

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 ENVIRONNEMENT

*OPTION : ECOLOGIE DES MILIEUX
NATURELS*

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

Par :

GUAOUI Chahrazed

LAOUBI Djawida

Intitulé

**Caractérisation physiologique et morphologique
des souches rhizobiennes isolées du genre
*Retama***

Soutenu devant le jury composé de :

Mr BOUNAR Rabah	Pr	Université de M'Sila	Président.
M^{me} AHNIA Hadjira	MCA	Université de M'Sila	Rapporteuse.
M^{me} ARAB Radhia	MCA	Université de M'Sila	Examinatrice.

Année universitaire : 2022 /2023

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions ALLAH de nous avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé pour mener à bien ce travail.

Nous tenons ensuite à remercier Mme AHNIA Hadjira, enseignante à l'université Mouhamed Boudiaf de Msila, pour nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour avoir bien voulu guider ce travail et pour tous ses conseils et encouragements.

Nous tenons à adresser l'expression de nos vifs remerciements aux membres du jury :

Mr BOUNAR Rabah Professeur à l'université Mouhamed Boudiaf de Msila qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury.

Mme ARAB Radhia Maitre de conférence d'avoir d'examiner ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie cet humble travail à ceux qui ont eu le mérite de mon succès après Dieu

À ma chère maman

A celle qui m'a soutenu en l'appelant à la source de la tendresse, je n'aurai peut-être pas toujours l'occasion de dire merci, et je n'aurai peut-être pas l'audace d'exprimer ma gratitude et gratitude, sache que tu as une fille qui est toujours prête à t'offrir son âme et son cœur pour tout ce que tu m'as donné, que Dieu te protège et te garde.

À mon cher père

A celui qui m'a appris que le monde est un combat et que son arme est la connaissance, au meilleur soutien pour moi dans ce monde, merci pour votre soutien moral et matériel, que Dieu vous garde et vous protège et vous donne santé et bien-être.

À mes frères et sœurs

*À qui j'ai partagé toute ma vie, merci, mon cadeau dans ce monde
Mohammad, Asmaa, Omar, Chahd et la prunelle de mes yeux Youcef*

À mes amis

*Toi, mon ami, ma vie, mon rythme cardiaque, SAHRAOUI Linda
A toi, mon ami dans ce travail (GAOUI Chahrazed), merci d'avoir enduré ma
préoccupation, mon épuisement et mon anxiété
Tout au long de nos études. Que Dieu te récompense de tout
le meilleur pour toi et ta famille.
Enfin merci, un cœur qui bat pour moi en soutien
et peur pour moi*

Djawida

Dédicace

Je dédie ce travail à :

À mes chers parents, merci de votre affection de votre sacrifice et de tous les Efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, j'espère que ce travail Soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect. Merci

Pour votre présence dans les moments les plus difficiles.

À la mémoire de ma grand-père et mon oncle Hussein que dieu

L'accueille dans son vaste paradis.

À Mes frères : Saïd, Ramzi et À mes sœurs Hassina, Mariam

À celui avec qui les plus belles coïncidences m'ont réuni, le compagnon du chemin que les jours ne changent pas

À mes chers : Alaa, Dima, Mohammed, Nihal

À toutes mes copines pour les bons moments qu'on a passé ensemble. Khawla, Laila, Siham, Bouchra, Zeineb

À Ma binôme et sa famille.

À tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce travail.

Chahrazed

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I. Azote	2
II. Cycle de l'azote	2
II.1. Le processus de fixation de l'azote des diatomées (N ₂)	3
II.2. La nitrification	3
II.3. La dénitrification	3
III. Fixation biologique de l'azote	4
III.1. Fixateurs libres	4
III.2. Fixateurs symbiotiques	5
IV. la symbiose rhizobium-légumineuse	5
IV.1. Légumineuse	8
IV.2. Rhizobia	9
V. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums – légumineuses	9
V.1. Stress hydrique	10
V.2. Stress thermique	10
V.3. Stress salin	10
V.4. PH	10
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I. Matériel	11
II. Méthodes	11
II-1. Caractérisation phénotypique des souches de <i>Retama</i> sp	11
II-1.1. Morphologie des colonies	11
II-1.2. Caractérisation culturelle des souches	12
II-1.3. Caractérisation physiologique	13
II.1.3.1. L'effet de pH	13
II.1.3.2. Effet de la température(T°C)	13
II.1.3.3. Effet du Chlorure de Sodium (NaCl)	13
II.2. Caractérisation biochimique des souches bactériennes	13
II.2.1. Type respiratoire	14
II.2.2. Test de la catalase	14
II.2.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)	14
II.2.4. Recherche de la β-galactosidase et β-galactoperméase	14
II.2.5. Production d'indole	15
II.2.6. Test acide-indole-pyruvique	15
II.2.7. Utilisation du citrate	15
II.2.8. Hydrolyse de l'urée	16
II.2.9. Réduction des nitrates	16

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Caractérisation phénotypique des souches de Retama sp	17
III.1.1. Morphologie des colonies	18
III.1.2. Caractérisation culturale des souches	19
III.2. Caractérisation physiologique	19
III.2.1. L'effet de pH	19
III.2.2. Effet de la température(T)	20
III.2.3. Effet du Chlorure de Sodium (Na Cl)	20
III.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes	21
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	24
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	25
ANNEXES	30
Résumé	

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Le cycle de l'azote (Pujic, 2009).	2
2	plante de <i>Retama spherocarpa</i> (photo personnelle)	7
3	Arbre phylogénétique de séquences d'ADNr 16S provenant d' α -, β -et γ - <i>protéobactéries</i> . Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et <i>al.</i> , 2009).	9
4	Ensemencement : technique des cadrans (Vincent, 1970)	11
5	méthodes d'examen à l'état frais des souches étudiées.	12
6	Aspect des colonnes bactériennes étudiées sur milieu YMA S2 et S3	19
7	Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais (Grossissement 10*40). Forme bâtonnets et mobile	20
8	Observation microscopique d'un frottis de bactérie gram négatif (Grossissement 10*100). Coloration rose	21
9	Effet du pH sur la croissance des souches	17
10	Effet de la température sur la croissance des souches.	18
11	Effet du Na Cl sur la croissance des souches	18
12	Résultats de réaction des souches S3 en milieu YMA+BTB.	22
13	montrant la réaction négative des souches (exemple S1) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S.	23

Liste de tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Caractères morphologiques des colonies.	18
2	Résultats des souches au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S.	22
3	La moyenne des DO obtenue aux différentes températures (Annexe II)	31
4	La moyenne des DO obtenue aux différents pH (Annexe II)	31
5	La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl (Annexe II)	31

Liste des Abréviations

BTB : Bleu de bromothymol

β-gal: β-galactosidase

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

D.O: Densité Optique.

EPS : Exopolysaccharides.

Fe : fer.

N₂ : Diazote.

NaCl : Chlorure de sodium.

NH₃ : Ammoniaque.

NO₃/N₂ : Nitrate/Nitrite réductase.

NR : Nitrate Réductase

pH : potential Hydrogène.

PHB: Poly-β HydroxyButrates.

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol broth.

YEM: Yeast Extract Mannitol.

PHB: Poly-β-hydrox butyrate

Introduction

Introduction

L'azote est un constituant essentiel des acides aminés et des protéines et par conséquent un élément minéral nécessaire pour tout organisme vivant. Dans la nature, l'azote est très abondamment présent sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante. Il constitue le principal facteur limitant de croissance de la plante qui ne peut l'utiliser que sous forme combinée (nitrate, ammoniac, ou urée), et par conséquent un facteur limitant majeur de la production agricole (Robert et *al.*, 2005).

Les légumineuses sont considérées l'une des familles les plus remarquables du règne végétal. Elles sont des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou des arbres à racines présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote.

Cette famille occupe une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elle est sur le plan agricole importante et est spontanée ou cultivée dans le monde entier à des fins diverses, notamment la production de nourriture et de fourrage, comme les engrais verts, ou l'assurance du sol pour réduire l'érosion. Cette importance réside surtout dans leur relation symbiotique avec les bactéries du sol appelé rhizobia (Chen et *al.*, 1995).

Les bactéries telle que les rhizobiums, 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 (Ndoye, 1999).

L'objectif de ce travail est la caractérisation phénotypique des souches de rhizobia isolées de nodules racinaires de *Retama* sp à travers des caractères morpho-cultureaux, une caractérisation physiologique et des tests biochimiques.

Ce mémoire est organisé en trois chapitres dont le premier est une synthèse bibliographique présentant des généralités sur le partenaire (rhizobia et légumineuses) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuses), suivi du chapitre matériel et méthodes. Enfin le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussions.

*Chapitre I : synthèse
bibliographique*

Chapitre I : synthèse bibliographique

I. Azote

L'azote est le deuxième composant le plus important pour les plantes après le carbone (Roger, 1996), c'est une molécule essentielle présente en grande quantité (78 % en volume) dans l'atmosphère. Il s'agit d'un gaz inodore et incolore que l'on retrouve également sous forme de diazote ou N_2 (Peret, 2007). L'atmosphère n'est pas la principale source d'azote terrestre ; au contraire, la couche lithosphérique contient 98% de tout l'azote. Il sert souvent de principal facteur limitant pour la production des plantes agricoles (Roger, 1996). Parfois, il représente jusqu'à 7 % de la matière sèche et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (Tourte *et al.*, 2005).

II. Cycle d'azote

La quantité globale d'azote est généralement divisée en trois groupes principaux : le groupe constitué de l'atmosphère, du sol (et de toute eau associée) et de l'azote présent dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois groupes donnent le cycle de l'azote (Hopkins, 2003). (Figure1).

Les trois principales étapes de ce cycle sont : la fixation de l'azote diatomique (N_2), la Nitrification et la dénitrification (Daniel *et al.*, 1999).

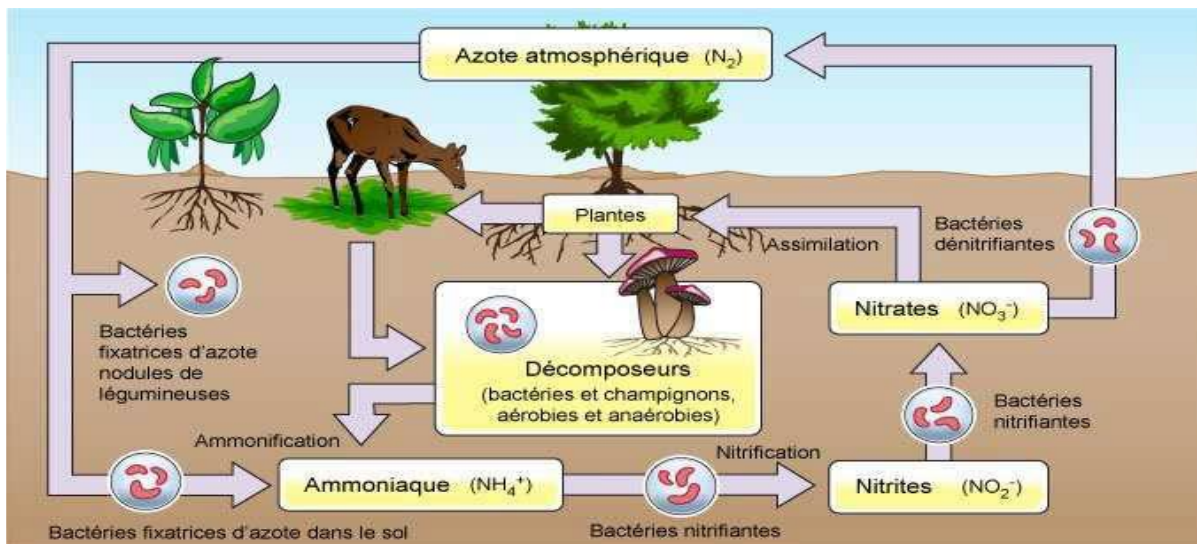


Figure 1 : Le cycle de l'azote (Pujic, 2009).

Chapitre I : synthèse bibliographique

II.1. Le processus de fixation de l'azote des diatomées (N₂)

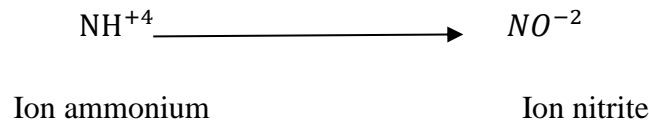
Cette réaction a lieu dans les sols acides et nécessite un apport d'énergie photosynthétique (cyanobactéries, symbiotes légumineuses). Cette réaction tend à produire des composés d'ammonium (NH⁺ 4) et de l'ammoniac (NH₃), et la réduction de l'azote s'effectue à l'aide de composés organiques, comme le montre l'équation suivante :



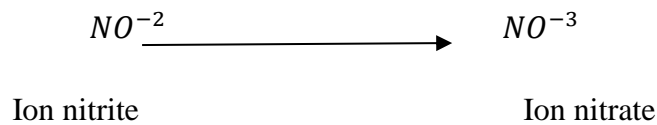
II.2. La nitrification

La nitrification est une réaction d'oxygénation qui se produit grâce à un catalyseur enzymatique relié aux micro-organismes du sol. (Nitrosomonas ou Nitrobacter). Les produits de fixation (NH⁺ 4, NH₃) sont convertis en nitrites et nitrates (NO⁻², NO⁻³) (Hopkin ,2003). Les équations suivantes indiquent :

Nitrosomonas

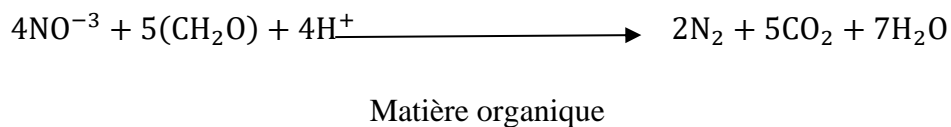


Nitrobacter



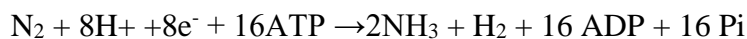
II.3. La dénitrification

Il s'agit d'une réduction de(NO⁻³) grâce à l'utilisation de micro-organismes tels que (*Pseudomonas*, *Paracoccus*, etc.) qui convertissent les nitrates (NO⁻³) en azote atmosphérique(N₂) (Pujic, 2009). Cette procédure nécessite la présence de matières organiques selon l'équation :



III. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet la production de substances contenant des protéines à partir de l'azote présent dans l'atmosphère de l'environnement. Ce type de fixation est catalysé par un complexe enzymatique appelé « nitrogénase », extrêmement conservé biochimiquement et génétiquement (Hopkins,2003). Ce complexe contient les enzymes dinitrogénase (MoFe) et dinitrogénase réductase (Fe), qui favorisent la conversion du gaz azote(N₂) en ion ammonium (NH⁺⁴) La réaction suivante est catalysée par cette enzyme :



Cette fixation est assurée par des micro-organismes fixateurs d'azote, souvent divisés en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques.

III.1. Fixateurs libres

(Également connues sous le nom de bactéries non symbiotiques fixatrices d'azote), sont extrêmement variés et vivent dans le sol. Ils sont le type de micro-organismes qui sont concentrés dans la rhizosphère (Elmeriche et *al.*, 1993). On distingue principalement :

- Des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*.
- Des bactéries anaérobies : *Clostridium*.
- Des bactéries aérobies chimioorganotrophes : *Azotobacter*, *Aospirillum*, *Diazotrophicus*
- Des cyanobactéries : *Synechococcus*.
- Des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique : *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*.

III.2. Fixateurs symbiotiques

Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui permettent un couplage entre la fixation d'azote qui demande beaucoup d'énergie et la photosynthèse. Cette fixation s'effectue au niveau des racines dans les nodosités qui contiennent des micro-organismes en très grand nombre. Le rôle de ces bactéries dans la formation des nodules fut rapidement établi en leur absence.

Chapitre I : synthèse bibliographique

Les deux formes de symbioses les plus répandues dans le sol sont celles entre les légumineuses et les bactéries Gram-négatives, communément appelées rhizobia, et celles des plantes souvent ligneuses à Gram positif du genre *Frankia*.

IV. la symbiose rhizobium-légumineuse

La symbiose rhizobium-légumineuse est le résultat d'une interaction spécifique entre la plante et la bactérie du sol. Cette interaction commence par une communication entre ces deux partenaires via des signaux moléculaires (Perret et *al*, 2000). En effet, la bactérie Elle provoque le développement d'un organe spécialisé sur les racines ou tiges appelé nodule, au sein duquel la bactérie intracellulaire se différencie en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniac (Gibson et *al*, 2008).

Cette relation symbiotique continue d'être le principal mécanisme biologique d'approvisionnement en azote dans les écosystèmes de production agricole. (Body et *al*, 2000).

IV.1. Légumineuse

La famille des légumineuses est l'une des plus grandes plantes à fleurs dicotylédones. Elle est considérée comme l'une des espèces botaniques les plus riches et les plus diversifiées avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Allen et Allen 1981 ; Broughton, 1984).

Cette famille comprend des espèces herbacées présentent principalement dans les régions tempérées et des espèces herbacées des régions chaudes (Michel *et al*, 2005). Elle présente des nodules sur les racines et sur les tiges où se trouvent des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (Murielle et Daniel, 2004).

Les légumineuses ont une grande importance économique, dont beaucoup constituent des ressources fourragères comme la luzerne (*Medicago sativa*), le soja alimentaire (*Glycine max L.*), le haricot (*Phaseolus sp.*), cacahuète (*Arachis hypogaea L.*) et les cultures horticoles (Mimosas). Elles ont aussi des propriétés médicinales (Sebihi, 2008).

Grâce à la capacité des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses produisent des protéines en abondance (leurs graines contiennent trois fois plus de protéines que les céréales) sans fertilisation azotée (Domergue, 2006).

Chapitre I : synthèse bibliographique

Ainsi, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, ces espèces adaptées sont une importante source de nourriture pour l'homme (pois chiches, haricots, pois, lentilles, cacahuètes, etc...). Ainsi, les légumineuses couvrent globalement 66 % des besoins de subsistance des communautés rurales des pays en développement, tout en assurant le maintien durable de la fertilité des sols et de l'équilibre écologique (Domergue, 2006).

Les légumineuses basées sur la forme des fleurs, cette famille est divisée en trois sous-familles.

Mimosoideae, Caesalpinoideae et Papilionoideae (Guignard et Dupont, 2005). Ils constituent le plus grand groupe de plantes impliquées dans la fixation de l'azote (Raven et *al.*, 2000).

- **Mimosoideae**

C'est une grappe dense de nombreuses petites fleurs avec de nombreuses étamines dépassant à l'extérieur des petits pétales. Les fleurs sont symétriques. Il y a principalement des arbres et des arbustes tropicaux et subtropicaux. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Sur les 10 % d'espèces déjà étudiées, la plupart sont nodulaires (glycine, acacia, etc.) (Maxted et Bennett, 2001a).

- **Caesalpinoideae**

Les étamines associées, qui ont généralement des fleurs ressemblant à des papillons et se composent d'environ 150 genres et 2200 espèces, sont des arbres ou des arbustes que l'on trouve principalement dans les régions tropicales et subtropicales. Seulement 23 % des espèces examinées sont connues pour être nodulées par les rhizobiums. Ces espèces nodulaires se retrouvent principalement dans les tribus Caesalpinieae et Cassieae. Les embranchements Cercideae et Amherstieae sont très peu nodulaires (Maxted et Bennett, 2001a).

- **Papilionoideae**

Elle représente les sous-familles les plus diverses avec 429 genres et plus de 12 000 espèces, principalement des herbes et des petits arbustes répartis dans le monde. On les trouve dans les régions tempérées et tropicales et comprennent des légumineuses céréalières familières telles que les haricots et les pois (Ferchichi, 2006) ou ont des fleurs en forme de papillon avec des ailes et une carène composée de deux pétales inférieurs joints. Cinq sépales fusionnent pour former un

Chapitre I : synthèse bibliographique

tube. Dix étamines sont généralement contenues dans les pétales et reliées par leurs filaments au tube, ou étamine, qui entoure le pistil. Sur les 21 % d'espèces déjà étudiées, la majorité (97 %) sont causées par des rhizobiums (Maxted et Bennett, 2001b).

- **Genre *Retama***

Les rétames sont des légumineuses envahissantes, leur nom dérive du nom biblique (Rotem), que les Arabes ont changé en (R'tem), ou (retam). Ce sont des arbustes vivaces à feuilles unilatérales pouvant atteindre jusqu'à trois mètres de long. Trois espèces de *Retama* se trouvent en Algérie : *Retama monosperma*, *Retama sphaerocarpa* et *Retama retam* (Mahnane, 2010).



Figure 2 : plante de *Retama sphaerocarpa* (photo personnelle)

Parmi les caractéristiques du genre *Retama* on retrouve :

- Résistance à la sécheresse : L'espèce possède un système racinaire bien développé qui lui permet de s'étendre verticalement dans les sols humides jusqu'aux couches profondes, compensant quelque peu les effets négatifs d'une mauvaise rétention de l'humidité.
- Capacité à pousser dans des sables souvent déficients en éléments nutritifs et avec une différence de température importante entre le jour et la nuit ;
- Adaptabilité aux vents forts et à leurs effets abrasifs sur les feuilles et les tiges
- Amélioration du substrat avec ajout d'azote ou de matière organique

IV.2. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol à Gram négatif non sporulant, aérobies de 1,2 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 0,9 µm de largeur, contiennent souvent des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien par deux à six flagelles péritriches (Cheriet, 2016).

Ces bactéries sont nodulatrices de légumineuses, appartenant aux α-protéobactéries, qui enrichissent le sol en fixant le (N₂) atmosphérique et qui ont donc une grande importance écologique. Leur application comme bioinoculants en agriculture est suivie depuis des décennies. Ils réduisent les besoins en engrais chimiques azotés et améliorent la productivité des légumineuses dans les champs.

L'inoculation rhizobienne, en plus d'entraîner une nodulation et une fixation d'azote accru, déclenche la production de sidérophores, de phytohormones et de HCN. De plus, il aide à la solubilisation du phosphate et à l'absorption de P et N (Alexandre et al, 2017).

La catégorisation actuelle des rhizobia est basée sur les séquences ADNr 16S ; les bactéries nodulant les légumineuses actuellement décrites appartiennent à trois sous-classes principales phylogénétiquement différentes : α, β et γ-Proteobacteria (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Peix et al. 2015)

Ces rhizobia sont groupés en : 11 genres qui appartiennent tous à l'ordre Rhizobiales de la sous-classe α-Proteobacteria ; deux genres, *Burkholderiales* et *Cupriavidus*, appartiennent à la sous-classe β-Proteobacteria sont groupés dans l'ordre des *Burkholderiales*, et le genre *Pseudomonas* qui appartient à l'ordre *Pseudomonales* dans la sous-classe γ-Proteobacteria (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

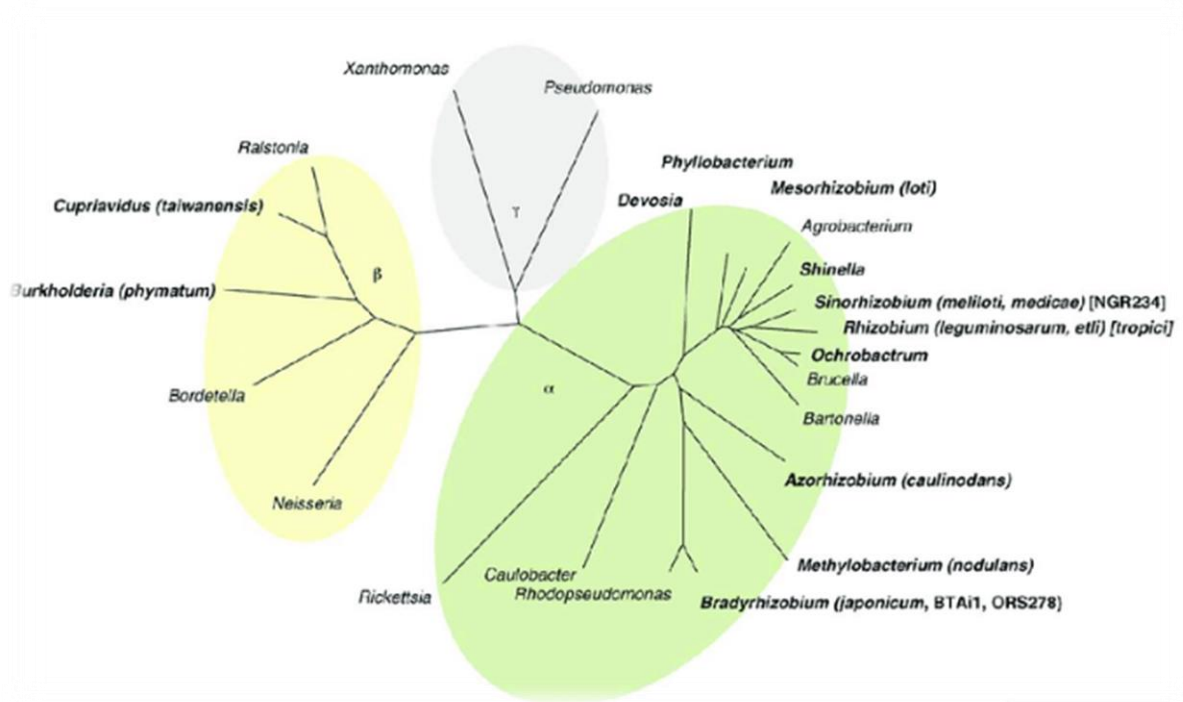


Figure 3 : Arbre phylogénétique de séquences d'ADNr 16S provenant d' α -, β -et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et al., 2009).

V. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums – légumineuses

Plusieurs conditions de l'environnement sont considérées comme étant des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobia légumineuses. Le processus de la fixation de N_2 est fortement lié à l'état physiologique de la plante hôte, Ces facteurs comprennent :

V.1. Stress hydrique

La sécheresse ou la déshydratation est le principal facteur abiotique qui réduit les rendements agricoles. Les réponses des plantes à de tels impacts s'adapteront au stress par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires. Il a un effet très prononcé sur la quantité d'azote fixé, car la fonction nodulaire est plus sensible à cette limitation que le métabolisme général des racines et des pousses. Les principales conséquences de la sécheresse sont des déséquilibres métaboliques et osmotiques chez les plantes, suivis de l'expression de la croissance

Chapitre I : synthèse bibliographique

cellulaire et d'une photosynthèse insuffisante en raison d'un dioxyde de carbone limité en raison de la fermeture du substrat.

V.2. Stress thermique

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

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans le processus d'infection des poils racinaires. Elle peut également affecter la survie des rhizobiums dans le sol, ainsi que la nodulation et la fixation de l'azote (Graham et Vance 2003).

V.3. Stress salin

La salinité affecte le processus d'infection (Paye et Kapay 2006), le développement et le fonctionnement des nodules (Rae et *al* 2002). En première lieu l'activité des nodules est plus sensible au stress salin que la nodulation (Payakapong et *al* 2006).

La réduction de l'activité de fixation d'azote consiste à :

- Respiration réduite.
- Déformation de la structure nodulaire.
- Activité photosynthétique réduite.

V.4. PH

Le pH extrême affecte les deux (rhizobium et légumineuses). Cependant, selon (Fitouri, 2011), la plupart des légumineuses nécessitent un pH neutre ou légèrement acide pour une symbiose efficace.

La solubilité des éléments minéraux et les troubles dans la nutrition minérale sont causées par une acidité élevée du sol, qui affecte le développement de la plante hôte d'une part et l'efficacité des rhizobiums provoquant la réduction de la nodulation d'autre part (Munns, 1977).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel biologique

Dans ce travail, nous avons utilisé trois souches bactériennes endosymbiotes de *Retama* sp des régions arides d'Algérie, l'analyse génotypique confirme leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*. Deux souches de références *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan et al., 1982) et *Bradyrhizobium algeriense* (Ahnia et al., 2018) ont été prises à titre comparatif dans ce travail. Ces souches étudiées appartiennent à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Pour une analyse phénotypique, considérée comme une contribution à l'étude des bactéries endosymbiotiques d'intérêt environnemental.

II. Méthodes

II.1. Caractérisation phénotypique des souches de *Retama* sp

Différents tests phénotypiques ont été effectués sur toutes les souches étudiées (Caractérisation culturelle, caractérisation morphologique suivis des tests physiologiques et biochimiques).

II.1. 1. Morphologie des colonies

Pour étudier les caractéristiques morphologiques des colonies par leur forme, Taille, couleur, opacité et production Exopolysaccharides (EPS). Cette description est faite pour des colonies obtenues sur milieu de culture YMA (Annexes I) après 10 jours d'incubation à 28 °C (Figure 4).

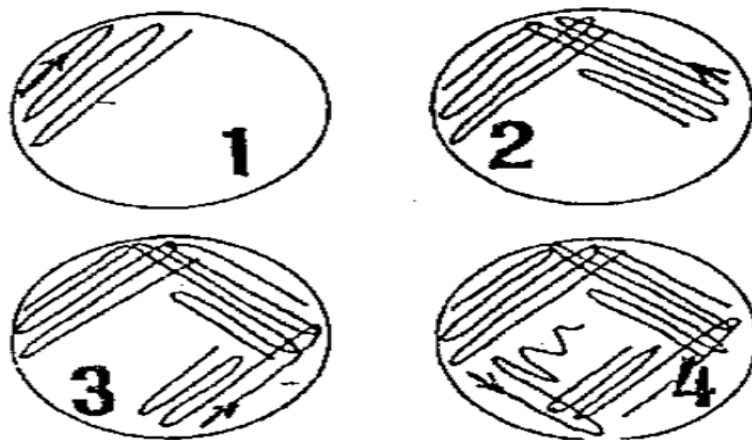


Figure 4 : Ensemencement : technique des cadrans (Vincent, 1970)

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1.2. Caractérisation culturelle des souches

L'examen des souches à l'état frais révèle leur forme ainsi que leur mobilité. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I), nous avons pris une suspension bactérienne, nous l'avons appliquée sur une lame, et observé sous microscope optique au Grossissement 10*40 (Figure 5).

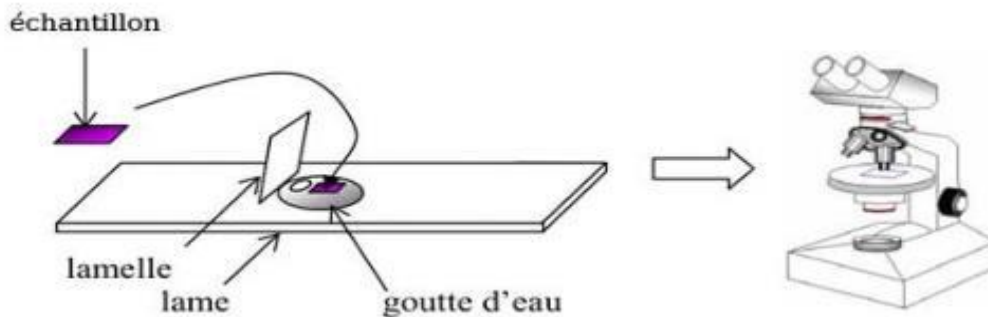


Figure 5 : méthodes d'examen à l'état frais des souches étudiées.

• Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram-négatives, qui apparaissent comme des roses, et les bactéries Gram-positives, qui apparaissent comme des violets. Cette différence de couleur est causée par des différences dans la nature de la paroi bactérienne. Elle peut renseigner sur : le type Gram + ou Gram -.

La technique consiste à :

- Préparer un frottis sur lame de verre.
- Fixer un frottis à la chaleur.
- Recouvrir la lame par un colorant basique (le violet de gentiane) et laisser agir pendant 1minute.
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes.
- Décolorer la lame par l'éthanol à 95° en laissant tomber goutte à goutte l'alcool.
- Laver soigneusement avec l'eau pour arrêter l'action de l'alcool.
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1minute.
- Laver à l'eau distillée.
- Egoutter la lame sur du papier absorbant.

Chapitre II : Matériel et méthodes

- Observer sous microscope optique (Grossissement $10^* 100$) en ajoutant une goutte d'huile immersion.

II.1.3. Caractérisation physiologique

Plusieurs conditions environnementales peuvent affecter la population bactérienne dans le sol. Parmi ceux-ci, on peut citer le pH (acidité et alcalinité), la température (effet profond sur la multiplication bactérienne et le métabolisme), le NaCl (stress salin) sur le développement des souches de référence (*B. algeriense*, *B. japonicum*) et des souches de *Retama* sp. Chaque test a été répété trois fois.

II.1.3. 1.L'effet de pH

A été étudié dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu YMB (Annexes I) avec différentes valeurs de pH : 4/5/6/7/8/9. Après 10 jours d'incubation à 28°C, l'évaluation de la croissance est effectuée par une mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde $\lambda=600\text{nm}$, en utilisant le spectrophotomètre.

II.1.3.2. Effet de la température(T°C)

Afin de déterminer les températures optimales et maximales de croissance bactérienne, des tubes contenant 10ml de milieu YMB (Annexes I) incubés à différentes températures (20°C ; 26°C ; 28°C ; 30°C ; 32°C ; 34°C et 37°C) pendant 10 jours. La croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique (DO) à $\lambda=600\text{nm}$.

II.1.3.3. Effet du Chlorure de Sodium (NaCl)

Pour connaître la tolérance des souches au chlorure de sodium (Na Cl), a été étudié dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu YMB (Annexes I) avec différentes valeurs de Na Cl : (0mM ; 100mM ; 200mM ; 300mM et 400mM). Après 10 jours d'incubation à 28°C, l'évaluation de la croissance est effectuée par une mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde $\lambda=600\text{nm}$, en utilisant le spectrophotomètre

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.2. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

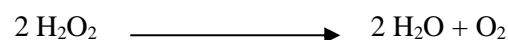
II.2. 1. Type respiratoire

Cette opération est réalisée à l'aide d'un milieu de type viande -foie-agar(VF). Des tubes très fins (9X18 mm) contenant du VF ont été inoculés à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et chargée. La pipette a été insérée au fond du tube et déplacée vers le haut dans un mouvement en spirale. Après 48 heures d'incubation à 28°C, le type respiratoire des souches est déterminé par la position de la zone de croissance.

- **Type aérobic strict** : culture seulement en présence de di-oxygène donc croissance uniquement en surface ;
- **Type aéro-anaérobic** : culture en présence et en absence de di-oxygène donc croissance sur la longueur du tube ;
- **Type anaérobic strict** : culture uniquement en l'absence de di-oxygène (croissance au fond du tube) ;
- **Type micro-aérophile** : culture seulement dans une zone de pression faible en di-oxygène.

II.2. 2. Test de la catalase

Elle consiste à déposer quelques colonies issues d'une culture pure au centre de la lame et à ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée(H₂O₂) à 10% de concentration. Une souche de catalase positive se caractérise par une effervescence, comme en témoigne la réaction suivante :



II.2.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou acidifier le milieu YEM a été évaluée par l'ajout de l'indicateur coloré bromophénol bleu à une concentration de 0,0025% (w/v). Les boîtes inoculées ont été placées dans un incubateur à 28°C. Le changement de couleur de milieu a permis d'identifier les réactions. Une couleur jaune indique une réaction acide, tandis qu'une couleur bleue foncé indique une réaction basique.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.2.4. Recherche de la β -galactosidase et β -galactoperméase

Le test ONPG permet de rechercher directement la présence de l'enzyme β -galactosidase qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose en apportant à la bactérie son substrat o-phényl β -D galactopyranoside. A partir de colonies isolées de chaque souche à tester, une suspension dense a été réalisée dans de l'eau distillée stérile en tube à hémolyse, après homogénéisation de la suspension un disque ONPG (9 mm, 1,2 mg/disque) au fond du tube contenant la suspension. Des lectures se font après 15 minutes, 30 minutes, 1 heure et 24 heures, si nécessaire. Le virage du milieu de au jaune révèle un résultat positif.

II.2.5. Production d'indole

Le milieu utilisé pour ce test est l'eau péptonée exempte d'indole. Cette substance riche en tryptophane permet la détection de l'enzyme tryptophane-désaminase qui dégrade le tryptophane en indole. Les tubes sontensemencés avec 100 μ l d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB. Après incubation à 28°C, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées. La réaction est immédiate par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

II.2.6. Test acide-indole-pyruvique

Les souches testées sont mises en culture dans des tubes à essai contenant 5ml de milieu eau péptonée exempte d'indole. Après incubation à 28°C, une petite quantité de ces suspensions bactériennes est transférée dans des tubes d'hémolyse. La lecture se fait après ajout de deux gouttes de réactif TDA sous agitation.

- La coloration brun rouge avec présence fréquente d'un précipité indique un résultat TDA⁺
- La coloration jaune orangé indique que la souche est TDA⁻

II.2.7. Utilisation du citrate

Un milieu de citrate Simmons incliné a été utilisé pour démontrer l'utilisation de citrate et la présence d'une citrate perméase et hydrolase. La pente du milieu a étéensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture prélevée sur milieu YMB (Annexes I). Après incubation à 28°C, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu et l'apparition d'une couleur bleue du milieu.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.2. 8. Hydrolyse de l'urée

Pour chaque souche, 10 µl de la préculture fraîchement préparée dans le milieu YMA (Annexes I) ont été utilisés pour ensemer 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. Pour chaque souche, trois répétitions ont été effectuées. 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.2.9. Réduction des nitrates

L'étude de réduction des nitrates est réalisée sur bouillon nitraté. Après ensemencement de ce bouillon on incube à 28°C. Une fois les 7 jours écoulés, L'étude de la réduction des nitrates est faite sur le bouillon, on additionne le réactif de Griess NRI (acide sulfanilique) et NRII (αnaphtylamine).

- La coloration rouge cerise représente la transformation des nitrates en nitrites par la nitrate réductase (NR+).
- L'absence de la coloration n'indique pas une réaction négative, une pincée de poudre de zinc est ajoutée comme réducteur de nitrate. 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⁺⁺).

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Caractérisation phénotypique des souches de *Retama sp*

Les différents tests phénotypiques ont été réalisés sur l'ensemble des souches à caractériser en comparaison avec les deux souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium*.

III.1.1. Morphologie des colonies

L'apparition des colonies après 8 à 10 jours d'incubation à 28°C sur milieu YMA (Annexes I), indiquant une croissance bactérienne lente qui est une caractéristique des bactéries du genre *Bradyrhizobium* (Moreira 1993). Elles ont un aspect lisse, circulaire, de taille variable de 1 à 2mm de diamètre, à contour régulier, de couleur blanche. Elles sont translucides ou opaques. Certaines souches présentent des Exopolysaccharides comme les souches S1, *B. japonicum*.

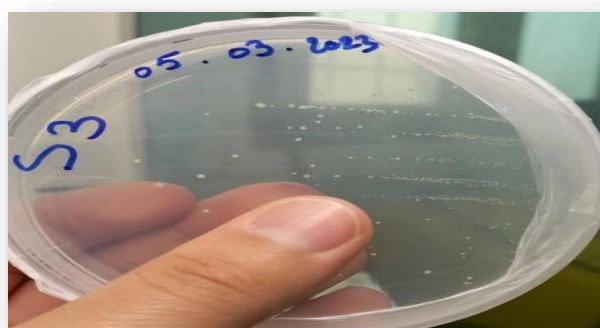
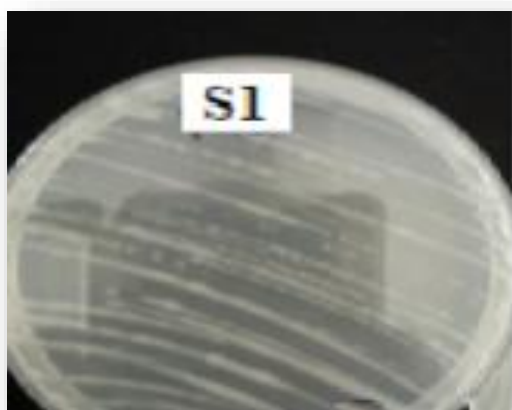


Figure 6 : Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA S1, S2 et S3(photo personnelle 2023)

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 1 : Caractères morphologiques des colonies.

Les souches	EPS	Couleur	Transparence
S1	Présence	Blanche	Opaque
S2	Absence	Blanche	Translucide
S3	Absence	Blanche	Translucide
<i>B. japonicum</i>	Présence	Blanche	Opaque
<i>B. algeriense</i>	Absence	Blanche	Translucide

III.1.2. Caractérisation culturelle des souches

L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions bactériennes a montré que toutes les souches ont une forme de petits bâtonnets à extrémités arrondies et mobiles. Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly β -hydroxybutyrates (PHB) (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram a montré que ces souches appartiennent aux bactéries Gram négatif.



Figure 7 : Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais

(Grossissement 10*40). For me batônnetts et mobiles (photo personnelle2023)



Fugire 8 : Observation microscopique d'un frottis de bactérie gram négatif (Grossissement 10*100).

Coloration rose (photo personnelle2023)

Chapitre III : Résultats et discussion

III.2. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet du pH, de la température et du NaCl sur la croissance des rhizobia isolés des zones arides pendant 10 jours d'incubation à 28°C. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des trois répétitions pour chaque test.

III.2.1. Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées sont illustrés dans la (figure 6). Les résultats montrent que toutes les souches testées présentent une bonne croissance entre pH 6 et 7. Aucune croissance n'a été observée à pH 9 pour les souches (S1 ; S3 et *B. japonicum*). Ces résultats nous permettent de constater que les souches étudiées préfèrent un pH neutre ou légèrement acide.

En 2006, El hilali a montré que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu' à 9. En outre les travaux d'Appunu et (Dhar,2006) ont montré que l'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie des rhizobia.

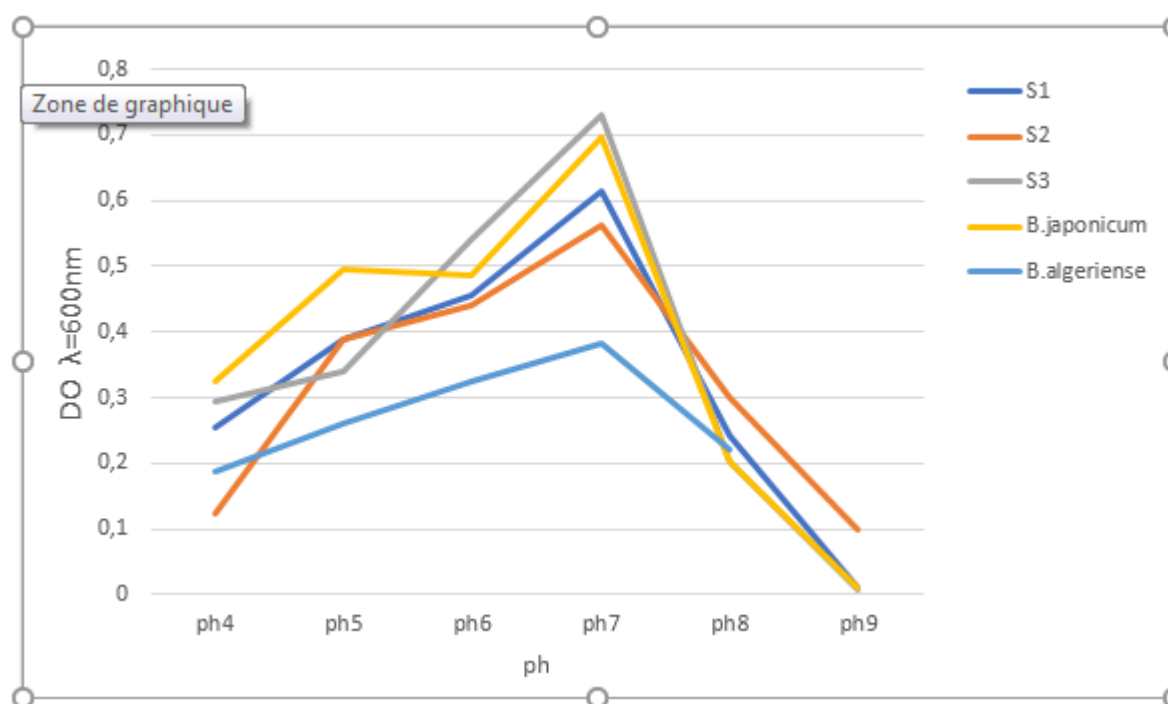


Figure 9 : Effet du pH sur la croissance des souches

Chapitre III : Résultats et discussion

III.2.2. Effet de la température

Les résultats obtenus lors du test de température montrent que toutes les souches y compris les souches de références montrent une croissance entre 26 à 30°C avec un optimum à 28°C pour la plupart des souches. Aucune croissance n'a été remarquée à partir de 32°C pour toutes les souches (Figure 7).

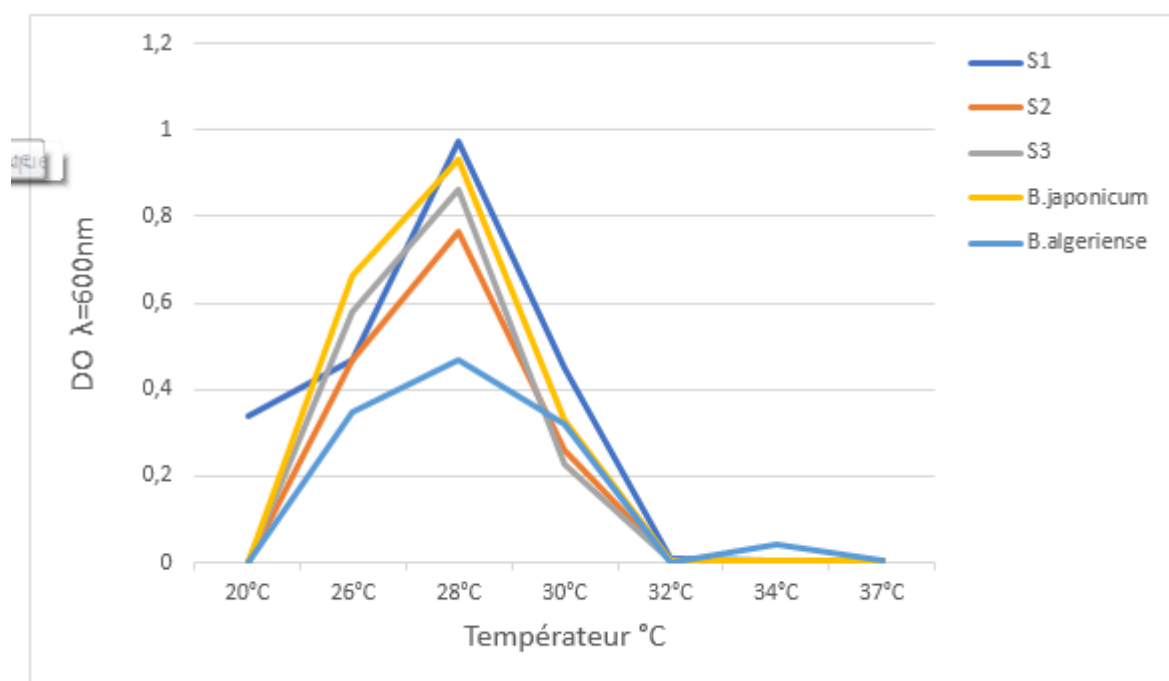


Figure 10 : Effet de la température sur la croissance des souches.

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.2.3. Effet du Na Cl

Les résultats de l'effet du chlorure de sodium sur la croissance des souches de rhizobium sont présentés sur la figure 8. Ces résultats montrent une croissance optimale à 0 mM NaCl, et après cette concentration, la croissance des souches diminue progressivement jusqu'à son absence à 100mM.

Chapitre III : Résultats et discussion

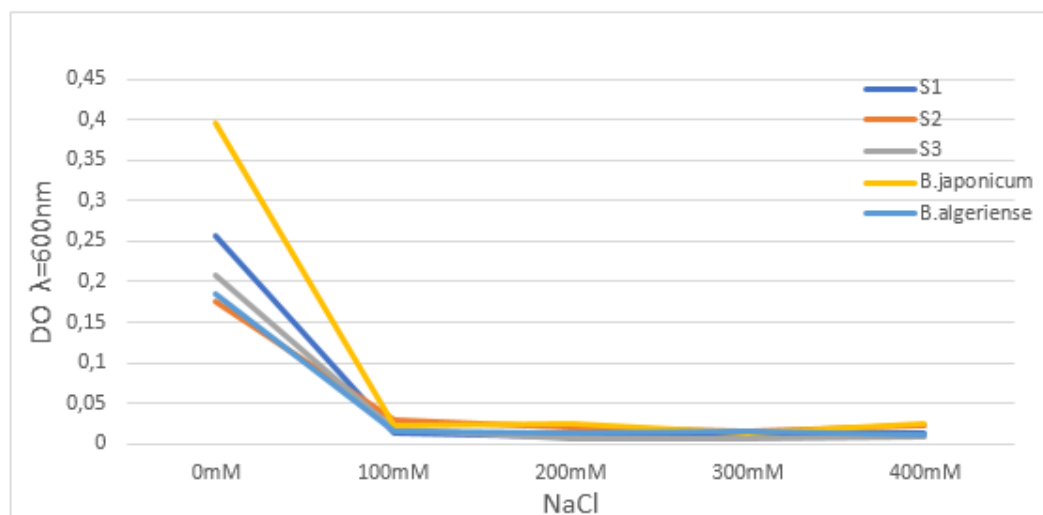


Figure 11 : Effet du Na Cl sur la croissance des souches

Certains travaux ont montré que la tolérance à la salinité chez les rhizobiums varie d'une espèce à une autre (Mandal, 2014).

III.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Des tests biochimiques ont été réalisés sur trois souches du genre *Bradyrhizobium* isolées de *Retama* sp, ainsi que sur deux souches de références. La culture de toutes les souches sur milieu viande foie montre une croissance superficielle et l'absence de croissance tout au long de la pique centrale, les résultats montrent que toutes les souches sont aérobies avec une catalase.

Le bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue.

Dans notre cas toutes les souches testées alcalinisent le milieu à l'exception de la souche S1 qui a acidifié le milieu YMA (Annexes I) additionné de BTB (Photo 4).

Cette alcalinisation du milieu suggère l'appartenance de ces souches au genre *Bradyrhizobium* à croissance lente. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par (Moreira *et al*, 1993).

Chapitre III : Résultats et discussion

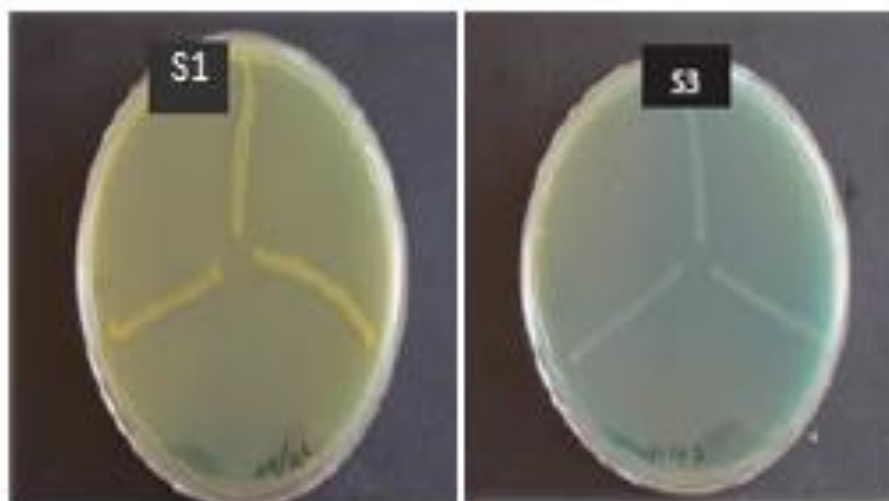


Figure 12 : Résultats de réaction des souche S1 et S3 en milieu YMA+BTB (Photo personnelle2023)

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 (Tableau 2 et Photo 5).

Tableau 2 : 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 S
	Lactose/Saccharose	Glucose	Gaz		
S1	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-



Figure 13 : montrant la réaction négative des souches (exemple S1) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S. (photo personnelle 2023).

Absence d'indole, le tryptophane n'a pas été hydrolysé, absence d'acide indole pyruvique le tryptophane n'a pas été désaminé, et absence d'une citrate hydrolase et perméase. En conclusion toutes les souches testées n'ont pas produit d'indole elles sont donc dites indole⁻, elles ne possèdent pas la tryptophane désaminase elles sont dites TDA⁻, et elles n'ont pas utilisé le citrate comme source de carbone.

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.

Les souches S1 et *B. japonicum* ne présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches S3, S2 et *B. algeriense*, possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

Chapitre III :Résultats et discussion

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 ; Arreseigor et *al*, 1997).

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons réalisé une caractérisation phénotypique de 03 souches isolées à partir de nodules racinaires de *Retama* sp et deux souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium* prises à titre de comparaison.

L'étude de la caractérisation culturale et cellulaire ont montré que les souches isolées sont des colonies blanche, opaques et ont un aspect gluant, les cellules sont des petits bâtonnets, mobiles et à Gram négatif.

Ces souches ont une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum à 28°C. Elle présente une bonne croissance entre pH 6 et pH7. Elles présentent aussi une bonne croissance entre 0mM et 100mM de NaCl.

Les résultats de la caractérisation biochimique montrent que tous les isolats produisent une réaction d'alcalinisation à l'exception de la souche S1 qui montre une réaction d'acidification. Concernant le test de la fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S, les isolats testés ont révélé des résultats négatifs. La souche S1 ne présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches S2 et S3 possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

En conclusion, notre étude a permis de caractériser physiologiquement les souches rhizobienne isolées de *Retama* sp. Et de mettre en évidence leur potentiel d'utilisation en agriculture durable dans des régions arides et semi-arides.

Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur l'utilisation des rhizobiums comme alternative aux engrais chimiques dans l'agriculture, avec des implications potentielles pour la durabilité environnementale et économique.

*Références
bibliographiques*

A

Ahnia,h.(2018), étude polyphasée et génomique des bactéries isolées de nodule racinaire de *Retama* sp. In thèse université de Bejaia.

Allen, O.N. et Allen, E.K. (1981). The Leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison

B

Berrada, H.; Benbrahim, K.F. (2014). Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives.

Boddy, R.M; Peoples, M. B, Palmer, B., Dart P J. (2000). The use of N natural abundance.

Broughton, W.J. (1984). Nitrogen fixation: Legumes. The Journal of Chartto and Windus 2Td londress.117.

C

Chen, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., et Li, Y. (1995) Characterisatics of rhizobium tianshanense sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acide saline environment in X ingjiang. Poepl's Republic of china Int. J. Syst.Bacterio., 45: 153-159.

CHERIET D. (2016). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre Hedysarum. Mémoire de Magister.

D

Daniel J.Y., Brahic A., Hoffert M., Schaff A. et Tardy M., (1999) . Sciences de la Terre et de l'Univers. Vuibert, Paris, 634p.

Davidson, I. A., and M. J. Robson. (1986). Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N2 fixation, nodulation and growth of white clover. Annal Botny. 57, 331-338.

Références bibliographiques

Domergue., O. (2006). Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens*, une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. École Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la vie et de la terre- France, 33p.

E

Elemerich C. (1993). Fixation de l'azote et interaction bactéries-plantes.

EL-hilali I. 2006. La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de microbiologie et biologie moléculaire. Université V-Agdal, Rabat, P 157.

F

Ferchichi, A. (2006). Diversité des Fabaceae Fourragères et de leurs Symbiotes. Workshop International -Alger- *Academic Publ.* 39: 51-75.

Fitouri dhane S, Ben Jeddi F, Rezgui S, Mhandi R (2011) Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante *de rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium L*) sous déficit hydrique. *J. Appl Biosci* :3642-3651

G

Gibson, KE., Kobayashi, H., Walker, GC. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* 42: 413–441.

Graham P. et C. Vance (2003). Legumes: importance and contraintes to greater use. *Plant physiol.*131,872-877.

Guignard, J.L. Dupont (2005). Botanique systématique moléculaires 12ème Edition ED Masson paris. 290p

H

Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie

De Lille. Edition de boeck. p 99 - 119.

J

Jarvis, B. D. W., T. S. Mc lean, I. G. C. Robertson, and G. R. Fanning. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and Rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 20,42-52.

Jordan, D.C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 (1), 136-139.

M

Mahnane W. 2010. Appréciation de la diversité génétique du genre *Rétama* par les marqueurs biochimiques. Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 64 pages

Mandal HK, (2014). Isolation of salt tolerant strains of rhizobium trifoli. *International Journal of Agriculture and Food technology* 5(4):325-332.

Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J., 2009. Establishing nitrogenfixing Symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17: 458 - 466.

Maxted N et Bennett, S.J. (2001a). Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean.* Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39:1-32.

Maxted, N. et Bennett, S.J. (2001b). Legume diversity in the Mediterranean region. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean.* Maxted N and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39: 51-75.

Moreira F.; M. Gillis, B. Pot; Kersters K.; Franco. A. A. (1993). Characterisation of Rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Sys; Appl. microbiol.* 16: 135-146.

Munns D.N.,1977. Madigan M., Martink J. (2007). Brock Biologie des microorganismes.

Edition : Person Education France. PP, 599-601. cidity and related factors. Bose (Ed). PP, 211-236.

N

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

P

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.

Pedrosa F.O. (1988). Physiology biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated Nitrogen-fixing bacteria. *C.R. Scein*. **6**. pp 345-348.

Peix, A., M. H. Ramírez-Bahena, E. Velázquez et E. J. Bedmar (2015). Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **34**:17–42.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180–201.

Peret Benjamin., 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.

Pujic P., Normand P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et Les plantes actinorhiziennes. *Biofector*. **28. (298)**. Pp 26-29.

R

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.

Raven P. H., Evert R. F. Et Eichlorn S. E. (2000). Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.

Références bibliographiques

Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005). Ecologie. Ed. De Boeck. Paris. 214p

Roger P., 1996. La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le Développement ? Conférence débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.

S

Sebihi, F.Z. (2008). Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de légumineuse fourragère *Hédysarum perrauderianum*. Thèse de Magister. Université de Constantine. Algérie.

T

Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005. Le monde des végétaux organisation, Physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.

V

Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

W

Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287, 3–14.

Z

Zahran H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and Nitrogen Fixation under severe Conditions and in an Arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63.(4),968-989.

Zakhia, F.; Jeder, H.; Domergue, O.; Willems, A.; Cleyet-Marel, J.C.; Gillis, M.; Dreyfus, B. And de Lajudie, P. (2004). Characterisation of wild legumes nodulating bacteria (LNB) in the infrared zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* Pp27 : 143-153.

Annexes

Annexes I

Composition du milieu YMA (Annexes I) (Vincent, 1970)

Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.1g
Agar	15g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.1g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Annexes II

La moyennes des différents tests effectués

Tableau 3 : La moyenne des DO obtenue aux différentes températures

Souches	20°C	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
S1	0,339	0,469	0,972	0,450	0,009	0,005	0,004
S2	0,215	0,469	0,765	0,258	0,006	0,003	0,003
S3	0,395	0,579	0,864	0,228	0,005	0,001	0,004
<i>B.japonicum</i>	0,456	0,663	0,934	0,33	0,005	0,004	0,003
<i>B.algeriense</i>	0,256	0,350	0,468	0,319	0,0015	0,044	0,007

Tableau 4 : La moyenne des DO obtenue aux différents pH

Souches	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
S1	0,255	0,388	0,457	0,615	0,243	0,009
S2	0,122	0,389	0,44	0,563	0,301	0,100
S3	0,295	0,339	0,54	0,729	0,201	0,008
<i>B.japonicum</i>	0,325	0,495	0,487	0,698	0,203	0,010
<i>B.algeriense</i>	0,187	0,260	0,323	0,383	0,221	0,111

Tableau 5 : La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl

Souches	0mM	100mM	200mM	300mM	400mM
S1	0,257	0,013	0,009	0,013	0,013
S2	0,175	0,029	0,019	0,015	0,023
S3	0,209	0,018	0,006	0,007	0,008
<i>B. japonicum</i>	0,395	0,023	0,025	0,014	0,025
<i>B.algeriense</i>	0,186	0,016	0,013	0,016	0,011

Résumé

Ce travail a été réalisé sur trois souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de *Retama* sp. Dans le but d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante en présence des souches de référence. La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'avoir des colonies homogènes d'une forme circulaire et des bacilles à Gram négatif. Les tests biochimiques ont évalué par la présence d'une activité enzymatique chez les isolats tels que la nitrate réductase, l'uréase et les tests physiologiques montrent une diversité entre les souches. La caractérisation cellulaire, culturelle et biochimique répond aux critères fondamentaux des Bactéries Nodulant les légumineuses (BNL).

Mots clés : *Retama* sp, phénotypique, Gram négatif, tests physiologiques.

Abstract

This work was carried out on three bacterial strains isolated from the root nodules of *Retama* sp. To assess and characterize the existing phenotypic diversity in the presence of reference strains. The characterization of the strains involves a morphological study that allowed us to have homogeneous colonies of a circular shape and Gram negative bacilli. Biochemical tests evaluated by the presence of enzyme activity in isolates such as nitrate reductase, urease and physiological tests show a diversity between strains. Cellular, cultural and biochemical characterization meets the basic criteria of Bacteria Nodulant legumes (BNL).

Keywords: *Retama* sp, phenotypic, gram negative, physiological tests.

ملخص

تم تنفيذ هذا العمل على ثلاث سلالات بكتيرية معزولة عن العقيدات الجذرية لـ *Retama* sp. لتقييم وتوصيف التنوع الظاهري الحالي في وجود سلالات مرجعية. يتضمن توصيف السلالات دراسة مورفولوجية سمحت لنا بالحصول على مستعمرات متجانسة ذات شكل دائري وعصيات سلبية جرام. تُظهر الاختبارات الكيميائية الحيوية التي تم تقييمها من خلال وجود نشاط الإنزيم في عزلات مثل اختزال النترات واليوريا والاختبارات الفسيولوجية تنوعاً بين السلالات. يلبي التوصيف الخلوي والثقافي والكيميائي الحيوي بالمعايير الأساسية للبقوليات العقيدية (BNL).

الكلمات المفتاحية : *Retama* sp ، نمط ظاهري، سلبية جرام، اختبارات فسيولوجية.