

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA**

**FACULTE DES SCIENCES**  
**DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE**  
**LA NATURE ET DE LA VIE**

N° : .....



**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE**  
**LA VIE**  
**FILIERE : ECOLOGIE ET**  
**ENVIRONNEMENT**  
**OPTION : ECOLOGIE DES ZONES ARIDE ET**  
**SEMI ARIDE**

**Mémoire présenté pour l'obtention**  
**Du diplôme de Master Académique**

**Par :**

**REDAOUI Haroun**

**MEEKI Mohammed Amine**

**Intitule:**

**Effet de salinité et température sur des**  
**bactéries Nodulant une légumineuse à intérêt**  
**environnemental.**

**Soutenu devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup> BEN HISSEN Saliha</b>	<b>MCA</b>	<b>UMBM</b>	<b>Présidente.</b>
<b>M<sup>me</sup> AHNIA Hadjira</b>	<b>MCB</b>	<b>UMBM</b>	<b>Rapporteuse.</b>
<b>M<sup>me</sup> ARAB Radhia</b>	<b>MCA</b>	<b>UMBM</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire : 2023/2024**

# Remerciement

Nous tenons à exprimer nos profondes gratitude et nos sincères remerciements à chacun d'entre vous pour avoir consacré votre temps, votre expertise et votre attention à l'évaluation de notre mémoire de fin d'étude. Votre soutien et vos conseils ont été d'une importance capitale dans la réalisation de ce travail de recherche.

Nous tenons également à remercier chaleureusement notre directrice de mémoire, madame Ahnia Hadjira, pour son encadrement précieux, sa patience et sa disponibilité tout au long de ce processus. Ses conseils éclairés et sa passion pour la recherche ont été une source d'inspiration pour nous.

Nous souhaitons exprimer notre gratitude envers nos enseignants et professeurs, dont les connaissances approfondies et les cours enrichissants ont contribué à notre formation et à notre compréhension du sujet traité. Votre expertise et votre dévouement à l'égard de l'éducation ont été une source de motivation constante.

Nous tenons à remercier les amis et la famille pour leur soutien inconditionnel et leur encouragement tout au long de notre étude.

Leur amour, leur compréhension et leur patience ont été les piliers qui nous ont permis d'accomplir ce travail.

Enfin, nous aimerions exprimer notre reconnaissance envers toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Encore une fois, nous s'adressons nos remerciements aux parents et toute la famille pour leur soutien moral et la précieuse aide.

## **Dédicace**

Je dédie mon travail à mes parents, leur amour et patience méritaient ma reconnaissance.

A mes frères, ma sœur, et ceux qui ont partagé avec moi les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supportée et encouragée tout au long de mon parcours.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

*Haroun*

Avec tout honneur de fierté, je dédie ce modeste travail à :

-mes chères parents qui m'ont vraiment aidée par leur encouragement durant toute ma vie.

-mes chers frères.

-tous mes amis et collègues.

-toute la promotion de MASTER II 2023/2024.

*Mohammed Amine.*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

## Introduction

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

<b>I. Symbiose rhizobiums-légumineuses.....</b>	<b>2</b>
I.1. Légumineuses.....	2
1.2. Rhizobia.....	3
<b>II. Processus de la nodulation.....</b>	<b>3</b>
II.1. Pré-infection .....	3
II.2. Infection .....	4
II.3. Organogenèse.....	4
<b>III. Facteurs limitant la symbiose rhizobia-légumineuses.....</b>	<b>5</b>
III.1. Stress hydrique.....	5
III.2. Stress thermique.....	5
III.3. Stress salin et osmotique .....	6
III.4. Le stress ionique.....	6
III.5. Le stress nutritionnel.....	6

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>7</b>
<b>II.1. Caractérisation culturelle des souches.....</b>	<b>7</b>
II.2. Morphologie des bactéries.....	7
<b>II.3. Caractérisation physiologique.....</b>	<b>8</b>
II.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	8
II.3.2. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne.....	9
<b>II.4. Caractérisation biochimique.....</b>	<b>9</b>

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

<b>III.1. Caractérisation culturelle des souches.....</b>	<b>10</b>
<b>III.2. Morphologie des bactéries.....</b>	<b>10</b>
<b>III.3. Caractérisation physiologique.....</b>	<b>11</b>
III.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	11
III.3.2. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne.....	12
<b>III.4. Caractérisation biochimique.....</b>	<b>13</b>

**Conclusion et perspectives**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## Liste de figures

<b>Figure 1 :</b> Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais. -----	7
<b>Figure 2 :</b> Méthode utilisé pour Galerie AP20. -----	9
<b>Figure 3 :</b> Effet de la température sur la croissance des souches. -----	12
<b>Figure 4 :</b> Effet du NaCl sur la croissance des souches. -----	12

## Liste de photos

- Photo 1** : Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA. ----- 10
- Photo 2** : Observation microscopique de quelques colonies des souches étudiées à l'état frais. ----11
- Photo 3** : Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif. -----11
- Photo 4** : résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries. -----14

## Liste de Tableaux

**Tableaux 1** : caractères morphologiques des colonies.

**Tableaux 2** : caractères *biochimiques* de la souche S3.

**Tableaux I** : La moyenne des Do obtenue aux différentes températures.

**Tableaux II** : La moyenne des Do obtenue aux différentes NaCl.

**Tableaux III** : tableau d'étude API 20e de la souche 3.



# *Introduction*

### Introduction

Les légumineuses se distinguent comme l'une des familles les plus remarquables du règne végétal, regroupant une variété de plantes herbacées, d'arbustes, de lianes et d'arbres, souvent caractérisés par des nodosités témoignant de leur symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote.

Cette famille revêt une importance significative à la fois sur le plan économique et écologique. Sur le plan agricole, elle est essentielle, étant spontanément présente ou cultivée à travers le monde pour une multitude d'usages, notamment la production alimentaire, le fourrage et les engrais verts, ainsi que pour la préservation des sols contre l'érosion. Cette importance découle principalement de leur symbiose avec les bactéries du sol, connues sous le nom de rhizobia (Chen et *al.*, 1995).

Les bactéries telle que rhizobium, sont d'une importance considérable en agriculture et en forestières à cause de leur capacité d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols (Ndoy, 1999).

L'association symbiotique entre rhizobia et légumineuses à bénéfices réciproque fournit pour la bactérie, les ressources carbonées nécessaires à sa croissance, et pour la plante, la fixation d'azote atmosphérique essentielle à son développement (Pellerin, et *al.*, 2014).

En Algérie, plusieurs légumineuses de la *tribu des Genisteae* de différentes régions du pays ont fait l'objet de nombreuses études (Boulila et *al.* 2009 ; Ahnia 2014 ; Bourebaba et *al.*, 2016).

D'où l'objectif de ce travail est d'étudier la croissance des rhizobia isolés des légumineuses de zones arides à travers ces quelques tests phénotypiques : l'effet de différentes températures, de différentes teneurs en NaCl et étudier la caractérisation morphologique, biochimique et cellulaire.

Ce document est constitué de trois chapitres : une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les partenaires (rhizobia et légumineuses) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuses), chapitre matériel et méthodes. Le dernier chapitre comporte les résultats obtenus et leurs discussions.

# **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

## I. Symbiose rhizobium-légumineuses

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses résulte d'une interaction spécifique entre la plante et les bactéries du sol. Ce processus débute par une communication entre ces deux partenaires grâce à des signaux moléculaires (Perret et *al.*, 2000). La bactérie induit chez la légumineuse la formation d'un organe spécialisé sur les racines ou les tiges, appelé nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bacteroides intracellulaires capables de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniac (Gibson et *al.*, 2008). Cette relation symbiotique demeure le principal mécanisme biologique d'apport d'azote dans les écosystèmes de production agricole (Boddy et *al.*, 2000).

### I.1. Légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobia appartiennent toutes à la famille des *Fabacées* ou légumineuses, comptant environ 20 000 espèces réparties en 650 genres, ce qui la positionne en seconde place en termes de diversité après les *Poaceae*.

Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoïdées*. La sous-famille des *caesalpinioideae*, comprenant environ 150 genres, rassemblant principalement des arbres ou des arbustes retrouvés en région tropicale et subtropicale.

La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres.

Enfin, les *Papilionoïdées* représentent la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, mais comprenant aussi des arbres et des arbustes, présents en région tempérée et tropicale (Cheriat, 2016).

## I.2. Rhizobia

Ce sont des bactéries Gram-négative, strictement aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électrons d'une longueur de 1,2 à 3,0  $\mu\text{m}$  et une largeur de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$ , non sporulant. Contiennent souvent des granules de poly- $\beta$ -hydrox butyrate (PHB), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches (Cheriet, 2016).

Ces bactéries sont nodulatrices de légumineuses, appartenant aux  $\alpha$ -protéobactéries, qui enrichissent le sol en fixant le  $\text{N}_2$  atmosphérique et qui ont donc une grande importance écologique.

Tous les organismes de cet ordre ne sont pas des symbiotes ; certains sont des méthanotrophes, tandis que d'autres peuvent même être pathogènes. Leur utilisation en tant que bioinoculants en agriculture est suivie depuis des décennies. Ils permettent de réduire la dépendance aux engrais chimiques azotés et d'améliorer la productivité des légumineuses sur le terrain.

Selon Alexander et *al* (2017) en plus d'entraîner une nodulation et une fixation d'azote accru, l'inoculation rhizobienne déclenche la production de sidérophores, de phytohormones et de HCN. Il contribue également à la solubilisation du phosphate ainsi qu'à l'absorption de P et de N.

## II. Processus de nodulation

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des bactéries fixatrices d'azote. L'association symbiotique légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Elle est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Gage, 2004).

### II.1. Pré-infection

Les rhizobiums sont en général présents dans le sol et se multiplient dans la rhizosphère de la plante quand la graine germe. Très tôt ces rhizobiums pénètrent dans la racine de la plante grâce à un mécanisme encore mal connu, soit en traversant les poils absorbant soit en utilisant les blessures dans l'écorce présentes à la base des radicules. On peut alors distinguer au microscope un cordon d'infection qui circule entre les cellules de l'écorce, puis éclate en libérant les bactéries dans les cellules qui formeront l'ébauche du nodule. Les cellules de la plante hôte se multiplient

en entraînant des rhizobiums qui se multiplient également dans chacune des cellules filles. Finalement, la nodosité apparaît comme un organe comportant 5 éléments (FAO, 1992).

## II.2. Infection

Il existe une variabilité dans le type d'infection et dans la morphologie des nodules chez les légumineuses. Les rhizobia sont capables de pénétrer à l'intérieur des légumineuses via deux modes d'infection distincts. Par voie intracellulaire : dans ce cas, l'infection se produit par l'intermédiaire d'un cordon d'infection qui achemine les bactéries du chevelu racinaire vers le cortex et les distribue aux cellules, qui deviennent les cellules infectées du nodule fixateur d'azote. Ce mode est par exemple observé chez le pois, la luzerne ou encore le soja.

Le second mode d'infection est l'infection par voie intercellulaire ou « crack-entry ». Dans ce cas, l'infection se fait généralement au niveau des passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures occasionnées par des éléments extérieurs ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection. Il est communément accepté que les facteurs de nodulation sécrétés par les rhizobia soient capables d'initier la formation de nodules sur les plantes hôtes. Or, très récemment, Giraud et al. (2007) ont révisé cette théorie.

## II.3. Organogenèse

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex. Les nodules de type indéterminé sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des

divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée.

### **III. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums – légumineuses**

De nombreuses conditions environnementales sont considérées comme des facteurs limitants pour la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobium-légumineuse. Le processus de fixation de N<sub>2</sub> est étroitement lié à l'état physiologique de la plante hôte. Ainsi, il est peu probable qu'une souche rhizobienne concurrente et persistante exprime pleinement sa capacité de fixation de l'azote si certains facteurs, tels que la salinité, le pH, les carences nutritionnelles, la toxicité minérale, les températures, l'humidité excessive ou insuffisante du sol, la présence de métaux ou certains antibiotiques, limitent la vigueur de la légumineuse hôte.

#### **III.1. Stress hydrique**

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les réponses des plantes à cet effet seront par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires pour l'adaptation à ce stress. Il exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige. Le principal résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate à cause de dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture du stroma.

#### **III.2. Stress thermique**

Le stress thermique en écologie est une situation où les organismes sont confrontés à des températures qui dépassent leur plage de tolérance habituelle. Cette exposition peut avoir des conséquences néfastes sur leur santé, leur capacité de survie et leur aptitude à se reproduire. IPCC.(2014).

Ces températures extrêmes peuvent être provoquées par différentes conditions, telles que des vagues de chaleur, des températures anormalement élevées ou basses, des fluctuations rapides de température ou même des changements graduels mais persistants de température dans leur environnement Urban, M. C. (2015). Ces variations thermiques peuvent perturber l'équilibre délicat des écosystèmes, mettant en péril la diversité biologique et la stabilité des

populations. En résumé, le stress thermique représente une menace sérieuse pour la santé et la survie des organismes dans leur habitat naturel.

### **III.3. Stress salin et osmotique**

L'étude du stress salin et osmotique est essentielle en biologie et en écologie, car elle nous permet de comprendre comment les organismes vivants réagissent aux fluctuations de sel et de pression osmotique dans leur environnement. Ces stress peuvent sérieusement affecter la physiologie, le métabolisme et même la survie des organismes, qu'ils soient microscopiques comme les micro-organismes unicellulaires ou plus complexes comme les plantes et les animaux Munns, *et al.*, (2008).

### **III.4. Le stress ionique**

Le stress ionique est un phénomène biologique essentiel qui fait l'objet d'études approfondies en biologie et en écologie. Il permet de comprendre comment les organismes vivants réagissent aux variations de concentration des ions présents dans leur environnement, tels que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ), le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et le chlorure ( $\text{Cl}^-$ ). Ce stress peut avoir des conséquences graves sur la physiologie, le métabolisme et la survie des organismes, qu'ils soient des micro-organismes unicellulaires, des plantes ou des animaux Colzi, *et al.* (2019).

### **III.5. Le stress nutritionnel**

Un excès de sel peut nuire à la capacité des plantes à absorber et à utiliser efficacement d'autres nutriments essentiels, affectant ainsi leur équilibre nutritionnel Levigner, *et al.* (1995).

## *Chapitre II : Matériel et Méthodes*

## I. Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé 03 souches bactériennes isolées des nodules racinaires d'une légumineuse de la tribu des *Genisteae*. L'identification par l'analyse géotypique, confirme leur appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Ces souches font partie de d'une collection de souches de rhizobia du laboratoire de recherche « Ecologie Microbienne » de l'Université de Bejaia. En outre la souche de référence *Bradyrhizobium algeriense* RST89 a été prise à titre comparatif.

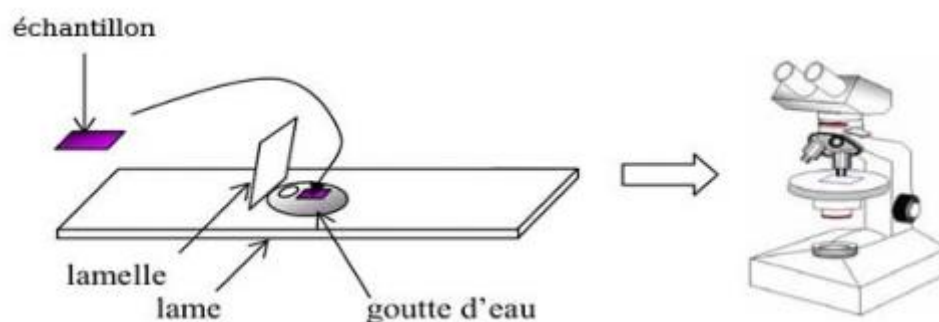
## II. Méthodes

### II.1. Caractérisation culturelle des souches

Les souches étudiées sont cultivées sur boîtes de Pétri contenant le milieu de culture solide YMA (Annexe I). Après incubation à 28°C pendant 10 jours, nous avons étudié la couleur, la forme, l'aspect et la production d'exopolysaccharides de ces souches.

### II.2. Morphologie des bactéries

L'examen à l'état frais des suspensions bactériennes permet de mettre en évidence, la forme ainsi que la mobilité des souches étudiées. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I) contenant les bactéries jeunes, nous avons pris une suspension bactérienne et déposée sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10 × 40 (figure 1).



**Figure 1** : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.

## **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux groupes distincts ; Gram + et Gram -, par leur affinité pour les colorants. À Cet effet nous avons appliqué ce test sur les souches étudiées en suivant la technique classique qui consiste à :

- La préparation est recouverte par la Fuchsine, laissé agir durant 1 min. Après un nouveau
- Lavage à l'eau, on égoutte la lame sur du papier absorbant puis on observe à l'huile Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet d'identifier les bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Tortora et al., 2003). Le protocole suivi est ci-dessous :
- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant
- Basique le violet de Gentiane, laissé agir pendant 1min.
- Le violet est éliminé avec le Lugol et laissé agir pendant 30 secondes.
- Après un lavage à l'alcool-acétone, le surplus de la solution décolorante est chassé par une immersion.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer au microscope (Gx100).

## **II.3. Caractérisation physiologique**

Afin d'étudier la croissance de ces souches isolées, nous avons procédé à une série de tests physiologiques tels que la température, et la tolérance au NaCl. Après incubation, la croissance des souches est estimée par l'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda = 620\text{nm}$ . Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

### **II.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne**

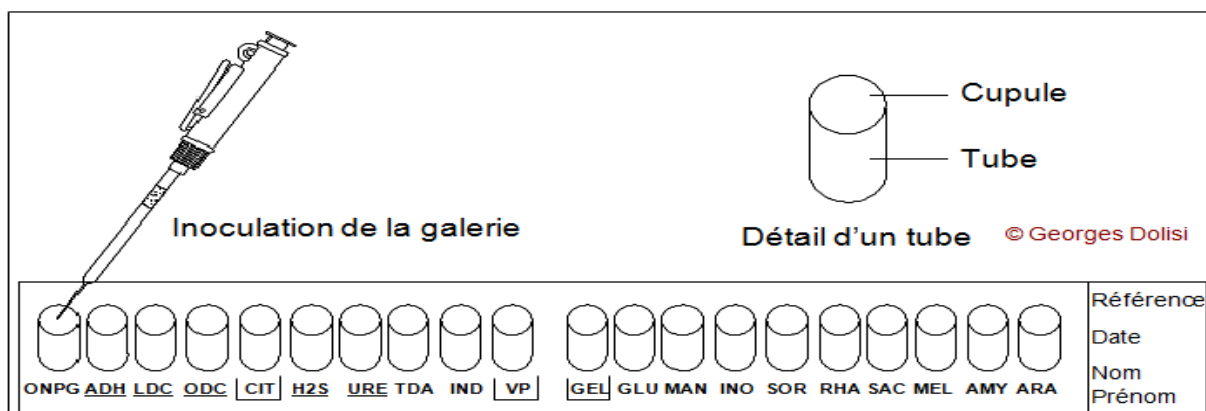
La croissance des souches bactériennes à différentes températures a fait l'objet d'une étude sur milieu YMB à raison de 3 répétitions par souche. Les cultures sont incubées à différentes températures : 26°C, 28°C, 30°C, 32°C ,34°C et 37°C. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 620\text{ nm}$  pendant 10 jours.

### II.3.2. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

L'étude de la croissance des souches en présence de NaCl a été effectuée sur milieu YMB à différentes concentrations : 100mM, 200mM, 300mM, 400mM et 500mM La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 620 nm pendant 10 jours.

### II.4. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Pour caractériser les souches étudiées, nous avons utilisé un test de galerie Api 20 NE, un système standardisé pour identifier les bacilles à Gram négatif qui ne sont pas des entérobactéries. Ce test consiste en 20 micro-tubes contenant des substances déshydratées (figure2).



**Figure 2 :** Méthode utilisé pour Galerie AP20.

L'utilisation de la galerie nécessite une répartition de l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour reconstituer les milieux. Ensuite, remplir les cupules de la galerie par une suspension bactérienne ( $10^7$  bactéries) à l'aide d'une micropipette en évitant les bulles d'air.

Pour les trois tests (GLU, ADH, URE), on ajoute de l'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. On attend ensuite six jours pour que les bactéries se développent. Les réactions ne se produisent que si les bactéries peuvent utiliser le substrat correspondant.

Les galeries inoculées sont incubées à 28°C. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (voir Annexe II tableau III). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

## *Chapitre III : Résultats et discussion*

### III.1. Caractérisation culturelle des souches

Les isolats étudiés forment sur milieu YMA à 28°C, des colonies qui ont une forme ronde, avec des contours réguliers et des diamètres allant de 1 à 2 mm. Elles sont de couleur beige ou blanche, opaque ou translucide (voir le tableau 1). La souche S1 et S2 présentent des Exopolysaccharides (Photo 1). La souche S3 ne possède pas des EPS.



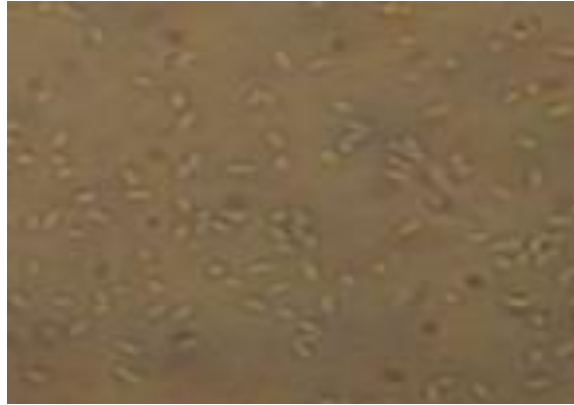
**Photo 1** : Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA.(photo personnelle 2024)

**Tableau 1** : caractères morphologiques des colonies

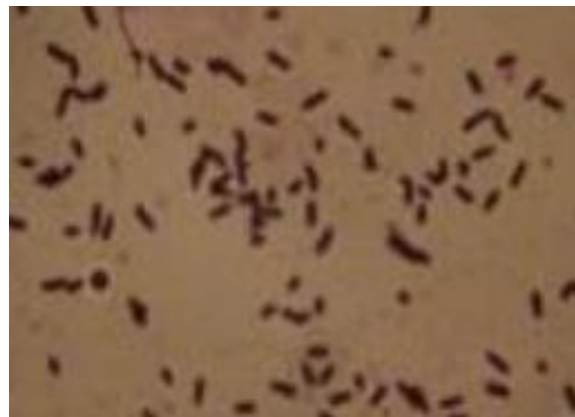
Les souches	EPS	Couleur	Transparence
S1	Présence	Beige	Opaque
S2	Présence	Blanche	Translucide
S3	Absence	Blanche	Translucide

### III.2. Morphologie des bactéries

L'observation microscopique à l'état frais d'une suspension bactérienne âgée de 10 jours, montre des cellules qui ont la forme de bâtonnets à extrémités arrondies et mobiles (Photo 2). Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly  $\beta$ -hydroxybutyrates (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram réalisée a montré leur appartenances aux bactéries Gram négatif (Photo 3).



**Photo 2 :** Observation microscopique de quelques colonies des souches étudiées à l'état frais. (photo personnelle 2024)



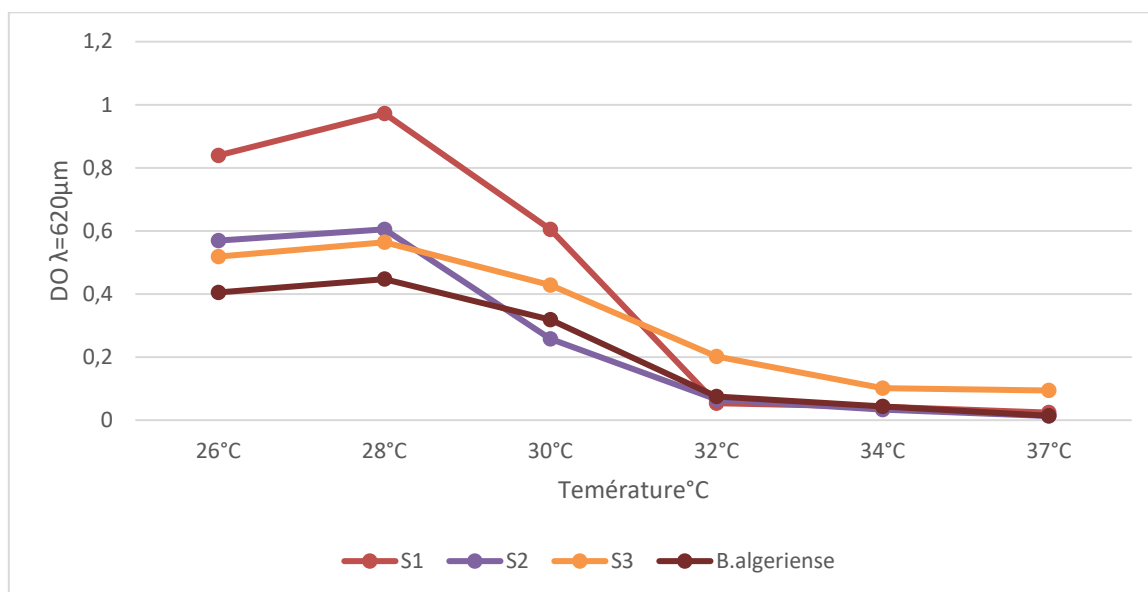
**Photo 3 :** Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif. (photo personnelle 2024)

### III.3. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température et du NaCl sur la croissance des rhizobia isolées de nodules racinaire d'une *Genisteae*. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes.

#### III.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne

Les résultats obtenus des tests de température montrent que toutes les souches y compris la souche de référence ont une bonne croissance entre 26 à 30°C avec un optimum à 28°C. La souche S3 présente une croissance à 32°C, 34°C et à 37°C. Aucune croissance n'a été remarquée à partir de 32°C pour le reste des souches (Figure 3).

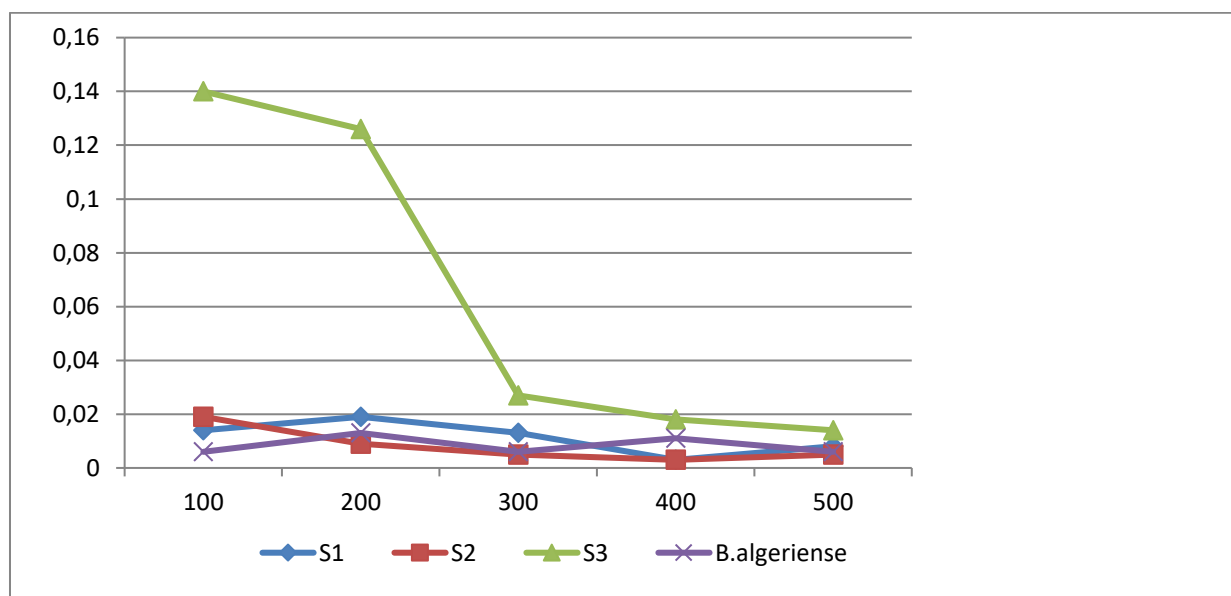


**Figure 3 :** Effet de la température sur la croissance des souches.

Le caractère mésophile des rhizobia a été déjà signalé par Graham (1992) et Zahran (1999) indiquant que la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobia se situe entre 28° à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

### III.3.2. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne

Toutes les souches semblent affectées en présence de NaCl à l'exception de la souche S3 qui présente une croissance à 100 et à 200mM. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 4.



**Figure 4 :** Effet du NaCl sur la croissance des souches.

La plupart des rhizobia sont inhibés par des concentrations de 100 mmol NaCl (Singleton et *al.*, 1982). Différentes souches de *Bradyrhizobium* sont complètement inhibées entre 100 et 500 mmol NaCl.

Miller et Wood (1996) ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais elles peuvent tolérer des concentrations élevées. Cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin.

#### III.4. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Après ensemencement et incubation des galeries API 20 NE à 28°C pendant 6 jours, les résultats obtenus de cette caractérisation biochimique sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 2** : caractères biochimiques de la souche S3

Souche	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

**1. ONPG (activité  $\beta$ -galactosidase) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas hydrolyser l'ONPG pour produire une couleur jaune.

**2. ADH (dihydrolase d'arginine) :** Positif, indique que la bactérie peut convertir l'arginine en ornithine et en ammoniacque.

**3. LDC (décarboxylase de lysine) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas décarboxyler la lysine.

**4. ODC (décarboxylase d'ornithine) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas décarboxyler l'ornithine.

**5. CIT (utilisation de citrate) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas utiliser le citrate comme source unique de carbone.

**6. H<sub>2</sub>S (production de sulfure d'hydrogène) :** Négatif, indique que la bactérie ne produit pas de sulfure d'hydrogène.

**7. URE (activité uréase) :** Positif, indique que la bactérie peut hydrolyser l'urée pour produire de l'ammoniac et du CO voir la photo 4.



**Photo 4 :** résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries. (photo personnelle 2024)

**8. TDA (déaminase de tryptophane) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas désaminer le tryptophane.

**9. IND (production d'indole) :** Négatif, indique que la bactérie ne produit pas d'indole à partir du tryptophane.

**10. VP (test de Voges-Proskauer) :** Négatif, indique que la bactérie ne produit pas d'acétoïne à partir de la fermentation du glucose.

**11. GEL (activité gélatinase) :** Positif, indique que la bactérie peut hydrolyser la gélatine.

**12. GLU (fermentation du glucose) :** Négatif, indique que la bactérie ne peut pas fermenter le glucose.

**13. MAN (fermentation du mannitol) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter le mannitol.

- 14. INO (fermentation de l'inositol) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter l'inositol.
- 15. SOR (fermentation du sorbitol) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter le sorbitol.
- 16. RHA (fermentation du rhamnose) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter le rhamnose.
- 17. SAC (fermentation du saccharose) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter le saccharose.
- 18. MEL (fermentation de la mélibiose) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter la mélibiose.
- 19. AMY (fermentation de l'amygdaline) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter l'amygdaline.
- 20. ARA (fermentation de l'arabinose) :** Positif, indique que la bactérie peut fermenter l'arabinose.



*Conclusion et perspectives*

### Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons réalisé une caractérisation phénotypique de 03 souches isolées à partir de nodules racinaires d'une *Genisteae* en présence d'une souche de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium* prises à titre de comparaison.

L'étude de la caractérisation culturelle et cellulaire montrent que les souches isolées sont des petits bâtonnets, mobiles et à Gram négatif, elles présentent des colonies de couleur blanche ou beige, opaque ou translucide avec présence ou absence des exopolysaccharides.

Ces souches ont une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum à 28°C à l'exception de la souche S3 qui présente une croissance à 32°C, 34°C, 37°C, aussi à 100 et 200mM. Cependant aucune tolérance en présence de NaCl pour les autres souches.

La caractérisation biochimique montre une diversité parmi ces souches. La souche S3 présente une activité uréase, fermente le saccharose et l'arabinose. Cependant cette même souche ne fermente pas le glucose et pas de production d'indole.

En perspective, il serait nécessaire d'élargir le spectre d'étude des souches de rhizobia isolées de légumineuses sur d'autres régions arides et semi arides non étudiées dans le but de contribuer à l'étude des bactéries endosymbiotiques pour une éventuelle utilisation dans les projets de bioremédiation.

## **Références bibliographiques**

## Références

- Benhizia Y, Goudjil H, Benguedouar A, Rosella M, Giacomini A, Squartini A. (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol.*27:462-468.
- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benellaoua S, Laguerre G (2009)** *Retama* Species growing in different ecological-climatic areas of northeastern. Algeria have an arrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol* 32 : 245-255.
- CHERIET D. (2016).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister.
- Chen, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., et Li, Y. (1995)** Characteristics of rhizobium *tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acide saline environment in X ingjiang. Poep'l's Republic of china *Int. J. Syst.Bacterio.*, 45: 153-159.
- DEKAK A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Mémoire de Magister. Université de Tébessa. Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie
- FAO. 1992.fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote.
- Gage DJ. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68: 280– 300
- Ndoye, I., (1999).** Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *Acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France). PP,1
- 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.
- Pellerin S., Bulter F., Guiard-Van L.G., (2014).** Fertilisation et environnement. Quelles pistes pour l'aide à la décision. Ed. Quae et Acta. France. 194p.
- 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.
- Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005). *Ecologie*. Ed. De Boeck. Paris. 214p

**SAOUDI M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L) : Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Mentouri University of Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie

**SKERMAN P.J. (1982).** Les légumineuses fourragères tropicales. 666 pages.

**TORCHE A. (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine. Faculté des Sciences de la nature et de la vie.

### Sites web:

<https://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Cytisus>

<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75466-description>



**Annexes**

## Annexe I

Composition des milieux de cultures (pour 1 litre) (Vincent, 1970).

### Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol .....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Agar .....	15g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

### Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol .....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillé .....	1l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

## Annexe II

### Les moyennes des différents tests effectués


**Tableaux I :** La moyenne des Do obtenue aux différentes températures


Souches	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
S1	0,839	0,972	0,605	0,054	0,043	0,024
S2	0,569	0,605	0,258	0,066	0,033	0,013
S3	0,519	0,564	0,428	0,202	0,101	0,094
<i>B.algeriense</i>	0,405	0,447	0,319	0,075	0,044	0,014

**Tableau II :** La moyenne des Do obtenue aux différentes NaCl

Souches	100	200	300	400	500
S1	0,014	0,019	0,013	0,003	0,008
S2	0,019	0,009	0,005	0,003	0,005
S3	0,140	0,126	0,027	0,018	0,014
<i>B.algeriense</i>	0,06	0,013	0,006	0,011	0,06

**Tableau III :** tableau d'étude API 20e de la souche 3




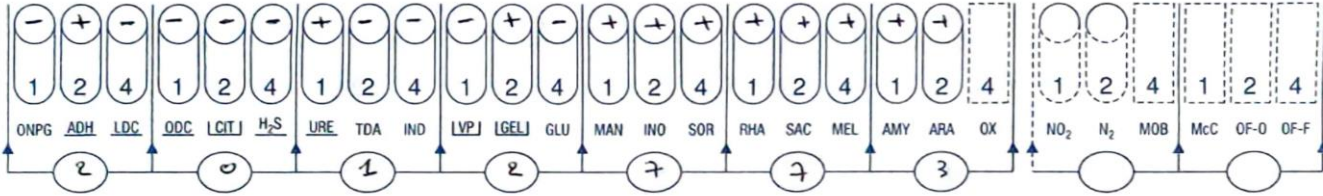


07223 C

REF. : 2024 / 03 / 13

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :





Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

2012773

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

## Résumé

Trois souches bactériennes ont été isolées des légumineuses des zones arides ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers une étude morphologique, biochimique et physiologique en présence de la souche de référence *Bradyrhizobium algeriense* RST89 à titre comparatif. L'étude culturale et cellulaire ont montré que les souches isolées sont des petites bâtonnets à Gram négatif et présentent des colonies beige opaque ou blanches translucides. Elles ont une bonne croissance entre 26°C et 30°C, avec un optimum à 28°C. Ces souches ne tolèrent pas la présence de NaCl, à l'exception de la souche S3 qui semble ne pas être affectée à 32°C, 34°C et 37°C et qui tolère ces deux concentrations 100 et 200 mM. La caractérisation biochimique montre une diversité de ces souches étudiées.

**Mots-clés :** Zones arides, caractérisation phénotypique, croissance, diversité

## Abstract

Three bacterial strains isolated from legumes in arid zones were subjected to phenotypic characterization through morphological, biochemical, and physiological studies in the presence of the reference strain *Bradyrhizobium algeriense* RST89 for comparison. Cultural and cellular studies showed that the isolated strains are small Gram-negative rods and exhibit opaque beige or translucent white colonies. They have good growth between 26°C and 30°C, with an optimum at 28°C. These strains do not tolerate the presence of NaCl, except for strain S3, which seems unaffected at 32°C, 34°C, and 37°C and tolerates both concentrations of 100 and 200 mM. Biochemical characterization shows the diversity of these studied strains.

Keywords: Arid zones, phenotypic characterization, growth, diversity

## الملخص

تم عزل ثلاث سلالات بكتيرية من البقوليات في المناطق الجافة وخضعت لوصف ظاهري من خلال دراسة مورفولوجية، بيوكيميائية وفسيلولوجية بالمقارنة مع السلالة المرجعية *Bradyrhizobium algeriense* RST89. أظهرت الدراسة الثقافية والخلاوية أن السلالات المعزولة هي عصيات صغيرة سلبية الغرام وتعرض مستعمرات غير شفافة بلون البيج أو شفافة بلون أبيض. لديها نمو جيد بين 26 درجة مئوية و 30 درجة مئوية، مع ذروة عند 28 درجة مئوية. هذه السلالات لا

تتحمل وجود NaCl، باستثناء السلالة S3 التي تبدو غير متأثرة عند 32 درجة مئوية، 34 درجة مئوية و 37 درجة مئوية والتي تتحمل هذين التركيزين 100 و 200 ملم. الوصف البيوكيميائي يظهر تنوع هذه السلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: مناطق جافة، وصف ظاهري، نمو، تنوع