie. Print ISSN 0001.(patricia, 1998)
- 69- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., Borthakur D., (2006). Identification of two clusters of genes Involved in salt Tolerance in Sino rhizobium Sp. Strain BLB. Symbiosis. 41:47-51.
- 70- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. CRC Crit Rev in Plant Sci 34: 17-42.(Peix, 2015)
- 71- Pelmont J. , 1995. Bactéries et environnement : Adaptation physiologique . Office des Publications Universitaires 2 :P 541-572
- 72- Pelmont J., 1995. Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541 -572(Pelmont, 1995).
- 73- Pelmont J., 2005. Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.(plemont, 2005.)
- 74- Perry J.J. ,Stalex J.T. et Lory S. , 2004. Microbiologie cours et questions de revision .Edition Dunod . Paris , France .
-

Référence Bibliographique

- 75- Peters NK, Verma DPS. 1990. -Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3: 4-8
- 76- Pierre D., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. (Pierre, 1996)
- 77- Pierre, Armand. Roger., (1996). La fixation d'azote - conférence-débat de l'orsom (Pierre A.R., 1996).
- 78- Puckridge, D.W. and French, R.J. (1983) The Annual Legume Pasture in Cereal Ley-Farming Systems of Southern Australia: A Review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 9, 229-267.
- 79- Puckridge., French. The annual legumes pasture in cereal ley farming systems of Ramirez, P. and J.D. Kelly, 1998. Traits related to drought resistance in common bean Southern Australian: a review *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1983. 9: 229-269
- 80- Quézel et Santa, La flore d'Algérie, 1e Cours Supérieur d'Allergologie Pollens et pollinoses Alger le 27 et 28 Novembre 2015 Centre familial de Ben Aknoun, CNAS, 1962, page 3
- 81- Rae D., Giller K. E., Yea A. R., Flowers T.J., (2002). The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann.Bot.* 89 :563-570.
- 82- Riah N., 2014. -Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium*
- 83- Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome C., 1991b. -Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti* alfalfa symbiosis. *Journal of Biological Chemistry* 266 : P 10934-109.
- 84- Rochester, I. and M. Peoples. 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in cotton systems: Inputs of fixed N, N fertiliser savings and cotton productivity. *Irrigated Plant Soil* 271:251-253
- 85- Sadowsky M.J., (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE (Ed) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment* Springer. The Netherlands. PP, 89-112.
- 86- Sadowsky, M. J., Keyser, H.H., Ben Bohlool, B. (1983) Biochemical Characterization of fast and Slow Growing *Rhizobia* That Nodulate Soybeans. *Int J Syst Bac* (Sadowsky, 1983).
- 87- SAOUDI Mouna, Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N. LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*, Mémoire de Magister, 2008 page 25-27
-

Référence Bibliographique

- 88- Schneider, A., & Huyghe, C. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Editions Quae. ISBN : 741P .(Annie, 741P).
- 89- Schultze M., Kondorosi A., 1998. -Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. P 39- 40
- 90- Sebihi Fatima Zohra, Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*, Thèse pour l'obtention de Magister en Génétique et Amélioration des plantes, 2008, page (22-24)
- 91- Sebihi FZ. (2008). Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. 121p.
- 92- Selami N. 2017. Associations Symbiotiques. Polycopie Du Cours, Biotechnologies. Université d'Oran Mohamed Boudiaf, p 16.
- 93- SELAMI, Nawel, « Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* : Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale, Caractérisation Moléculaire des Isolats. » thèse de Doctorat, Biotechnologie Végétale, 2015, 2015, page 17 et 18
- 94- Smith, S. R., & Giller, K. E, Effective *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. *Soil Biology and Biochemistry* 24(8), 1992, page 781-788.
- 95- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology* (p. 365). Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.). United States Agency for International Development (USAID)
- 96- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology* (p. 365). Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.). United States Agency for International Development (USAID).
-

Référence Bibliographique

- 97- Somasegaran, P., Hoben, H. G. (1985) Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development (USAID).
- 98- Somasegaran, P., Hoben, H. J., & Gurgun, V. (1988). Effects of Inoculation Rate, Rhizobial Strain Competition, and Nitrogen Fixation in Chickpea. *Agronomy journal*, 80(1), 68-73.
- 99- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin(somasegaran, 1994).
- 100- Somasegaran.P., Hoben,H.J.,1985 .Methods in legumes-Rhizobium technology - Niftal,University of Hawaii(somasegaran.p, 1985).
- 101- Spaink HP., 2000. -Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *AnnualReview of Microbiology*. P 263- 265 .
- 102- Stajkovic, O., S.de meyer, B. Mili, A. willems and D. deli. (2009). Isolation and characterization of endophytic non rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *botanicaserbica* .33 :107-134.
- 103- Stephen.C, 2011. Biological Nitrogen Fixation.20 avril 2022 <https://www.nature.com> .(Anonyme 1)
- 104- Teillet A, (2008), Caractérisation de deux déterminants moléculaire impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuses modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat, univ de Toulouse, PP, 11
- 105- Tela Botanica,23 avril 2022 <https://www.tela-botanica.org> .(Anonyme,2022)
- 106- Terefework Z., 2002. -Diversity and Phylogeny of Rhizobium galegae, and reflections onmolecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION INMICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN:P 1239-1250.
- 107- Terefework Z., 2002. Diversity and Phylogeny of Rhizobium galegae, and reflections on molecular evolution of Rhizobium-legume symbiosis. Academic dissertation in microbiology. University of Helsinki. ISSN 1239-9469.(Terefe.Z, 2002)
- 108- Tiziri, 2012, Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses *Calycotome spinosa*, Mémoire de fin de cycle En vue d'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat, page 4 et 5.
- 109- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. ISBN(2003) (tortora.g, 2003).
-

Référence Bibliographique

- 110-** Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. IBP Handbook N°15, International Biological Programme , Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164 P
- 111-** Vincent, J. M.(1970) IBP Handbook N°15, International Biological Programme , Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164 P. (vincent, 1970).
- 112-** Werner D., 1992. Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.(Anon., s.d.)(Werner, 1992)
- 113-** Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant Soil 287: Observation macroscopique et microscopique des isolats.(Willems, 2006)
- 114-** Wojciechowski M.F., Lavin M. and Sanderson M.J. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family , 2004, American Journal of Botany,page 4
- 115-** Young, J. M., Haukka, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., et Sawada, H. (1996) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and there inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobiumundicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium*.(Young, 1996).
- 116-** Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and Nitrogen Fixation under severe conditions and in an Arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63.(4),968- 989
- 117-** Zahran, H.H, *Rhizobium* –legumes symbiosis and nitrogen fixation under serve conditions and arid climet. Microbiologie. Molecular. biology (zahran, 1999).
- 118-** Zakhia F., De Lajudie P., 2001. Taxonomy of rhizobia Agronomie. 21: 569 - 576.
- 119-** ZERIBI Rihana. Caractérisation biochimique et symbiotique des BNL isolés à partir de la plante *Genista saharae*, 2020, mémoire de master, page (5-7)
-



ANNEXES



Annexe : les milieux de cultures, colorants et réactif Composition théorique (en g/l d'eau distillée).

Milieux de culture et solutions utilisés :

1. Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol : 10.00

K₂HPO₄ : 0.50

MgSO₄·7H₂O : 0.20

NaCl : 0.10

Extrait de levure : 0.50

Eau distillée : 1000ml

PH : 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

2. Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB : 1000ml

Agar : 18

PH : 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

3. Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB: 1000ml

Solution stock de rouge Congo:10ml

Agar: 18

PH : 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

4. Composition de milieu YMA + Bleu de Bromothymol en g/l

YMB : 1000ml

Solution stock de bleu de bromothymol : 5ml

Agar : 15

PH : 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

5. Composition de milieu YMA + Carbonat de Calcium en g/l

YMB : 1000ml

CaCO₃ : 1

Agar : 18

PH : 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

➤ **Les solutions stocks colorants :**

- Solution stock de RC : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.

- Solution stock de BTB : 0.5g de BTB dissous dans 100ml d'éthanol.

Composition du réactif Benedict

Citrate de sodium 173g

Carbonate de sodium anhydre 100g CuSO₄,

5H₂O 17,3g

Eau distillée 1000ml

L'ajustement du pH a 6,8 se fait avec du NaOH 1N.
