

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE
LA NATURE ET DE LA VIE

N° :.....



DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : ECOLOGIE ET
ENVIRONNMENT

OPTION : ECOLOGIE DES MILIEUX
NATURELS

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par:

ZERROUKI HANADI

ZAHIR KHAOULA

Intitulé

**Isolement et caractérisation des isolats
bactériens nodulant une légumineuse à intérêt
environnemental " *Calicotome spinosa* "**

Soutenu devant le jury composé de:

| | | | |
|-----------------------------------|-----|----------------------|-------------|
| M ^{me} BEN HISSEN Saliha | MCA | Université de M'Sila | Présidente |
| M ^{me} AHNIA Hadjira | MCB | Université de M'Sila | Rapporteuse |
| Mr AILAM Oussama | MCA | Université de M'Sila | Examineur |

Année universitaire : 2024 /2025

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre sincère gratitude au Dr. AHNIA Hadjira pour avoir supervisé ce travail et pour ses encouragements tout au long du processus de recherche. Nous vous remercions de votre compréhension et de votre confiance. Nous exprimons également notre sincère gratitude au Dr. BEN HISSEN Saliha pour avoir accepté de présider le comité de discussion.

Nous remercions le Dr. AILAM OUSSAMA pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier l'ingénieur du laboratoire Imad Eddine Ghamidh, pour son aide.

Nous exprimons nos sincères remerciements aux ingénieurs Zahra Briki, Ilham Naoui Mahdi et Boukharouba Amal, pour leur aide et leur encouragement lors de notre formation pratique au laboratoire.

Nous remercions tous les professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de nos études à l'Université Mohamed Boudiaf - M'Sila.

DÉDICACE



Un moment que j'ai toujours attendu et rêvé dans une histoire dont les chapitres se terminent avec succès. Nous sommes fiers de notre lutte pour réaliser nos rêves.

À celui qui m'a appris à donner sans rien attendre, à celui dont je porte le nom avec fierté, à celui que Dieu a doté de dignité et d'honneur, mon cher père.

À ma bien-aimée, la lumière de mes yeux et le pouls de mon cœur, dont les prières sincères sont le secret de mon succès, ma chère mère.

À mes frères, mon soutien dans la vie.

*À toute ma famille et à mes amis sans exception. À mon partenaire de vie,
mon mari . pour m'avoir soutenu à chaque étape du chemin.*

Je leur dédie ce travail. Je demande à Dieu de nous accorder, à vous et à moi, le succès dans nos actions bienveillantes.

HANADI

DÉDICACE



Tout au début, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir
donné du courage et

de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :
À celui que Dieu a couronné de majesté et de dignité... à celui qui m'a
appris à donner sans rien attendre... à celui dont je porte le nom avec
fierté...

Mon cher père, puisses-tu vivre pour toujours
À mon ange dans la vie.. Au sens de l'amour, au sens de la tendresse
et de la dévotion.. Au sourire de la vie et au secret de l'existence.. À
celui dont les prières étaient le secret de mon succès et dont la
tendresse était le baume pour mes blessures....

Ma chère mère

À celui qui a été mon soutien et mon compagnon... à celui qui a
partagé mon chemin avec amour et patience... à celui qui a toujours
été la lumière de mes journées...

Ma chère sœur : Meriem

À toute ma famille et à mes amis qui ont toujours été là pour
m'apporter leurs conseils et leur aide.

À l'âme de mon cher grand-père.. Que Dieu ait pitié de vous.. et fasse
de cet accomplissement la balance de vos bonnes actions

Merci à tous..

KHAOLA

Liste des abréviations et acronymes

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses

BCP: pourpre de bromocrésol

GPA: Glucose Peptone Agar

Nif: nitrogène fixation = gène de fixation d'azote

TY: Tryptone Yeast

pH : Potentiel d'hydrogène

NaCl : Chlorure de sodium

C₃ H₈ O₃ : Glycérol (Nom scientifique du propane triol).

(BTB) : Bleu de Bromothymol

NO₃ : Nitrate

C₁₂H₂₂O₁₁ : lactose,

C₁₂H₂₂O₁₁ : saccharose

C₆H₁₂O₆ : glucose,

H₂S : gaz de sulfure d'hydrogène

CH₄N₂O : l'urée

Liste des Tableaux

| N° | TITRE | PAGE |
|----|---|------|
| 1 | Caractères Morphologie des colonies | 17 |
| 2 | Résultats des souches au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S. | 20 |

Liste des figures

| N° | TITRE | PAGE |
|----|---|------|
| 1 | Cycle de l'azote(Bourbonnais, 2010). | 2 |
| 2 | <i>Calicotome spinosa</i> (know your weeds.com) | 6 |
| 3 | Normes mondiales pour la comparaison de pH du sol | 11 |
| 4 | Fixateurs symbiotiques | 12 |
| 5 | Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais. | 13 |
| 6 | Les étapes de la coloration de Gram | 14 |
| 7 | Les nodules de <i>Calicotome spinosa</i> (photo personnelle) | 16 |
| 8 | Aspect des colonnes bactériennes étudiées sur milieu YMA (photo personnelle) | 17 |
| 9 | Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais (photo personnelle) | 18 |
| 10 | Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (photo personnelle) | 18 |
| 11 | Résultats de réaction des souches S12 et S14 en milieu YMA+BTB (photo personnelle) | 19 |
| 12 | La réaction négative des souches (exemple S14) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S (photo personnelle) | 19 |

SOMMAIRE

| | |
|--------------------------|----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
|--------------------------|----------|

Chapitre I : synthèse Bibliographique

| | |
|--|----|
| I .1.Cycle de l'azote..... | 02 |
| I 1.1.La nitrification..... | 03 |
| I .1.2La dénitrification..... | 03 |
| I .2.Fixation de l'azote..... | 04 |
| I .2.1Fixation industrielle de l'azote | 04 |
| I .2.2 Fixation biologique de l'azote..... | 04 |
| I .2.2.1 Fixateurs symbiotiques | 05 |
| I .2.2.2Fixateurs libres..... | 06 |
| I .3. Les légumineuses..... | 06 |
| I .3.1. Classification des légumineuses | 06 |
| I .3.2. Intérêt des légumineuses. | 07 |
| I .4. Les rhizobiums..... | 08 |
| I .5. Symbiose rhizobium légumineuse..... | 09 |
| I .5.1. Processus de la nodulation..... | 09 |
| I .5.2. Les substa responsables de la nodulation | 10 |

Chapitre II : Matériel et Méthodes

| | |
|-----------------------|----|
| II .1. Matériel | 11 |
| II .2. Méthodes..... | 11 |

| | |
|---|----|
| II .2.1. Analyse pédologique..... | 11 |
| II .2.2. Collecte des nodules..... | 12 |
| II .2.3. Stérilisation des nodules..... | 12 |
| II .2.4. Isolement des bactéries à partir des nodules | 12 |
| II .2.5. Caractéristiques morphologiques des colonies | 13 |
| II .2.6. Caractéristiques cellulaires des isolats | 13 |
| II .2.7. Test de Bleu de Bromothymol (BBT)..... | 14 |
| II .2.8. Fermentation du lactose..... | 15 |
| II .2.9.Hydrolyse de l'urée..... | 15 |
| II .2.10. Réduction des nitrates..... | 16 |

Chapitre III : Résultats et discussions

| | |
|--|----|
| III .1.Analyse pédologique | 16 |
| III .2.Isolement et purification des bactéries nodulant <i>Calicotome spinosa</i> | 16 |
| III .3.Caractérisation morphologique des colonies des isolats | 17 |
| III.4. Caractéristiques cellulaire des isolats | 18 |
| III.5. Test du Bleu de Bromothymol (BBT) | 19 |
| III .6.Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ | 19 |
| III .7.Hydrolyse de l'urée | 20 |
| III .8.Réduction des nitrates..... | 20 |
| Conclusion | 22 |
| Références bibliographiques | 24 |

Annexes.....27

Résumé et Abstract.....29



INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nombreux travaux ont démontré le pouvoir des légumineuses dans la restauration, la revégétalisation des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres grâce à l'association symbiotique qu'elles développent avec les rhizobia (Zahran ,2009) et qui fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote assimilable équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais (Dreyfus, 1982).

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique de l'azote moléculaire du globe, les plus connues sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses (BELLIR D ; ZIADA M 2014) .

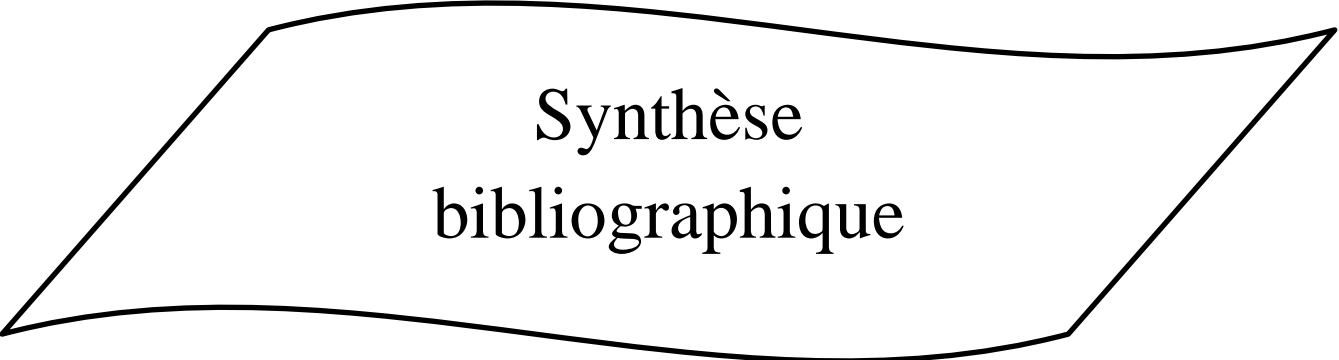
Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines et parfois sur les tiges des légumineuses la formation des organes particuliers appelés nodules. Une spécificité d'hôte, plus ou moins étroite, fondée sur un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. (BELLIR D ; ZIADA M 2014).

Des composés phénoliques émis au niveau des racines de la plante entraînent l'activation de gènes de nodulation bactériens et la synthèse de facteurs de nodulation responsables de la formation de nodules (BELLIR D ; ZIADA M 2014).

Au sein des nodules, la bactérie différenciée en bactéroïde transforme l'azote de l'air en une forme directement assimilable par la plante. En échange, la plante fournit à la bactérie les substrats carbonés issus de la photosynthèse (BELLIR D ; ZIADA M 2014).

Ce travail consiste principalement à caractériser des bactéries nodulant de plante *Calicotome spinosa*. Dans un premier temps nous avons isoler et purifier des souches bactériennes a partir de nodules racinaires de notre plante modele ensuite nous avons vous procédé à l'étude de leurs caractéristiques morphologiques, cellulaires et biochimiques.

Cette identification et sélection de rhizobiums isolés de légumineuses de la tribu de *Genisteae* (*Calicotome*, *Spartium*, *Retama*, *Cytisus*,...) contribue dans les projet de revégétalisation et la restauration des sols pauvres et ou dégradés.



Synthèse
bibliographique

I.1. Cycle de l'azote

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% de N_2 . L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques. Que l'on pense, par exemple, aux acides aminés des protéines (chaque acide aminé contient un groupement NH_2) (Bourbonnais, 2010).

Par contre, les plantes ne peuvent pas utiliser l'azote atmosphérique. L'azote 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 (Bourbonnais, 2010).

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des décomposeurs (des bactéries du sol). Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée, Et le cycle recommence (Bourbonnais, 2010).

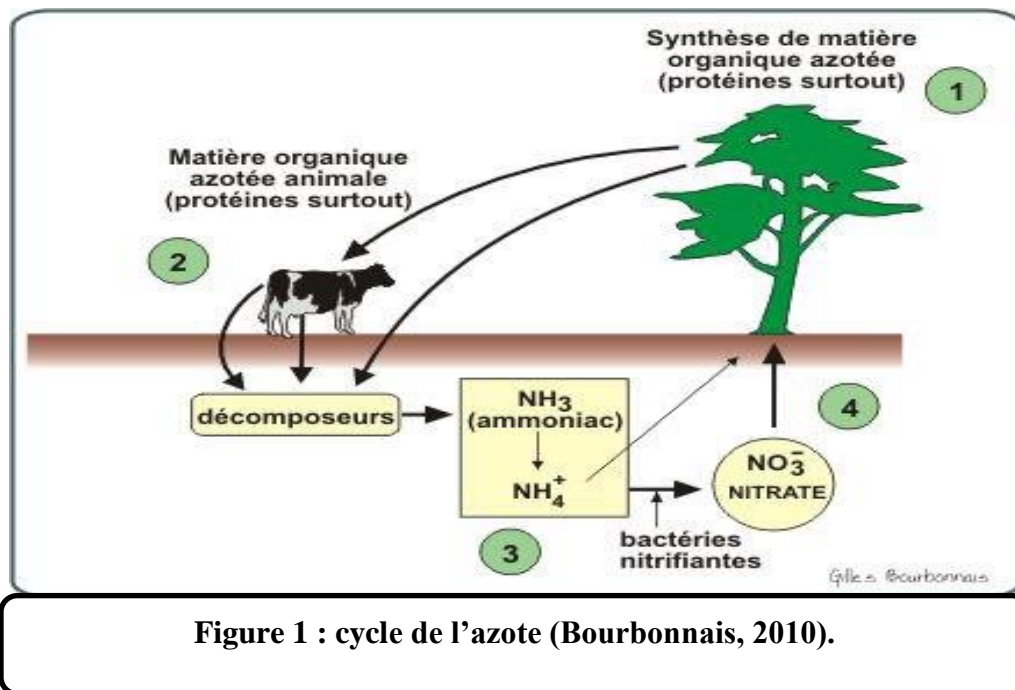


Figure 1 : cycle de l'azote (Bourbonnais, 2010).

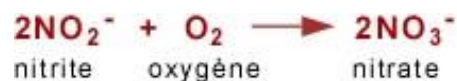
Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions NO_3^- puisés dans le sol.

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.

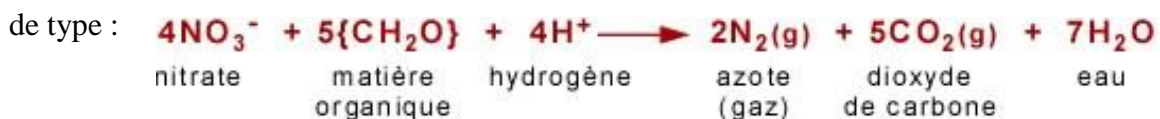
Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+ . D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le NH_4^+ en nitrate (NO_3^-) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH_4^+ qui se forme directement à partir d'ammoniac. (Bourbonnais, 2010).

Deux processus de base sont impliqués dans le recyclage de l'azote, la nitrification et la dénitrification :

I.1.1. Nitrification : Transforme les produits de la fixation (NH_4^+ , NH_3) en NO_x (soient NO_2^- et NO_3^-), des nitrites et nitrates (Hopkin, 2003). C'est une réaction d'oxydation qui se fait par catalyse enzymatique reliée à des bactéries dans les sols et dans l'eau. La réaction en chaîne est de type:



I.1.2. Dénitrification : Retourne l'azote à l'atmosphère sous sa forme moléculaire N_2 , avec comme produit secondaire du CO_2 et de l'oxyde d'azote N_2O , un gaz à effet de serre qui contribue à détruire la couche d'ozone dans la stratosphère (Pujic 2009). Il s'agit d'une réaction de réduction de NO_3^- par l'intermédiaire de bactéries transformant la matière organique. La réaction est



I .2. Fixation de l'azote

La fixation de l'azote est une diazotrophie qui qualifie la transformation biologique de l'azote en ammoniac, généralement par un fixateur biologique de l'azote, un diazotrophe. La fixation de l'azote désigne la combinaison d'azote moléculaire ou de diazote avec de l'oxygène ou de l'hydrogène pour donner des oxydes ou de l'ammonium pouvant être incorporés dans la biosphère.

I .2.1. Fixation industrielle de l'azote

Pour briser la triple liaison du diazote et le convertir en ammoniac, l'industrie utilise le procédé Haber-Bosch, ce qui nécessite une pression de 450 à 500 bars et il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par ce processus.

Environ 10 à 40 millions de tonnes d'ammoniac sont fabriquées chaque année par ce procédé. C'est environ 1/5 de ce que produisent les bactéries fixatrices d'azote sur toute la planète. L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates tels que nitrate de sodium (NaNO_3) ou nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). La moitié de l'engrais azote utilisé en agriculture est absorbé par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé (Péret, 2007). Il existe deux processus naturels différents permettant la transformation de l'azote gazeux (N_2) en azote assimilable par les plantes (Hopkins, 2003) (Tourene malika2018).

I .2.2. Fixation biologique de l'azote

Toutes les plantes, ont besoin de quantités relativement importantes d'azote (N) pour leur croissance et leur développement. La fixation biologique de l'azote (FBA) désigne un processus par lequel l'azote gazeux (N_2) présent dans l'atmosphère est incorporé dans les tissus de certaines plantes. Seul un groupe restreint de plantes est capable d'obtenir de l'azote de cette manière, grâce aux micro-organismes du sol.(Zahran ,1999).

Bien que le processus implique un certain nombre de réactions biochimiques complexes, il peut être résumé de manière relativement simple par l'équation suivante :



L'équation ci-dessus indique qu'une molécule d'azote gazeux (N_2) se combine avec huit ions hydrogène (aussi appelés protons) ($8H^+$) pour former deux molécules d'ammoniac ($2NH_3$) et deux molécules d'hydrogène gazeux ($2H_2$). Cette réaction est conduite par une enzyme appelée nitrogénase.

Les 16 molécules d'ATP (ATP = adénosine triphosphate, un composé de stockage d'énergie) représentent l'énergie nécessaire à la réaction BNF. En termes biochimiques, 16 ATP représentent une quantité relativement importante d'énergie végétale. Ainsi, le processus de BNF est « coûteux » pour la plante en termes de consommation énergétique. Quelle est la source ultime de cette énergie nécessaire au BNF ? Le soleil, via le processus de photosynthèse. Lors de la formation d'ammoniac (NH_3) il est converti en un acide aminé comme la glutamine. L'azote contenu dans les acides aminés peut être utilisé par la plante pour synthétiser des protéines nécessaires à sa croissance et à son développement (Clark *et al.*, 2008)

Cette fixation est assurée par des microorganismes fixateurs d'azote qui sont classiquement réparties en deux groupes:

I .2.2.1. Fixateurs symbiotiques

Appartenant à la famille des micro-organismes rhizobiums, les fixateurs symbiotiques sont des bactéries qui vivent en association avec les plantes légumineuses (ils entrent en symbiose avec elles). La fixation de l'azote intervient au niveau d'organes appelés les nodules, qui se forment au niveau de la racine de la plante.

Dans les nodules, s'effectuent les échanges symbiotiques entre les racines de la plante et les bactéries : les fixateurs symbiotiques se nourrissent de composés carbonés libérés par les racines ; en contrepartie ils fixent le diazote de l'atmosphère et le rendent disponible aux racines sous une forme assimilable. (Tarche *et al.*, 2010)

Dans les racines, circulent des glucides et composés carbonés (issus du métabolisme de la plante et de la photosynthèse), qui servent de nourriture pour la croissance des bactéries (flèches vertes). En parallèle, la bactérie prélève le diazote N_2 de l'atmosphère et le transforme en NH_4^+ (grâce à la nitrogénase) qui va pouvoir être assimilée par la plante. (La figure2) (Tarche *et al.*, 2010)

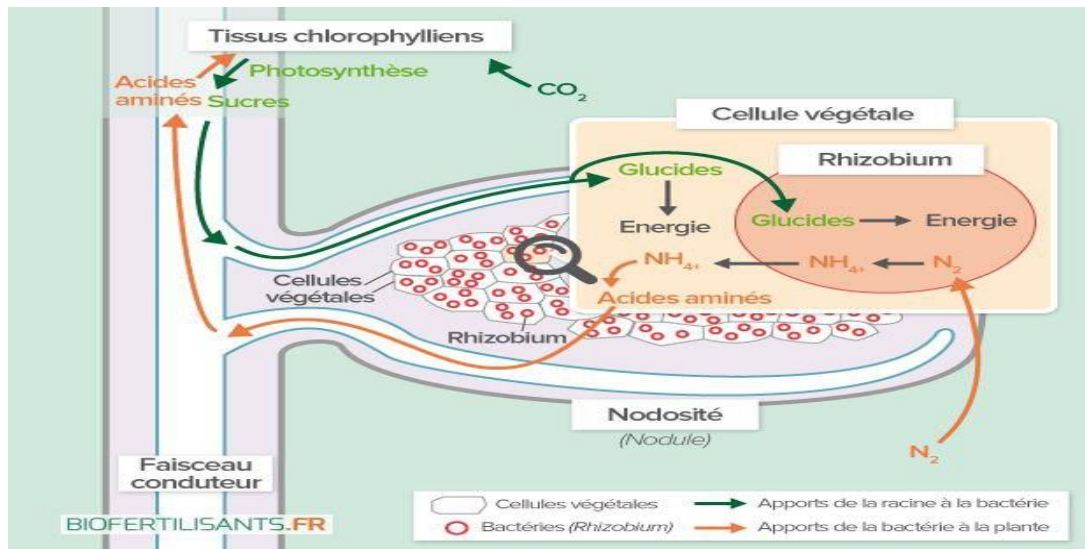


Figure 2: Fixateurs symbiotiques (biofertilisants.FR)

I .2.2.2. Fixateurs libres

Elles vivent librement dans le sol, dans une zone à l'interface entre le sol et les racines des plantes, appelée rhizosphère. A la différence des bactéries symbiotiques, leur action ne se cantonne pas aux cultures légumineuses (Elmeriche et *al.*, 1993).

I .3. Légumineuses

Les légumineuses sont des dicotylédones formant une association symbiotique avec les bactéries rhizobium, ce qui leur permet de fixer l'azote atmosphérique dans des nodosités, situées au niveau des racines. Cette capacité leur permet de s'adapter à tous les milieux, ce qui explique leur vaste répartition dans le monde. Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et *al.* 2000).

I .3.1. Classification des légumineuses

Légumineuses sont des plantes à fleurs appartenant à la famille des Fabacées, de l'ordre des Fables. Cette famille est traditionnellement divisée en trois sous-familles : les Mimosoideae

(sous-famille des acacias), les Caesalpinieae (sous-famille des paradisiers) et les Faboideae, ou Papilionidées (sous-famille des haricots).

♦ **Les Caesalpinioideae** Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (BELLIR D ; ZIADA M 2014) (Judd et *al.* 2001).

♦ **Les Mimosoideae** Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur. (BELLIR D ; ZIADA M 2014) (Judd et *al.*, 2001).

♦ **Les Papilionoideae** Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodules (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales: un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène. (BELLIR D ; ZIADA M 2014) (Judy et *al.*, 2001).

I. 3.2. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses sont riches en nutriments. Les légumineuses sont économiquement accessibles et contribuent à la sécurité alimentaire à tous les niveaux. Les légumineuses ont des effets bénéfiques importants sur la santé (Hamrouni,2001).

Les légumineuses favorisent la durabilité de l'agriculture et contribuent à atténuer le changement climatique et à s'adapter à ses effets. Les légumineuses encouragent la biodiversité (Duc et *al.*,2010).

Mais les légumineuses ont également des particularités biologiques remarquables puisqu'elles sont capables de développer une symbiose avec des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique, les rhizobiums. Cette particularité a des conséquences écologiques et agronomiques considérables. Ces plantes sont ainsi en première ligne dans la problématique d'une agriculture durable susceptible de pouvoir subvenir aux besoins de la totalité de la population mondiale. (Duc et *al.*,2010).

En rotation avec d'autres cultures, les légumineuses permettent aussi de restituer plus d'azote aux cultures suivantes que les espèces non fixatrices. Elles contribuent ainsi à améliorer la

fertilité chimique et biologique du sol, ce qui permet de réduire le recours aux engrais pour les cultures suivantes.

I .4. Rhizobiums

Rhizobium est un genre de bactéries aérobies du sol à Gram négatif diazotrophes, qui fixent l'azote atmosphérique. Les rhizobiums, ou rhizobia appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae*. Elles forment une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses, Il présente plusieurs caractéristiques comme suit (Werner,1992) :

♦ **Caractérisation morphologique du rhizobium** Les rhizobiums font partie du groupe de bactéries du domaine. Ce sont des bactéries Gram négatives, généralement flagellées et mobiles. Sa capacité à s'associer aux légumineuses, comme sa capacité à fixer l'azote, semble avoir évolué séparément à plusieurs reprises (évolution convergente) (Jordan,1984)

Les rhizobiums sont des bactéries en forme de bâtonnet, de 0,8 µm de diamètre et de 2 µm de long, souvent équipées de flagelles. À l'intérieur de leur hôte, ils prennent une forme différente : irrégulière ou souvent en forme de Y. Leur présence près de la racine stimule la formation d'une nouvelle structure au sein des cellules ciliées racinaires, appelée fil d'infection. Lorsque la présence de bactéries rhizobiennes est détectée, les poils absorbants s'enroulent et les bactéries s'installent dans la lumière de ce filament. À ce stade, la paroi cellulaire de la racine s'effondre et les bactéries se multiplient dans un espace à l'extérieur de la membrane du poil racinaire. Un « fil d'infection » tubulaire est alors produit, qui pousse le long des poils absorbants jusqu'à la racine elle-même. Ce filament est constitué d'un matériau de paroi cellulaire

spécifique et est essentiellement une invagination allongée de la paroi cellulaire, contribué à la fois par la plante et par les bactéries. Le filament infectieux finit par fusionner avec la membrane cellulaire à sa base, adjacente au cortex racinaire. Elle se propage ensuite pour pénétrer (infecter) les cellules corticales, à l'intérieur desquelles les bactéries se multiplient. Au fur et à mesure que les hyphes se développent, les cellules corticales se différencient et deviennent des cellules méristématiques, produisant la tumeur (nodule) qui caractérise l'infection des racines par *Rhizobium*. (Somasegaran et Hoben,1994)

♦ **Caractères biochimiques** Les Rhizobia étant des bactéries hétérotrophes, se nourrissent de glucides simples tels que le glucose, le saccharose, le mannitol, ainsi que de composés aminés. A l'exception de quelques souches, il n'est pas habituel que les Rhizobia fixent l'azote sous forme libre, sauf dans des conditions particulières. Certaines souches de Rhizobium ont besoin de vitamines pour leur croissance (Somasegaran et Hoben, 1994). La vitesse de croissance varie généralement d'une souche à l'autre chez les Rhizobia. Certaines se développent rapidement tandis que d'autres ont une croissance plus lente (Abdi et *al.* 2010). Leur croissance optimale se produit généralement à une température comprise entre 25 à 30 C°, avec un pH idéal situé entre 6 et 7 (Garrity, 2005). (b.Meriem b.imane 2017)

♦ **Caractères symbiotiques** Le principal caractère distinctif des rhizobia est l'infectivité ou la capacité d'établir une relation symbiotique avec une ou plusieurs espèces des plantes légumineuses et qui s'exprime par la formation des nodules (Prin et *al.* 1993). Le caractère d'effectivité ou d'efficience est défini par la capacité de ces rhizobia à réduire l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, à l'intérieur des nodules, qui se traduit par la couleur rouge ou rose de ces dernières (présence de l'enzyme de fixation d'azote) (Sadowsky et *al.* 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Prin et *al.* 1993) (l.manal.z.samah2020)

I.5. Symbiose rhizobium légumineuse

La symbiose entre rhizobium et légumineuses, décrite pour la première fois par Frank (1889), fournit un modèle pour l'étude des relations entre eucaryotes et procaryotes. Cette symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction de l'utilisation d'engrais. L'azote fixé par ce processus est restitué au sol après décomposition du matériel végétal (racines, nodules, parties aériennes) (Ndiaye, 1996).

I. 5.1. Processus de la nodulation

L'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les légumineuses exige un contact moléculaire entre les deux partenaires (Baba Arbi, 2016). L'association symbiotique entre rhizobium et les légumineuses passe par plusieurs étapes : pré infection, infection, organogènes (Perry et *al.*, 2004).

Le processus de nodulation est contrôlé par les gènes de la bactérie et de la plante légumineuse. Plusieurs phénomènes permettent l'expression des gènes : certains gènes sont activés qu'en présence de flavonoïdes synthétisée par la plante se processus passe par trois étapes

I.5.2. Substances responsables de la nodulation

♦ **Les flavonoïdes** Ce sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes dont les iso flavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses. Par chimiotactisme, les rhizobia colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils absorbants par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. (Taylor et Grotewold, 2005; Gibson et *al.*, 2008),

♦ **Les facteurs Nod** Les facteurs Nod sont des lipochitooligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -1,4. Une chaîne d'acide gras polyinsaturée est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Le nombre d'unités de N-acétyl-D-glucosamine constituant le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5. Les facteurs Nod peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité. La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs Nod requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes nod (A ; B ; C)(Debellé et *al.*,2001)

♦ **Les gènes de nodulation et leur localisation** Les gènes nod codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des facteurs Nod et ils peuvent être classés en trois groupes :

Les gènes nod régulateurs, les gènes nod communs et les gènes nod spécifiques.

» Les gènes nod régulateurs codent pour des protéines qui, en présence des flavonoïdes, activent l'expression des gènes nod communs. Le gène nod D codant pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante constitue un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte.

» Les gènes nod communs (A, B, et C), appelés aussi gènes de structure de la nodulation, sont impliqués dans la synthèse des facteurs nod. Ces gènes jouent un rôle essentiel dans la formation des nodosités.

» Les gènes nod spécifiques (ou hsn pour « host spécifique nodulation »), sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base du facteur nod Rhizobium. Ils confèrent des ornements variables aux facteurs nod et jouent donc directement un rôle dans la spécificité d'hôte.



Matériel et Méthodes

II .1.Matériel

Cette étude est réalisée sur les nodules racinaires de *Calicotom spinosa* qui est une plante à intérêt environnemental de la famille des Fabacées, tribu des *Genisteae*.

Calicotome spinosa est un arbuste épineux à fleurs jaunes qui a la capacité de fixer l'azote atmosphérique en collaboration avec les bactéries racinaires. (voir la Figure 3)

Cette espèce est récoltée en plein période de floraison d'un site du Parc National de Djurdjura (Bouira).

L'identification de cette espèce a été faite en référence à la flore de Quezel et Santa (1962-1963).

Nous avons aussi prélevé sur ce site un échantillon de sol afin de réaliser une analyse pédologique pH.



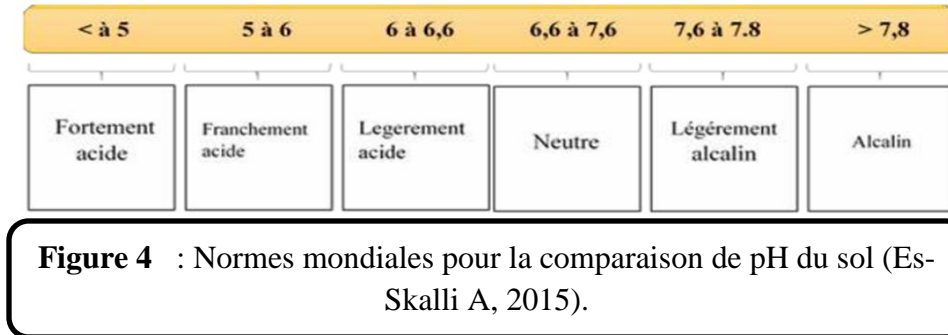
Figure 3 : *Calicotome spinosa* (know your weeds.com)

II .2. Méthodes

II .2.1. Analyse pédologique

Le sol à l'origine de la collecte de nodules sur *Calicotom spinosa* provient d'un site du Parc National de Djurdjura. Débarrassé des débris végétaux puis tamisé (= 2 mm),

Le pH du sol est déterminé par la méthode électro-métrique d'une solution aqueuse de terre fine dont le rapport sol / eau est 1/2,5. Deux mesures de pH sont effectuées : pH (eau) et pH (KCl). La lecture est faite au pH-mètre.



II .2.2. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante *Calicotome spinosa* récolté au Parc National de Djurdjura. Cette opération est réalisée selon la technique préconisée par Somasegaran (1994). Il s'agit de creuser environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour accéder aux nodules. On se débarrasse de la terre collée aux racines qu'on rince soigneusement avec de l'eau de robinet.

II .2.3. Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés pendant 20 secondes dans l'éthanol 95° puis transférés dans l'eau de javel 3° pendant 2 à 3 minutes. On rince 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Chaque nodule est transféré séparément dans un épendorf à l'aide d'une pince devant le bec benzène allumé.

II .2.4. Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent (1970). Chaque nodule stérile est broyé dans l'épendorf à l'aide d'une tige en métal stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale. A l'aide d'une anse de platine flambée au bec benzène le jus de nodule est étalé sur une boîte de pétri contenant le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA). L'ensemencement est réalisé selon la technique d'épuisement de manière à avoir des colonies bien isolées faciles à caractériser. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C.

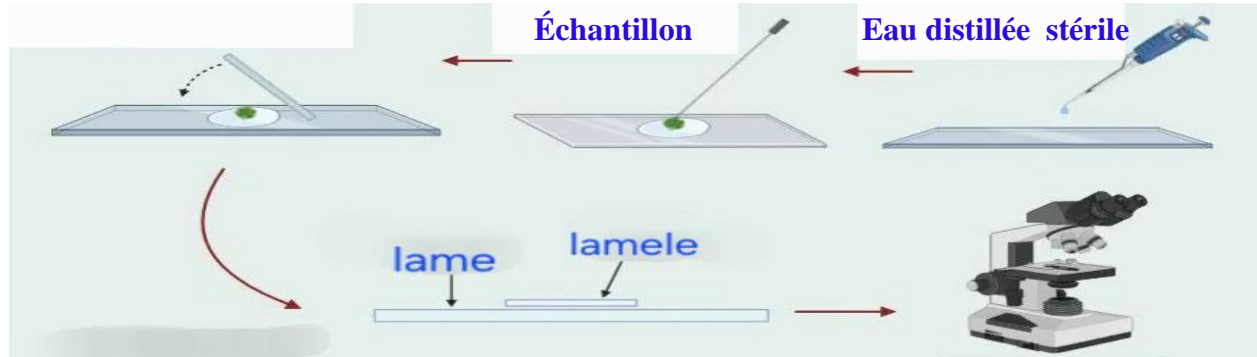
Une fois les souches pures elle seront également ensemencées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu YMB puis incubées à 28°C sous agitation pendant 7 jours.

II .2.5. Caractéristiques morphologiques des colonies

La forme, la couleur, la taille l'aspect et la production d'exopolysaccharides de ces souches étudiées sont déterminées sur milieu YMA (Annexe I). En effet à l'aide d'une anse de platine les isolats en question sont ensemencés dans des boites Pétri contenant le milieu YMA. L'incubation se fait à 28°C pendant 7 jours.

II .2.6. Caractéristiques cellulaires des isolats

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 YMA (Annexe I) contenant les bactéries jeunes, nous avons pris une suspension bactérienne et déposé sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement (10 ×40) (la figure 5).



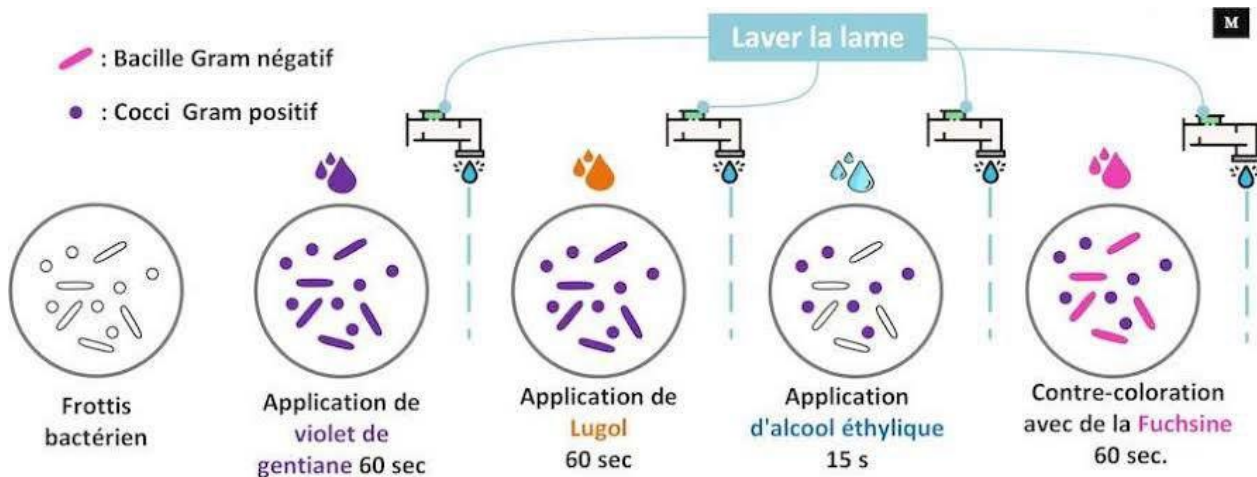
La figure 5 : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais. (biologyotesonline.com)

◆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 (voir la figure 6).

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).



La figure 6 : Les étapes de la Coloration de Gram (microbiologie-clinique.com)

II .2.7. Test de Bleu de Bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré Bleu de Bromothymol à une concentration de 0,0025% (w/v). Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C pendant 6 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncé indique une réaction basique.

II .2.8. Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron), nous renseigne sur la dégradation des sucres par les souches étudiées, qui est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique devient rouge et en milieu acide devient jaune. La pente de la gélose est ensemencée par stries serrées, puis le culot par piqûre profonde et centrale. L'incubation se fait à 28°C pendant 6 jours. La lecture se fait comme suit :

- Fermentation de glucose
 - Culot rouge : glucose non fermenté
 - Culot jaune : glucose fermenté
- Fermentation du lactose et/ou du saccharose
 - Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
 - Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)
- Production de gaz
 - Apparition de gaz dans le culot sous forme de bulles.
- Formation d'H₂S
 - Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre

II .2.9. Hydrolyse de l'urée

Pour chaque souche, 10 µl de la préculture fraîchement préparée dans le milieu YMA ont été utilisés pour ensemencer des boîtes contenant le même milieu solide additionné de 2% d'urée et 0,012% de rouge de phénol (Jarvis et *al.* 1977).

Les solutions de ces deux produits ont été stérilisées par filtration. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 7 jours. Les résultats ont été évalués par le changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge indigo indique l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

II .2.10. Réduction des nitrates

La réduction des nitrates est faite sur le bouillon nitraté. Après ensemencement de ce bouillon on incube à 28°C. Une fois les 7 jours écoulées, on additionne le réactif de Griess NRI (acide sulfanilique) et NRII (α naphtylamine).

- La coloration rouge cerise traduit la transformation des nitrates en nitrites par la nitrate réductase (NR+).

- L'absence de la coloration n'indique pas une réaction négative. On ajoute alors une pincée de poudre de zinc (réducteur de nitrates). Dans ce cas, si le milieu devient rouge les souches n'ont pas réduit les nitrates, par contre si le milieu demeure incolore, les bactéries ont dégradé les nitrates au-delà du stade nitrite (NR++).



**Résultats et
discussions**

III 1. Analyse pédologique

Le pH est mesuré sur une échelle logarithmique de 0 à 14. Un pH de 7,0 est considéré comme neutre. Plus le chiffre est élevé, moins le sol est acide ou plus il est alcalin; plus le chiffre est bas, plus le sol est acide. La lecture des valeurs de pH du sol où pousse *Calicotome spinosa* donne les résultats suivants :pH eau = 6,6 et pH K Cl = 6 ,2 .

Les résultats indiquent que la plante *Calicotome spinosa* pousse dans un sol acide.

III .2. Isolement et purification des bactéries nodulant *Calicotome spinosa*

Sur les racines des plantes de *Calicotome spinosa* nous avons collecté 19 nodules de couleur brun. Simples ou multilobés ils sont de forme sphérique ou allongée. (La Figure 7)



Figure 7 : les nodules de *Calicotme Spinosa* (photo personnelle)

L'ensemencement du jus de broyat des nodules réalisé sur milieu YMA selon la technique d'épuisement nous a permis d'obtenir des colonies bien isolées et faciles à caractériser.

A partir des nodules collectés sur *Calicotome spinosa* nous avons séparé 19 isolats bactériens.

III .3.Caractérisation morphologiques des colonies des isolats

Des colonies sont détectables à partir de 48h alors que d'autres peuvent aller jusqu'à 7 jours. On peut donc dire que nous avons des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide. Certaines produisent des EPS d'autres non. L'observation montre des petites et des grandes colonies de forme circulaire, a une apparence arrondie, est de couleur blanc, crème, et transparent, de taille variable et de forme circulaire, régulière ou pas, aplatie ou convexe. Le nombre des colonies diffère d'une boîte à l'autre du moment que les nodules sont traités isolément (la Figure 8).

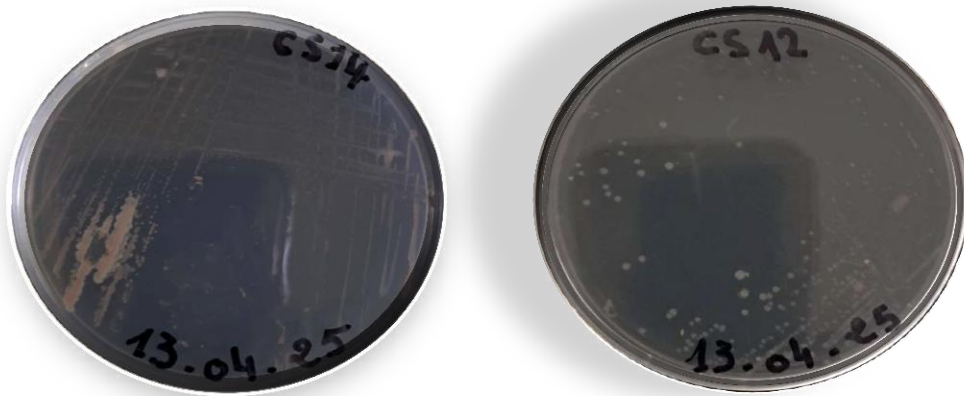


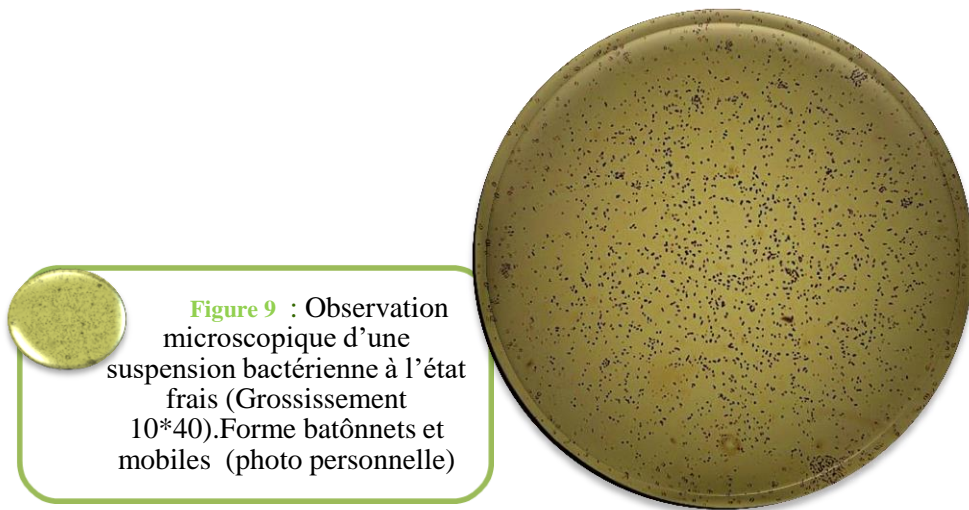
Figure 8 : Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA(photo personnelle)

Tableau I : Caractères morphologiques des colonies

| Les souche | Apparition des colonies | EPS | Couleur | Transparence | La forme | Aplatie /convexe |
|------------|-------------------------|----------|--------------|--------------|----------|------------------|
| Cs1 | Au jour 3 | Absent | Transparente | Translucide | Régulier | Convexe |
| Cs6 | Au jour 6 | Présence | Blanche | Translucide | Régulier | Aplatie |
| Cs12 | Au jour 7 | Présence | Blanche | Opaque | Régulier | Convexe |
| Cs14 | Au jour 7 | Présence | Crème | Opaque | Régulier | Convexe |

III .4.Caractéristiques cellulaires des isolats

L'observation microscopique (X40) des bactéries à l'état frais montre des petits bâtonnets, parfois avec extrémité arrondie, avec un seul ou deux flagelles polaires. Ils présentent une mobilité circulaire, droite avec mouvement de rotation, lente et rapide.



Après coloration la totalité des bactéries purifiées et observées sous huile à immersion (X100) se révèlent de Gram négatif. Les souches que nous avons isolées pour l'étude sont conservées sur milieu YMA dans des tubes inclinés .



III .5. Test du Bleu de Bromothymol (BBT)

Dans cette étude, toutes les souches testées alcalinisent le milieu à l'exception des souches **CS1**, **CS6** et **CS12** qui ont acidifiées le milieu YMA additionné de BBT (Figure 11) Cette alcalinisation du milieu suggère l'appartenance de ces souches au rhizobia genre *Bradyrhizobium* à croissance lente. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide (ont été rapportées par Moreira et al (1993).

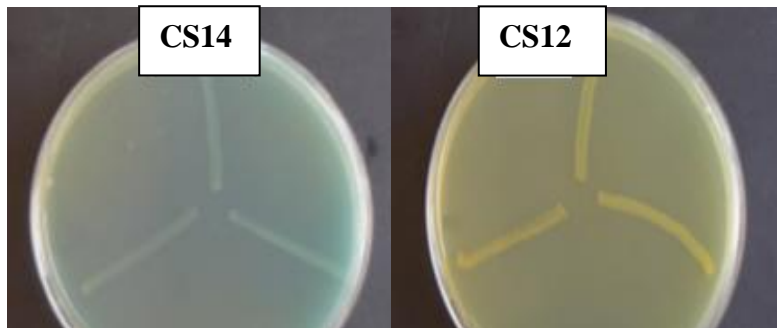


Figure 11: Résultats des souches CS12 et CS14 en milieu YMA+BBT. (photo personnelle)

III .6. Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Après ensemencement et incubation des souches sur milieu TSI, aucune souche y compris les souches de références ne fermentent ni le lactose, ni le saccharose, ni le glucose et aucune production de gaz et de H₂S ne s'est produite (Figure 12 et Tableau II).



Figure 12 : La réaction négative des souches (exemple CS14) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S (photo personnelle).

Tableau II : Résultats des souches au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S.

| Les souches | Pente | Culot | | H ₂ O |
|-------------|----------------------|---------|-----|------------------|
| | Lactose / saccharose | Glucose | Gaz | |
| Cs1 | - | - | - | - |
| Cs6 | - | - | - | - |
| Cs12 | - | - | - | - |
| Cs14 | - | - | - | - |

III .7. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et *al.* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH.

L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Toutes les souches testées ont pu hydrolyser l'urée donc existence d'une uréase, à l'exception de la souche CS14.

III .8. Réduction des nitrates

Les souches Cs1, Cs14 présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches Cs6, Cs12 possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière.

En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood et *al.* 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986).

CONCLUSION

Dans le cadre de la réhabilitation et de la revégétalisation des sites dégradés, ainsi que de la prévention de l'érosion des sols, cette étude vise à identifier la biodiversité des bactéries symbiotiques associées à *Calicotome spinosa*, une plante présentant un intérêt environnemental.

L'analyse pédologique du sol, effectuées au laboratoire ont déterminé la nature du sol, d'après les mesures du pH, le sol est acide.

Dans ce travail nous avons isolé et purifié 19 souches bactériennes à partir de 19 nodules racinaires de *Calicotome spinosa* collectés au Parc National de Djurdjura. Ces isolats ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique et cellulaire ainsi que quelques tests biochimiques.

La caractérisation morphologique et cellulaire des souches isolées ont montré qu'elles formaient des colonies blanches transparentes, opaques ou translucides. Les cellules sont de petits bâtonnets, mobiles et Gram négatif. Parmi ces souches, la souche Cs12 et Cs14 sont caractérisées par la présence d'exopolysaccharides.

Le test au bleu de Bromothymol montre une alcalinisation du milieu qui suggère l'appartenance de ces souches au rhizobia genre *Bradyrhizobium* à croissance lente.

Aucune souche ne fermente ni le lactose, ni le saccharose, ni le glucose et aucune production du gaz et de H₂S ne s'est produite.

Toutes les souches testées ont pu hydrolyser l'urée donc existence d'une uréase. Quelques isolats bactériens présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, d'autres possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

Ces résultats préliminaires suggèrent l'appartenance de ces isolats bactériens de *Calicotome spinosa* au rhizobia et au genre *Bradyrhizobium*.

En perspective, il est souhaitable :

-Faire un test de nodulation afin de confirmer leur capacité a noduler la plante hôte

-d'enrichir cette collection par d'autres souches provenant de différentes régions arides d'Algérie.

- d'élargir cette étude par d'autres paramètres.



Références bibliographiques

- **Abdi H, Williams LJ.** Correspondence analysis. In: Salkind NJ, ed. Encyclopedia of Research Design. Thousand Oaks: Sage Publications; 2010, (In press).
- **Arrese-Igor, C., González, E. M., Marino, D., Larrainzar, E., Royuela, M., & Aparicio-Tejo, P. (1997).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in legumes. *Journal of Plant Physiology*, 151(1), 85-90.
- Articles on fertilization and nitrogen fertilizers. (2024/ 03/26). *Ngenesis.com*.
- **Clark C.M., Tilman D., 2008.** Loss of plant species after chronic low level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, 451. 712-715p.
- **Davidson, M. S., & Robson, R. L. (1986).** Nitrate reduction by Rhizobium species. *Journal of General Microbiology*, 132(8), 2247-2253.
- **Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J et Boivin C. (2001).** nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica Mini review*. 48 (2): 359–365
- **Duc G., Mignolet C., Carrouée B., Huyghe C. (2010).** Importance économique passée et présentes de légumineuses: Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Inn. Agro*. 11. 24p.
- **Dreyfus, B., & Dommergues, Y. R. (1982).** Nitrogen fixation by Acacia in tropical Africa. *Plant and Soil*, 67(1-3), 379-383.
- **DR. RIAH.N. (2024/07/02).** Symbiose rhizobium-légumineuse. Université des frères mentouri constantine.
- **Elemerich C. (1993).** Fixation de l'azote et interaction bactéries-plantes.
- Fixation de l'azote : définition et explications. (2007, 12 14). *Aqua portail*.
- **Frank, B, 1889.** Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7 pp 332 - 346.
- **Giraud, E. Moulin, L. Vallenet, D. Barbe, V. C. (2007).** Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Google scholar*, p. 316(5829).
- **Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Université des sciences et Technologie de Lille. Edition de Boeck.
- **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. Ed De Boeck et Larcier S.A, Paris. 514p.

- **Jarvis, B. D. W., Thorpe, W. P., & Johnson, J. L. (1977).** Urea hydrolysis as a diagnostic criterion in bacterial identification. *Journal of Applied Bacteriology*, 43(2), 367-374.
- **Journant E.P., 2004.** Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. [Www.crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr).
- **Jordan D.C. (1984).** Family III. Rhizobiaceæ. In: N.R. Kreig and J. G .Holt (ed).Bergey's manual of symbiotic bacteriology. The Williams & Wilkins Co.Baltimore. 1. pp 234-254.
- **KADI F. & KHELIL H, 2015:**Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant *Vicia sativa* L. Et *Vicia tetrasperma* L.Mémoire de Master.Université A. MIRA – Bejaia
- L'azote est un élément indispensable à l'agriculture, mais il peut entraîner des pollutions. (2020/09/19). Programme d'actions national nitrates .
- **Moreira, F. M. S., & Siqueira, J. O. (1993).**Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Brazil:Universidade Federal de Lavras (UFLA).
- **Ndiaye A. A., 1996.** Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'Acacia. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop. 43.
- **Ndiaye A., 1996.** Contribution à l'étude de la symbiose Rhizobium-légumineuses. Thèse, Univ. Dakar.
- **Peret B. 2007-** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France
- **Prin Y., et al. (1993).** Caractères symbiotiques et diversité des souches de Rhizobium nodulant *Acacia albida*. Séminaire GIS Sol, Montpellier.
- **Perry J.J., Staley J.T., Lory S.,(2004).** Microbiology. ED. Dunod, paris .889 P
- **Pujic P., Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofactur*. 28. (298). pp 26-29.
- **Quezel P., Santa S., 1962** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.
- **Raven P.H., Evert R.F et Eichlorn S.E. (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.
- Rhizobium : définition et explications. (2008/11/ 06). *Aquaportail*.
- **Sanchez, J.-M. (2017/02/03).** Légumineuse + Bactérie Rhizobium = Symbiose. *Agriculture-de-conservation.com*.

- **Sherwood, R. F., Pidcock, A., & Williams, D. R. (1984).** Nitrate reduction tests in the identification of bacteria. *Journal of Clinical Pathology*, 37(2), 219-222.
- **Somasegaran P, Hoben H.J. (1994) :** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- **Somasegaran P., Hoben H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlageNew York. In. 450p.
- **Somasegaran P., Hoben H J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Sringer verlage New York
- **Sprent J.I., 1995.** Légume très and shrubs in topic : N₂ Fixation in perspective. *Soil Biol.Biochem* 27:401-407.
- The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact | Learn Science at Scitable. (2010/11/03). Nature
- **Taylor LP, Grotewold E. (2005).** Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 317–323.
- **Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli B., Benhizia H., Khelifi D.,Squartini A. (2010).**Caractérisation des bactéries isolées a partir des nodules desespèces de légumineuses du genre Hédysarum : H.pallidum des f., H.spinosissimum subs.capitatum, M. cornosum des f.et H.naudinianum coss. *Scien.Technol. C-N°32.* pp 43-44.
- Un potager bien pourvu en azote grâce aux légumineuses. (2021/ 10 /28). *Jardins de France*.
- **Vincent, J.M. 1970:** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.I.B.P .Handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- **Werner D. (1992).** Symbiosis of plants and cell proteins analysis from Rhizobium.Fredii. *Acad. Sin.*39p.
- **Zoom sur les bactéries fixatrices d'azote. (2016/ 07 /11).** *Biofertilisants.fr* (Infos & usages sur les biofertilisants en agriculture).
- **Zahran, H. H. (2009).** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbial Ecology*, 58(3), 369-379.
- **Zahran H.H. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and Nitrogen fixation underserver condition and in an arid climate. *Microbiol. Molec. Bio. Rev.*63 (4). 968p.



ANNEXES

ANNEXES

Annexe I : I- Milieux de culture utilisés pour la culture du rhizobium

1- Composition du milieu YMB (Vincent, 1970)

| | |
|---|---------|
| Mannitol | 10 g |
| Extrait de levure | 0,4 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0, 2 g |
| Na Cl..... | 0, 1 g |
| Eau distillée qsp..... | 1000 ml |

PH ajusté à 6,8

2- Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)

| | |
|---|---------|
| Mannitol | 10 g |
| Extrait de levure | 0,4 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0, 2 g |
| Na Cl..... | 0, 1 g |
| Agar..... | 15 g |
| Eau distillée qsp..... | 1000 ml |

PH ajusté à 6,8

Annexe II : Bleu de bromothymol B.B.T 100 ml :

BBT : 0,4 g

alcool 95° : 20 ml

Soude 0,1 mol/L : 7,4 ml

Eau déminéralisée qsp 100mL

Indicateur de pH : Jaune - vert - bleu

RESUME

19 souches bactériennes ont été isolées et purifiées des nodules racinaires de *Calicotme Spinoza*. Ces souches ont fait l'objectif d'une caractérisation morphologique, cellulaire et biochimique. Les résultats obtenus montrent des colonies blanches opaques ou transparentes avec présence ou absence d'EPS, les cellules sont de petits bâtonnets mobiles à Gram négatif. Ces isolats ne fermentent ni le lactose, ni le saccharose et ni le glucose et aucune production du gaz, ni de H₂S. ces souches ont une uréase et une nitrite réductase en plus de la nitrate réductase pour certains isolats.

Mots clés : *Calicotome Spinoza*, Morphologique, Cellulaire, Nitrate réductase, Uréase

ABSTRACT:

19 bacterial strains were isolated and purified from the root nodules of *Calicotome Spinoza*. These strains were characterized morphologically, cellularly, and biochemically. The results show opaque or transparent white colonies with the presence or absence of EPS. The cells are small, motile, Gram-negative rods. These isolates do not ferment lactose, sucrose, or glucose, and do not produce gas or H₂S. These strains have urease and nitrite reductase in addition to nitrate reductase for some isolates.

Keywords: *Calicotome Spinoza*, Morphological, Cellular, Nitrate Reductase, Urease.

ملخص:

تم عزل وتنقية تسعة عشر سلالة بكتيرية من عقيدات جذور نبات *كاليكوتوم سبينوزا*. وُصفت هذه السلالات مورفولوجياً وخليوياً وكيميائياً حيويًا. أظهرت النتائج مستعمرات بيضاوات معتمات أو شفافة مع وجود أو غياب EPS. الخلايا عبارة عن عصيات صغيرة متحركة سالبة الجرام. لا تُخمر هذه العزلات اللاكتوز أو السكروز أو الجلوكوز، ولا تُنتج غازات أو كبريتيد الهيدروجين. تحتوي هذه السلالات على إنزيمي اليورياز والنيتريت ريدكتاز، بالإضافة إلى إنزيم النترات ريدكتاز في بعض العزلات.

الكلمات المفتاحية: *كاليكوتوم سبينوزا*، مورفولوجياً، خليوياً، نترات ريدكتاز، يورياز.

HANADI ET KHAOLA

M&R&J
POUR LA LECTURE