

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERSCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

Faculté : *sciences*

Département : *SNV*

N° :



Domaine : *SNV*

Filière : *Biotechnologie*

Option : *Biotechnologie végétale*

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : KRIM Imane

Intitulé

Contribution à l'étude des isolats d'une légumineuse
spontanée à intérêt environnemental

Soutenu devant le jury composé de :

BOUNAR Rabah	Professeur	UMB-Msila	Président
AHNIA Hadjira	MCB	UMB-Msila	Encadreur
ARAB Radhia	MCA	UMB-Msila	Examinatrice

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Celui qui ne remercie pas les gens ne remercie pas Dieu.

Nous exprimons nos sincères remerciements, notre appréciation, notre gratitude

*A mon enseignante **M^{me} AHNIA Hadjira**. Celle qui m'a soutenu tout au long de ce*

travail par ses précieux conseils et orientations.

*Je tiens à remercier les membres du comité de discussion, **Mr BOUNAR Rabah** et*

***M^{me} ARAB Radhia** qui ont accepté d'évaluer ce travail.*

J'adresse également mes remerciements à tous les éminents enseignants qui m'ont

aidée de près ou de loin, ainsi qu'à tous mes collègues.

Nous demandons à Dieu de nous aider.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes très chers **parents**, qui sont la lumière de mes yeux, qui ont beaucoup sacrifié*

pour assurer ma réussite dans mes études que Dieu leur procure bonne santé et

longue vie.

*A mes aimables sœurs **Souad** et **Bouchra** pour leurs encouragements et soutien*

moral

*A mes chers frères **Zin eddine** et **Saif eddine** en qui j'ai trouvé aide et soutien*

*A mon fiancé **Messaoud** qui m'a soutenue durant cette période de travail*

*A **maryouma** et **nouh***

A tous mes amis qui ont toujours été prêts pour leurs conseils et leur aide, en

*particulier **Linda**, **Hassiba**, **Houria** et **kheira***

*Et à toute la famille **Krim** et **laali**.*

Liste des tableaux

[Tableau 1]: Caractérisation morphologique des colonies.....	16
[Tableau2] : La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl	II
[Tableau3] : La moyenne des DO obtenue aux différents Ph	II
[Tableau4] : Code numérique).....	III
[Tableau5] : Matrice des caractères phénotypiques codés, pour une analyse ascendante hiérarchique (CAH).....	IV

Liste des figures

[Figure 1]: Cycle de l'azote	2
[Figure 2]: <i>Cytisus linifolius</i>	6
[Figure 3]: Préparation des cultures bactériennes dans le milieu YMA (Photo originale)	10
[Figure 4]: Observation des souches étudiées à l'état frais.....	11
[Figure 5]: Préparation de cultures bactériennes avec différentes concentrations	12
[Figure 6]: Préparation de cultures bactériennes avec différents pH en milieu YMB (Photo originale)	12
[Figure 7]: Aspect des colonies, exemple des souches S1 et S2, obtenues sur milieu YMA (Photo originale).....	16
[Figure 8]: Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 10*100). Coloration rose	17
[Figure 9]: Effet du NaCl sur les souches étudiées	17
[Figure 10]: Effet du pH sur les souches étudiées.....	18
[Figure 11]: Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données (originale).....	20

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Fixation d'azote	2
I.1.1. Fixation biologique	2
I.1.2-fixation industrielle	3
I.2. <i>Rhizobiums</i>	3
I.2.1. Caractéristique des rhizobiums	3
1.2.1.1. Caractéristique biochimique	4
1.2.1.3. Caractéristique physiologiques	4
1.2.1.3. Caractéristique moléculaire des rhizobiums	4
I.2.2. Classification des rhizobiums	4
I.2.3. <i>Bradyrhizobium</i>	5
I.3. Légumineuses	5
I.3.1. Taxonomie des légumineuses	5
I.3.2. Genre <i>Cytisus linifolius</i>	6
I.3.3. Intérêt des légumineuses	7
1.3.3.1. Intérêt environnemental.....	7
1.3.3.2. Intérêt alimentaire.....	7
1.3.3.3. Intérêt médical.....	7
I.4. Symbiose rhizobium-légumineuse	8
I.5. Facteurs influençant la symbiose rhizobium-légumineuse	8
I.5.1. PH du sol.....	8
I.5.2. Stress salin.....	8
I.5.3. Stress hydrique.....	9
I.5.4. Stress thermique.....	9
I.5.5. Métaux lourds	9

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel biologique	10
II.2. Méthodes	10
II.2.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de <i>Cytisus linifolius</i>	10
II.2.1.1. Caractérisation culturelle des souches	10

II.2.1.2. Morphologie des bactéries	10
II.2.1.3. Caractérisation physiologique.....	12
II.2.2. Caractérisation biochimique	13
II.2.2.1. Type respiratoire	13
II.2.2.2. Test de la catalase	13
II.2.2.3. Test du bleu de bromothymol (BTB).....	13
II.2.2.4. Recherche de la β -galactosidase et β -galactoperméase.....	13
II.2.2.5. Production d'indole.....	14
II.2.2.6. Test acide-indole-pyruvique	14
II.2.2.7. Utilisation du citrate.....	14
II.2.2.8. Hydrolyse de l'urée.....	14
II.2.2.9. Réduction des nitrates	15
II.2.3. Analyse numérique	15

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de <i>Cytisus linifolius</i>	16
III.1.1. Caractérisation culturale des souches	16
III.1.3. Caractérisation physiologique	17
III.1.3.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne	17
III.2. Caractérisation biochimique	19
Conclusion	22
Références bibliographiques	23
Annexes	I

Introduction

Introduction

L'azote est un élément essentiel à la survie des organismes vivants, c'est l'élément chimique le plus abondant dans l'atmosphère sous forme de N₂ (**Robert et al., 2005**) Sous forme organique ou minérale dans le sol, il est le facteur principal de la croissance des plantes, il est donc considéré comme un facteur de production agricole (**Duc et al., 2010**).

Les légumineuses sont la famille la plus diverses et jouent un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration des sols (**Ndoy, 1999**), Il réduit la pauvreté des sols, et il coexiste également avec les micro-organismes rhizobiums, en formant des nœuds dans les racines des légumineuses, qui à leur tour sont le siège de la fixation de l'azote. L'efficacité des légumineuses réside dans la restauration des sols, grâce à leur symbiose avec les rhizobiums (**Graham et Vance, 2003, Chen et al., 1995**).

Le rhizobium est important en foresterie et en agriculture en raison de sa capacité à coexister avec les légumineuses et peut améliorer la fertilité du sol. Les bactéries fixent l'azote dans l'atmosphère et l'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est réciproque : les bactéries fournissent de l'azote à la plante et la plante fournit du carbone aux bactéries (**Pellerin et al., 2014**).

Il existe bien des facteurs perturbateurs de la coexistence des légumineuses et des rhizobiums tels que la température élevée, le stress hydrique et l'acidité, (**Suhéman et al., 2013**).

Cette recherche se compose de trois chapitres : dont le premier est une compilation bibliographique qui présente des généralités sur chacun (légumineuses et rhizobiums), suivi du chapitre Matériels et méthodes, et dans le dernier chapitre nous allons présenter les résultats obtenus.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Fixation d'azote

L'azote atmosphérique représente plus de 78% du volume d'air, c'est un gaz incolore et inodore (**Hopkins, 2003**). La quantité d'azote absorbée par les plantes est faible, l'azote est un facteur de croissance en plus de l'eau (**Cleland et Harpole, 2010**).

L'azote est nécessaire à la vie, car sa quantité dans la construction des plantes est de 7% ou plus que le pourcentage de matière sèche dans la période végétative. (**Tourte et al., 2005**).

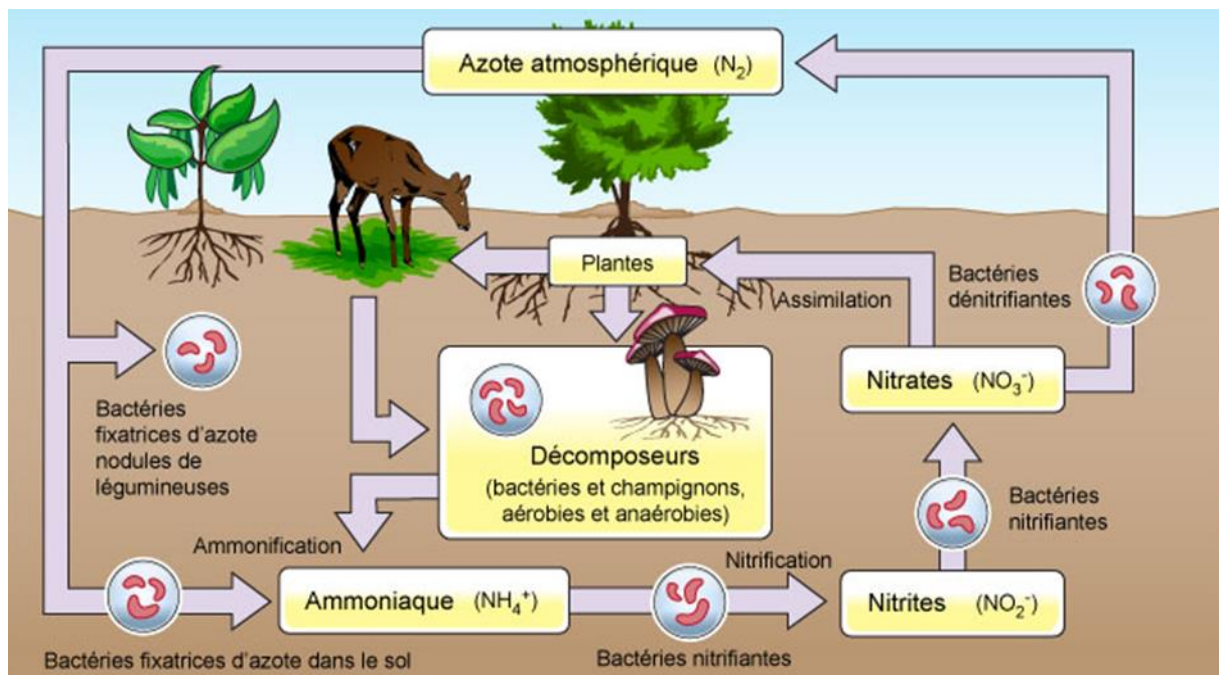


Figure1: Cycle de l'azote (**Utinam, 2021**)

I.1.1. Fixation biologique

La fixation biologique de l'azote est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique (**Roger, 1996**).

Bien que l'azote soit abondant dans l'atmosphère terrestre sous forme de l'azote diatomique, cet azote ne peut être utilisé de cette manière qu'après l'avoir reformé par des microorganismes (**Masepohl et Hallenbeck, 2010**). D'une la décomposition de l'azote par une enzyme spécialisée appelée nitrogénase, qui agit pour catalyser la réduction de l'azote en ammoniac (**Mahboub, 2018**).



I.1.2-fixation industrielle

La fixation industrielle d'azote utilise le procédé Haber-Bosch pour briser le lien dans le diazote et le convertir en ammoniac :



Nécessite environ 450 et 500 bar et l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté. Ainsi, environ 10 à 40 millions de tonnes. Ce procédé est considéré comme très utile pour nourrir la population mondiale car le manque de production d'engrais industriels conduit à un danger (**Peret, 2007**).

I.2.Rhizobiums

Les rhizobiums connues sous le nom de bactéries fixatrices d'azote (Jordan.1984), ils sont définis sur la base de ses caractéristiques phénotypiques ou ce qu'on appelle la morphologie des colonies (**Lorenzo et al., 1993**). Les rhizobiums jouent un rôle clé dans la fixation de l'azote présent dans l'atmosphère pour coexister avec les légumineuses par la formation de nodules, ces nodules se forment au niveau des racines souvent ou rarement au niveau des tiges des plantes. Ces bactéries sont complètement aérobies, Gram-négatives (**Boukechab et al., 2017**).

Lacroissance de ces bactéries se fait sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), (Vincent, 1970). De nombreux facteurs ont un effet sur la survie des racines tels que le pH et la température du sol, l'excès de minéraux, la teneur en argile, la salinité du sol et autres (**Howieson et Ballard, 2004 ; Parissi et al., 2016**). Le milieu optimal pour la croissance de ces bactéries (rhizobiums) est entre 25 °C et 30 °C et le pH de 6-7 (**Somasegaran et al., 1994**) Où ces bactéries prennent la forme de bacilles de 0,64 µm à 0,94 µm de largeur et d'environ 3 µm de longueur (**Boukechab et al., 2017**).

I.2.1. Caractéristique des rhizobiums

Les rhizobiums ne présentent aucune caractéristique culturelle, morphologique, physiologique ou biochimique permettant de les distinguer des autres bactéries telluriques.

Seule la capacité d'induire la formation de nodules racinaires chez la plante hôte, constitue-lecritère absolue pour leur reconnaissance ainsi que leur classification (Elkan, 1992, Pieterneel et Vanderleydn, 1995).

1.2.1.1. Caractéristique biochimique

Les rhizobia utilisent des glucides simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Et aussi certaines vitamines qui l'aident à se développer et ces bactéries sont autotrophes (Somasegaran et Hoben, 1994).

1.2.1.3. Caractéristique physiologiques

Le rhizobium est un microorganisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm) (Somasegaran et Hoben, 1994).

1.2.1.3. Caractéristique moléculaire des rhizobiums

Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier (Squartini et al., 2002).

I.2.2. Classification des rhizobiums

Actuellement les rhizobia sont repartis en 13 genres et 481 espèces :

- *Rhizobium* qui contient 111 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 46 espèces
- *Ensifer (formerlySinorhizobium)* contient 21 espèces.
- *Bradyrhizobium* contient 38 espèces.
- *Burkholderia* contient 120 espèces.
- *Azorhizobium* contient 3 espèces.
- *Microvirga* contient 16 espèces.
- *Phyllobacterium* contient 11 espèces.
- *Ochrobactrum* contient 18 espèces.
- *Methylobactérieum* contient 52 espèces.
- *Cupriavidus* contient 16 espèces.

- *Devosia* qui contient 22 espèces.
- *Shinella* qui contient 7 espèces.

I.2.3. *Bradyrhizobium*

La plupart des souches du genre *Bradyrhizobium* se distinguent par des voies génétiques, génomiques et phénotypiques. Les souches sont identiques dans la séquence génétique d'ARN constituée de 16 souches identiques à 99,9% (**Journal, 2014**).

En tant que genre *Bradyrhizobium*, et grâce à des études et des résultats, il a été constaté qu'il contient deux espèces du genre *Bradyrhizobium icensesp* et *Bradyrhizobium paxlloerisp*. Bien qu'il existe des séquences génomiques identiques d'ARN dans 16S, *phasoluslunatus* peut être divisé en deux parties par analyse de la séquence du génome. Les séquences du génome ont été obtenues pour le représentant de chaque clade et comparées aux génomes d'espèces étroitement apparentées du genre *Bradyrhizobium* nucléotide moyen Des valeurs inférieures au seuil ont été obtenues à Comparaison entre les deux (**Journal, 2014**).

I.3. Légumineuses

Les légumineuses ou fabacées, constituent la troisième plus grande famille botanique avec environ 750 genres et plus de 19000 espèces (**Prin et al., 2017**). De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales, et aussi de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle), bois (palissandre), aliments (soja, haricot, arachides) (**Saoudi, 2008**). Ces familles se trouvent dans les régions froides et les régions tropicales (**Graham et Vance, 2003**).

Environ 88% de toutes les légumineuses étudiées dans leur interaction avec les racines forment des nodules et ces nodules fixent l'azote (**Faria et al., 1989 ; Hirsch et al., 2001**).

I.3.1. Taxonomie des légumineuses

Selon **Quezel et Santa, (1962)**, la famille des *Fabaceae* (légumineuses) est classée comme suit :

Règne : Eucaryote

Sous règne : Végétaux (phanérogames)

Phylum : Planta

Embranchement : Spermaphytes (plantes à graines)

Sous embranchement : Angiosperme

Classe : Dicotylédones

Ordre : Fabales

Sous classe : Rosidae

Famille : Leguminosae.

I.3.2. Genre *Cytisus linifolius*

Ce sont des arbres ou des arbustes trouvés en abondance dans les régions méditerranéennes, l'Afrique du Nord et du Sud, l'Europe occidentale et centrale et la Turquie (Andriam-parany et al., 2014). Ses fleurs sont nombreuses, apparaissent avec des feuilles jaunes à trois feuilles, et six types ont été identifiés : *C. purgans*, *C. linifolius*, *C. fontanesii*, *C. villosus*, *C. monspessulanus*, *C. arboreus* (Quezel et santa 1962).

Cytisus linifolius : Ce sont des arbustes de 0,20 à 4 mètres de haut avec des branches allongées, de petites branches couvertes de poils, des feuilles oblongues-oblongues, leurs marges au sommet sont légèrement convexes et en zigzag au bas, leurs fleurs sont toutes rassemblées dans les têtes, et les oreillers sont près de la coupe, la coupe est longue d'un mois, ratatinée, tubulaire allongée, à lèvres séparées, ses fleurs sont jaunes.



Figure I2: *Cytisus linifolius*

I.3.3. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses occupent une place importante dans de nombreux domaines aussi divers que la physiologie, la phytopathologie, l'entomologie et l'agriculture (**Baudoin et al., 2001**).

1.3.3.1. Intérêt environnemental

Les légumineuses fertilisent le sol et fournissent une végétation abondante (**Lograda et al., 2009**). Il empêche l'empiétement des dunes de sable et les brise-vent (**Ferry et al., 1990**). Il contribue également à réduire les émissions de gaz à effet de serre et à réduire l'utilisation d'engrais azotés, qui contribuent à l'émission de CO₂ et de N₂O (**Rispail et al., 2010**).

Retama spherocarpa contribue à l'enrichissement des sols et à l'abondance de la végétation dans les régions arides et semi-arides grâce à des associations symbiotiques avec les rhizobiums (**Boulila et al., 2009**).

1.3.3.2. Intérêt alimentaire

Les légumineuses sont une source importante de protéines et de graisses dans l'alimentation humaine et animale (**Journet et al., 2001**).

1.3.3.3. Intérêt médical

De nombreux médicaments sont extraits des légumineuses. Ces médicaments se trouvent dans des plantes appartenant à des régions arides ou semi-arides (**Chopra et al., 1960**).

Retama est utilisé pour traiter l'hypertension artérielle dans les régions du nord-est de la Libye (**Ishurda et al., 2004**). Il a été utilisé pour traiter les troubles digestifs, rénaux et également contrôler le diabète (**Magherani et al., 2005**).

Retama est utilisé pour traiter les rhumatismes, soigner les piqûres de scorpion et les plaies en Algérie (**Ould el hadj et al., 2003**).

I.4. Symbiose rhizobium-légumineuse

La symbiose entre légumineuses et rhizobiums se fait par interaction et communication avec des signaux moléculaires (**Perret et al., 2000**).

L'interaction a lieu entre les plantes et les bactéries, Le phénomène qui détermine toutes les associations symbiotiques entre légumineuses et bactéries est le résultat d'une interaction entre les légumineuses et les rhizobiums, les légumineuses étant capables de s'associer en symbiose avec un ou plusieurs types de rhizobiums (**Mouhamad, 2016**). Les légumineuses forment des nodules dans les racines où les bactéries se multiplient et se différencient au sein de ces nodules et sont capables de fixer l'azote atmosphérique en ammoniac (**Gibson et al., 2008**). Les légumineuses sont également capables de former des nodules dans les tiges, appelés "nodules caulinaires". (**Giraud et Fleischman, 2004**).

I.5. Facteurs influençant la symbiose rhizobium-légumineuse

I.5.1. PH du sol

Le rhizobium et les légumineuses sont tous deux affectés par le changement de pH. Cependant d'après (**Fitouri, 2011**), les légumineuses nécessitent un pH bas jusqu'à ce qu'une symbiose efficace s'établisse, une acidité élevée entraîne la solubilité des éléments minéraux et des perturbations de la nutrition minérale qui affectent d'une part le développement de la plante hôte et d'autre part l'efficacité des racines entraînant une diminution de la nodulation (**Munns, 1977**).

I.5.2. Stress salin

La salinité affecte l'infection (**Peyakapong, 2006**). Il affecte également à la fois le développement et le fonctionnement des nodules (**Bae et al., 2002**)

Quiconque :

- Diminution de la respiration
- Diminution de l'activité de la photosynthèse
- Déformation de la structure des nœuds

Il réduit l'activité de fixation de l'azote

I.5.3. Stress hydrique

A plusieurs niveaux différents, la fixation symbiotique de l'azote est affectée par le stress hydrique. Formation et croissance nodulaires, métabolisme du carbone et de l'azote, activité de perméabilité à l'azote (**Aguirreola et Sanchez-dgaz, 1989 ; Sadousky, 2005**). La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique dans les légumineuses est sensible à la carence en eau (**Zahran, 1999**).

I.5.4. Stress thermique

Des études ont montré que les températures élevées retardent la nodulation et réduisent l'activité de l'azote. La température élevée affecte la zone racinaire en infectant les racines par des bactéries et en fixant l'azote symbiotique pour les légumineuses (**Zahran, 1999**).

I.5.5. Métaux lourds

Les métaux lourds affectent la croissance des plantes et la fixation de l'azote par les micro-organismes et sont toxiques même en petites quantités (**Gusmão-lima et al., 2005**). Affect la croissance et l'activité microbiennie (**Stan et al., 2011**).

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel biologique

Dans cette étude nous avons caractérisé 3 souches bactériennes isolées de nodules racinaires de *Cytisus linifolius* ainsi que trois souches de référence à titre comparatif, ces souches appartiennent au genre *Bradyrhizobium* et proviennent d'une collection de souches de Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

II.2. Méthodes

II.2.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de *Cytisus linifolius*

Les souches concernées par ces tests sont les S1, S2, S3 ainsi que les souches de références : *B.canariense*, *B.japonicum*, *B.algeriense*. Cette étude concernera la description morphologique, caractérisation physiologique ainsi que quelques caractères biochimiques.

II.2.1.1. Caractérisation culturelle des souches

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

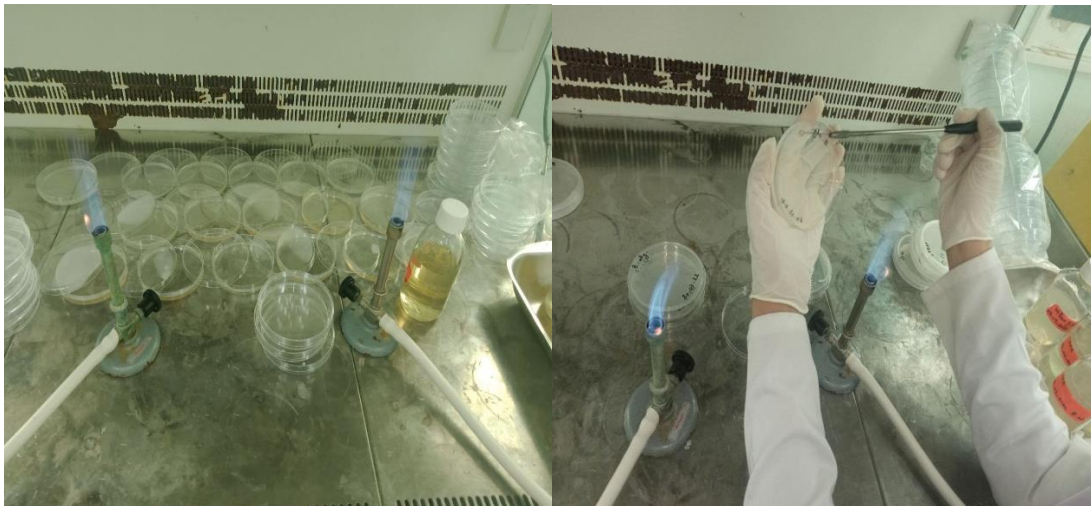


Figure 3: Préparation des cultures bactériennes dans le milieu YMA (Photo originale)

II.2.1.2. Morphologie des bactéries

L'examen à l'état frais des souches permet de mettre en évidence leur forme ainsi que leur mobilité. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I), nous

avons pris une suspension bactérienne, déposé sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10*40 (figure 4).

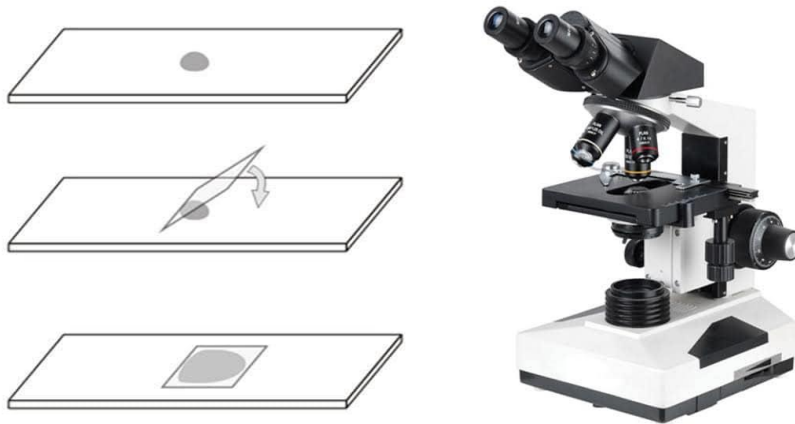


Figure 4: Observation des souches étudiées à l'état frais

Coloration de Gram

Permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle est utile pour distinguer les bactéries dites Gram+ et des bactéries dite Gram – (**Tortora et al., 2003**).

Les grammes ont été testés sur toutes les souches cultivées en milieu YMA et incubées pendant 8 jours à 28°C

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 1' minute ;
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes ;
- Rincer à l'alcool ;
- Laver soigneusement avec l'eau pour arrêter l'action de l'alcool ;
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1 minute ;
- Laver à l'eau distillée ;
- Egoutter la lame sur du papier absorbant ;
- Observer sous microscope optique (Grossissement 10 * 100) en ajoutant une goutte d'huile immersion.

II.2.1.3. Caractérisation physiologique

Afin de caractériser les souches de rhizobia isolés de *Cytisus linifolius*. Nous avons étudié l'effet du pH et du NaCl sur la croissance de ces dernières.

II.2.1.3.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les souches sont cultivées dans des tubes contenant 10ml de milieu YMB additionné de quantités croissante de NaCl (100, 200, 300, 400, 500 mM). La lecture se fait par densité optique (DO) à 620 nm, après incubation à 28°C pendant 10 jours.



Figure 5: Préparation de cultures bactériennes avec différentes concentrations

II.2.1.3.2. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Nous avons cultivé les souches étudiées dans des tubes contenant 10 ml de milieu YMB à différents pH (4, 5, 6, 8, 7, 8, 9, 10) incubées à 28°C pendant 10 jours. La lecture se fait par la densité optique (DO) à 620 nm.



Figure 6: Préparation de cultures bactériennes avec différents pH en milieu YMB (Photo originale)

II.2.2. Caractérisation biochimique

II.2.2.1. Type respiratoire

Cette étude est menée sur le milieu gélose viande foie (VF). Des tubes très fin (9X18mm) contenant du VF ont été ensemencés à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et chargée. La pipette est introduite au fond du tube et on remonte 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 aérobie strict** : culture seulement en présence de di-oxygène donc croissance uniquement en surface ;
- **Type aéro-anaérobie** : culture en présence et en absence de di-oxygène donc
Croissance sur la longueur du tube ;
- **Type anaérobie 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.2.2.2. Test de la catalase

Il consiste à déposer au centre de la lame quelques colonies prélevées à partir d'une culture pure et à ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10%. Une souche catalase positive se manifeste par une effervescence selon la réaction suivante :



II.2.2.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEM a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré bromophénol bleu à une concentration de 0,0025% (w/v). Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C. 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.2.2.4. Recherche de la β -galactosidase et β -galactoperméase

Le test d'ONPG permet de rechercher directement de la présence d'une β -galactosidase qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose, en lui fournissant à la bactérie son substrat qui est l'orthonitrophényl β -D galactopyranoside. A partir d'une colonie isolée de

chaque souche à tester, une suspension dense a été réalisée dans l'eau distillée stérile en tube à hémolyse, après homogénéisation de la suspension un disque d'ONPG (9mm, 1.2mg/disque) a été placé au fond du tube contenant la suspension. La lecture a été faite après 15min, 30min, 1h et 24 heures si nécessaire. Le virage du milieu au jaune révèle un résultat positif.

II.2.2.5. Production d'indole

Le milieu utilisé pour ce test est l'eau péptonée exempte d'indole. Celui-ci riche en tryptophane permet de détecter la présence de la tryptophane-désaminase qui dégrade le tryptophane en indole. Les tubes sontensemencés avec 100 µl 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.2.2.6. Test acide-indole-pyruvique

Les isolats et les souches témoin sont mis en culture dans des tubes à essai contenant 5ml de milieu eau péptonée exempte d'indole. Après incubation à 28°C, de petite quantité de ces suspensions bactériennes sont transvasées dans des tubes à hémolyse. La lecture est effectuée après avoir ajouté deux gouttes de réactif TDA avec 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.2.2.7. Utilisation du citrate

La mise en évidence de l'utilisation du citrate et de la présence d'un citrate perméase et hydrolase a été menée sur milieu citrate Simmons incliné. La pente du milieu a étéensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture prélevée sur milieu YMB. 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.

II.2.2.8. 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.2.2.9. Réduction des nitrates

L'étude de 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 écoulés, 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 le 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⁺⁺).

II.2.3. Analyse numérique

Pour bien situer le degré de rapprochement et le regroupement entre les souches isolées des nodules racinaires de *C.linifolius*, d'une part, et entre ces souches et les souches de référence utilisées d'autre part, les résultats de l'ensemble des caractères phénotypiques étudiés ont été soumis à une analyse numérique. La comparaison entre les souches a été réalisée par une Classification Ascendante hiérarchique (CAH), basée sur le calcul des distances Euclidiennes à l'aide du logiciel XL STAT (2009). Dans cette méthode, nous avons réalisés une matrice Tableau5 dans l'annexe III dans laquelle les variables sont introduites qualitativement et codées « 1 » pour tout résultat positif ou présent et « 0 » pour le négatif ou absent.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de *Cytisus linifolius*

III.1.1. Caractérisation culturale des souches

Les résultats obtenus de la caractérisation culturale des souches étudiées sont illustrés dans le tableau I et la Figure (07). Les souches cultivées présentent des colonies de tailles 1 à 2mm différentes, sous forme d'agrégats blancs et Beige.

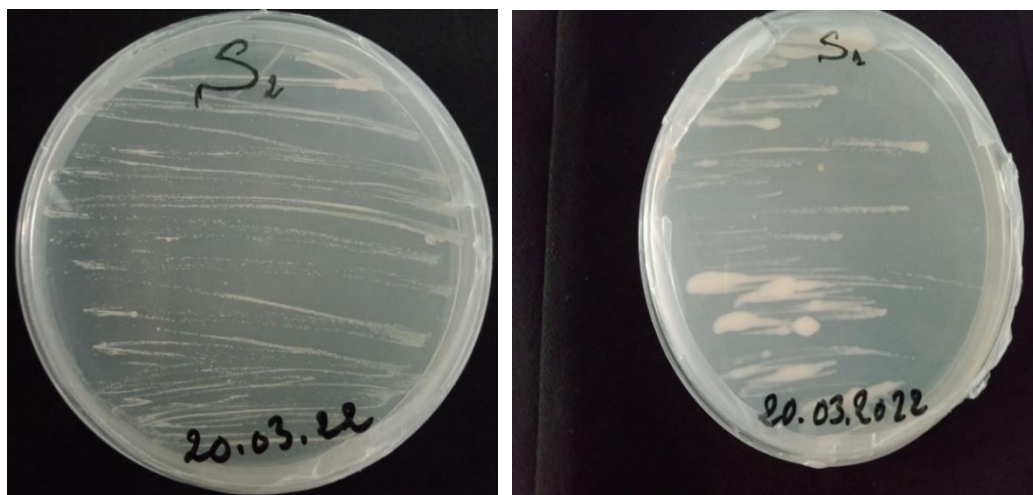


Figure 7: Aspect des colonies, exemple des souches S1 et S2, obtenues sur milieu YMA
(Photo originale)

Tableau 1: Caractérisation morphologique des colonies

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

III.1.2. Morphologie des bactéries –Coloration de Gram

Les bactéries ont la forme de bâtonnet aux extrémités arrondies, où leur couleur apparaît rose, ce qui permet de les classées dans le groupe des bactéries Gram négatif (Figure 8)



Figure 8: Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 10*100). Coloration rose

III.1.3. Caractérisation physiologique

III.1.3.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les résultats de l'effet du chlorure de sodium sur la croissance des souches de rhizobium sont illustrés dans la figure9.

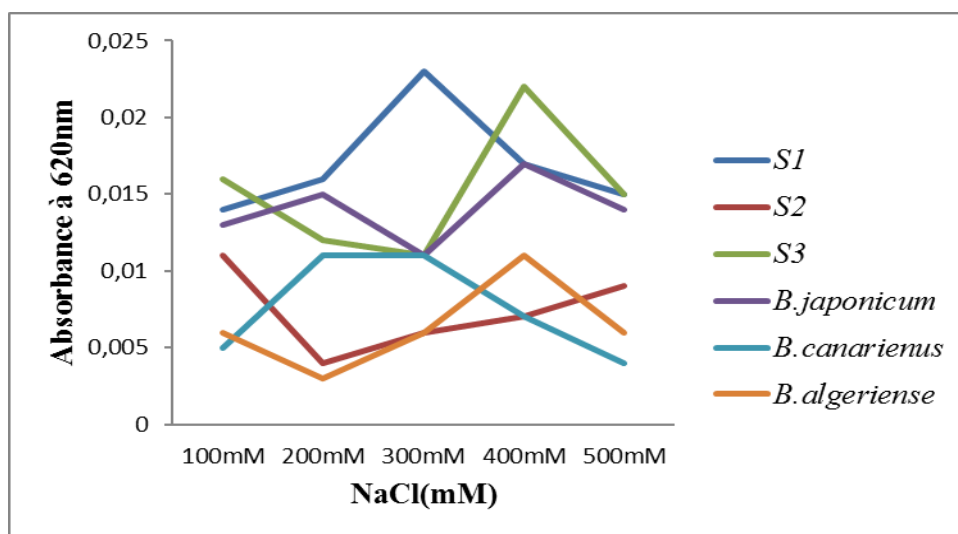


Figure 9: Effet du NaCl sur les souches étudiées

Aucune croissance n'a été observée chez toutes les souches étudiées, elles sont sensibles en présence de NaCl.

(Miller et Wood 1996) ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais elles peuvent tolérer des concentrations élevées.

Le stress salin diffère d'une souche à l'autre, selon (Mandal, 2014) Les rhizobiums s'adaptent au stress salin en s'accumulant dans les cellules d'organoïdes de petit poids moléculaire ou les soi-disant imoles (Zahran, 1999).

III.1.3.2. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées sont dans la figure (10). A travers ces courbes on remarque que la croissance optimale pour la plupart des souches a été observée entre pH 6 et pH 7, et ces mêmes souches ne présentent aucune croissance à pH 10

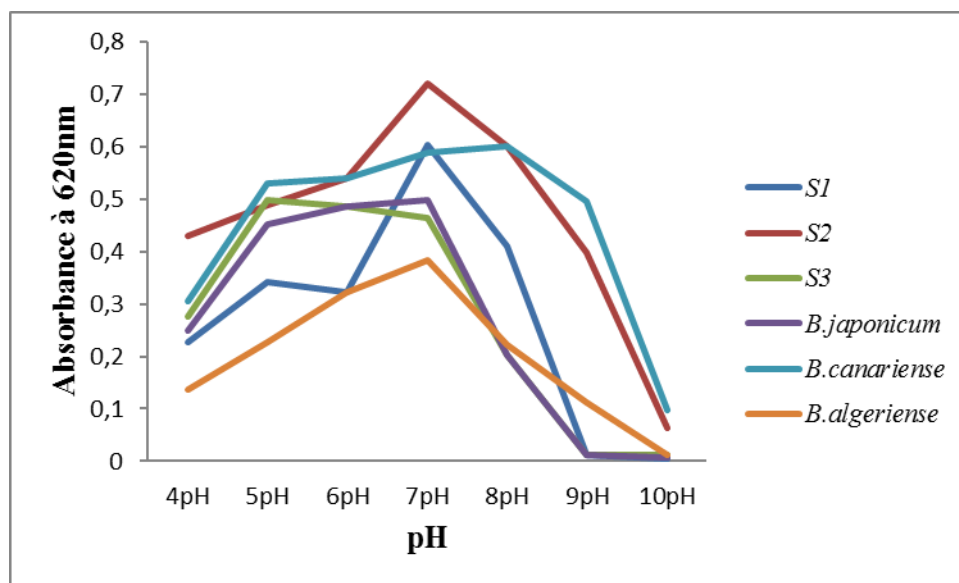


Figure 10: Effet du pH sur les souches étudiées

III.2. Caractérisation biochimique

Des tests biochimiques ont été réalisés sur 3 souches du genre *Bradyrhizobium* isolées de *Cytisus linifolius* ainsi que 3 souches de références. La culture de toutes les souches sur milieu viande foie a montré une croissance à la surface et l'absence de la croissance tout au long de la pique centrale, les résultats montrent que toutes les souches sont aérobies avec une catalase.

Le test de BTB montre que toutes les souches testées sont basiques. En effet, 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 (El-Hilalil, 2006 ; Xu et al., 1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

Toutes les souches testées ainsi que les souches de référence ne fermentent pas le glucose, ni le sucrose ni le lactose, absence aussi d'une production d'H₂S et du gaz. Par ailleurs, le test d'ONPG négatif révèle l'absence d'une β -galactosidase et une β -galactoperméase.

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 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 rhizobiums 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, S3 et *B.japonicum* ne présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches S2, *B.canariense* et *B.algeriense*, 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 ; Arreseigor et al., 1997).

III.3. Analyse numérique

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes a été basée sur 38 caractères. Ces dernières ont été groupées et présentées dans le tableau 5 (AnnexeII).

Le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (CAH) montre une diversité entre ces souches, ces souches sont réparties en deux principaux groupes C1 et C2 (figure11).

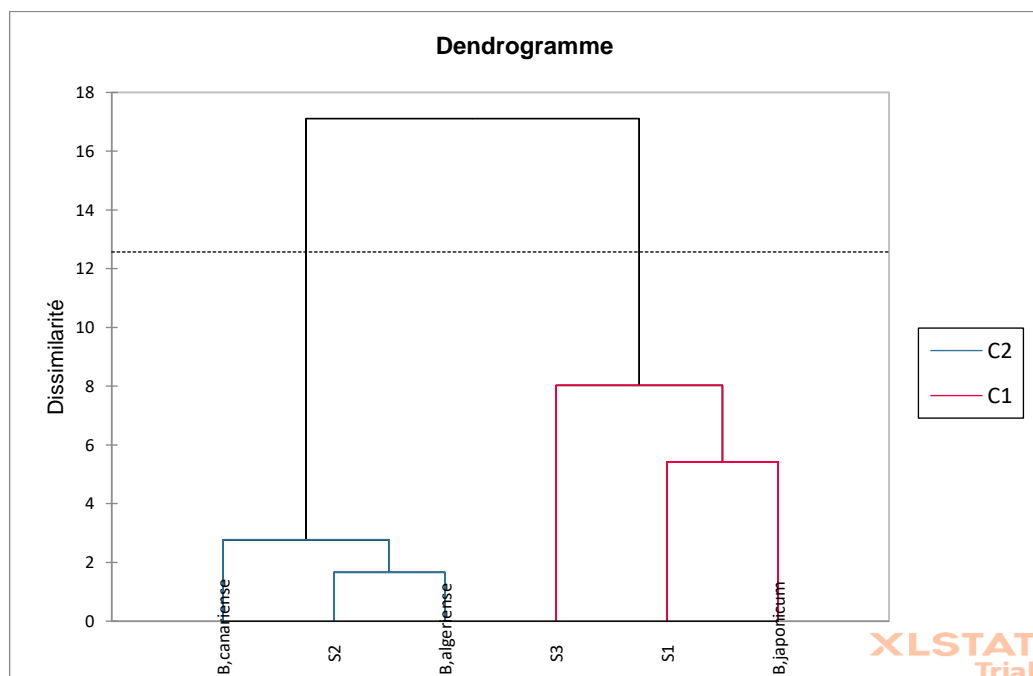


Figure 11: Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données (originale)

Constitué de deux groupes Le premier groupe C1 en rouge est constitué des deux souches S1 et S3 et de la souche de référence *B. japonium* et à son tour divisé en deux

groupes le premier est constitué de la souche S3 et le second de deux souches S1 et *B.japonium*, tandis que le deuxième groupe C2 est bleu comprend à la fois la souche S2 et les deux souches de référence *B.algeriense* et *B.canarieuse*, aussi sont divisées en deux groupes, le premier constitué d'une souche *B.canarieuse* et le second constitué de la deux souches S2 et *B.algeriense*.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de biotechnologie de l'Université Mouhamed Boudiaf de M'sila, où nous avons caractérisé des isolats bactériens de *Cytisus linifolius* à travers plusieurs propriétés cellulaires, culturelles, physiologiques et biochimiques.

La caractérisation culturelle et cellulaire montre que les souches cultivées sont des colonies de couleur blanches ou beiges de taille 1 à 2mm en présence ou absence des exopolysaccharides. Les bactéries sont des bâtonnets mobiles et gram-négatif conformément à la description des rhizobia.

Les souches ne montrent aucune croissance en présence de NaCl et que la croissance optimale pour la plupart des souches a été observée entre pH 6 et pH 7.

Les résultats des tests biochimiques montrent que toutes les souches sont aérobies avec une catalase et elles sont toutes basiques. Les souches testées ainsi que les souches de référence ne fermentent pas le glucose, ni le sucrose ni le lactose, absence aussi d'une production d'H₂S et du gaz.

Absence d'une β -galactosidase et une β -galactoperméase, elles sont dites indole⁻. Les souches S1, S3 et *B.japonicum* ne présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches S2, *B.canariense* et *B.algeriense*, possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

L'analyse numérique distinguant deux groupes, le premier groupe était constitué de la souche S2 et des deux souches de référence, tandis que le second groupe comprenait à la fois les souches S1, S3 et la souche de référence *B.japonium*.

Il est nécessaire d'étendre l'étude sur les souches de *Bradyrhizobium* dans les régions arides et désertiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aguirreolea J et Sanchez-dgaz., (1989). CO₂ Evolution by nodulated roots in *Medicago Sativa L.* under water stress. Journal plant physiol. 134 :598-602

Andriamparany J.N., Brinkmann K., Jeannoda V. and Buerkert A. (2014). Effects of socioeconomic household characteristics on traditional knowledge and usage of wild yams and medicinal plants in the Mahafaly region of south - western Madagascar. Journal of ethnobiology and ethnomedicine. 10, 61-69.

B

Baudoin J.P. (2001). Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2001 5 (4) pp 221-230

Boukecha O. Hammadi L. 2017. Caractérisation des souches isolées de *Hedysarum coronarium*. Mémoire fin de cycle Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

Boulila F., Depert G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S. et Laguerre G. (2009). *Retama* species growing in defferant ecological-climatic areas of northastern Algeria have a narrow range of rhizobia than form a novel phylogenic clade with in the *Bradyrhizobium* genus. Systimatic and Applies Microbiology. 32, 245,255.

C

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

Chopra C., Abrol B.K. et Handa K.L. (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérée surtout de point de vue botanique. UNESCO, Paris. P 75.

Cleland E.E., Harpole W.S. (2010). *Nitrogen enrichment and plant communities.* Academy of Sciences, New York. 1195. pp. 46-61.

D

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.

F

Ferry M. (1990). Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis CIHEAM – Option Méditerranéennes. Institut National de la recherche Agronomique, France.1, 261-270.

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

G

Gibson, K.E, Kobayashi, H. ET Walker, G.C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection, *Ann Rev. Of Genet.* 42: 413-441.

Giraud, E et Fleischman, D. (2004). Nitrogen fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis research.* 82 : 115-130.

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

Gusmao-Lima, A.I., Figueira, E., de Almeida, M.P., Pereira. S.I.A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*: Glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* 51,7-14.

H

Hopkins W.G. (2003) - Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie De Lille. Ed. Deboeck

Howieson, J. et Ballard, R. (2004) Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia-some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry,* 36(8), 1261-1273.

I

Ishurda O., Kermagie A., Zgheel F., Flefla M., Elmabruk M., Yalin W.,

Kennedy J.F. et P. Yuanjiang. (2004). Structural aspects of water-soluble

galactomannans isolated from the seeds of *Retamaraetam*. *Carbohydrate polymers.* **58,**41-44.

J

- Jordan, D.C. (1984)** Family III. Rhizobiaceae, p.234-242. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., Crespeau H., Carreau V., Farmer M.J., Niebel A., Schiex T., Jaillon O., Chatagnier O., Godiard L., Micheli F., Kahn D., Gianinazzi-Pearson V. et Gamas, P. (2002).** Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res* **30**, 5579-5592.

L

- LORENZO SEGOVIA. J. PETER W. YOUNG. ESPERANZA MART-NEZ-ROMERO. 1993.** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*... 1993, 374-377p

M

- Mandal HK, (2014).** Isolation of salt tolerant strains of *Rhizobium trifolii*. *International Journal of Agriculture and Food Technology* 5(4) :325-332.
- Magherani M., Zeegwagh N.A., Haloui M. et Eddouks M. (2005).** Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retamara etamin* normal rats. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 31-35.
- Mahboub Amina, (2018).** Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les plantes légumineuses, Mémoire de Master, UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
- Masepohl, B et P. C. Hallenbeck. (2010).** Recent advances in phototrophic prokaryotes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* £. Ed: P. C. Hallenbeck. Chapitre 4: Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Springer Science + Business Media* 675 : 49-70
- Mouhamad, Roba, (2016).** Adaptation des bactéries symbiotiques des légumineuses métallophiles : effet des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobies symbiotiques d'*Athylla vulneraria* et de *Lotus corniculatus* th, doc, université de Montpellier, France. P 321.
- Munns D.N., 1977. Madigan M., Martink J. (2007).** *Brock Biologie des microorganismes*. Edition : Person Education France. PP, 599-601. *Acidity 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 desacacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbiose 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 *Sinorhizobium* Sp. Strain BLB.Symbiosis. 41 :47-51.

Pellerin S., Bulter F., Guiard-Van L.G., (2014). Fertilisation et environnement. Quelles pistes pour l'aide à la décision. Ed. Quae et Acta. France. 194p.

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.

Perret X., Stachelin C., Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol.Molec.Biol.Rev.*64(1). PP,180-201.

Prin, Y., Le Roux,C., Galiana, A. et Duponnois, R. (2017) Perdus de vue : réunir les partenaires symbiotiques des légumineuses cultivées. *Innovations Agronomiques.* 60, 11 19.

Q

Quezel P. & Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.

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 (*ciurarietinum*). *Ann.Bot.*89 :563-570.

Rispail N., Kalo P., Kiss J.B., Noel Ellis T.H., Gallardo K., Thompson R.D., Prats E., Larrainainzar E., Ladrera R., Gonzalez E.M., Arese-Igor C., Ferguson B.J.,

Gresshoff P. M., Rubiales D. (2010). Model legumes contribute to faba bean breeding. *Fiel. Crop. Resea.*115, 253-269.

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 ledéveloppement ? Conference débats de l'ORSTOM. Paris Xe France. *Academy of Sciences.*1195: 46–61.

S

Sadousky M.J., (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In : Werner D, Newton WE(Ed) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment springer. The Netherlands. PP, 89-112.

Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N. LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Département de Biologie Végétale. Université Mentouri de Constantine. Algérie. P99.

Somasegaran P., Hoben H.J. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobia.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York.

Somasegaran, P. et Hoben, H.J. (1994) Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York. In. 450 p. technology. P.450. Springer-Verlag. New York.

Stan, V., Gament, E., Cornea, C.P., Voaides, C., Dusa, M. (2011). Effete of heavy metal from polluted soils on the rhizobium diversity. Notul. Botan. Horti. Agrobot. Cluj-Napoca. 39, 88-95.

Sulieman S., Ha C.V., Schulze J. & Tran L.S.P. (2013) Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. J. Exp. Bot. 64 (10). 2701-2712

T

Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005). Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. Ed. DUNOD. Paris. France.

V

Vincent, J.M. (1970) A manual for the root-nodule bacteria.

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.

https://www.rhizobia.co.nz/taxonom/rhizobia?fbclid=IwAR0yONUfIWszmWpdFTJ56TV69frgqUcFLIVx0QVzQSNk79SsB7AnK_uEt0

<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobiaHTTPS://WWW.GOOGLE.COM/SEARCH?Q=CYTISUS+LINIFOLIUS&OQ=CYTISUS+LINI&AQ=CHROME.1.69i57J0i22i30.23828J0J15&SOURCEID=CHROME&IE=UTF-8>

Annexes

Annexes I

Yaest – Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970).

Mannitol.....	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH ajusté à 6.8	

Yaest – Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970).

Mannitol.....	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
NaCl.....	0.1g
Agar.....	15g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH ajusté à 6.8	

Annexe II

Tableau 2 : La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl

Souches	100mM	200mM	300mM	400mM	500mM
S1	0,014	0,016	0,023	0,017	0,015
S2	0,011	0,004	0,006	0,007	0,009
S3	0,016	0,012	0,011	0,022	0,015
<i>B.japonicum</i>	0,013	0,015	0,011	0,017	0,014
<i>B.canarienus</i>	0,005	0,011	0,011	0,007	0,004
<i>B.algeriense</i>	0,006	0,003	0,006	0,011	0,006

Tableau 3 : La moyenne des DO obtenue aux différents pH

Souches	4pH	5pH	6pH	7pH	8pH	9pH	10pH
S1	0,226	0,343	0,323	0,603	0,41	0,011	0,004
S2	0,429	0,489	0,54	0,721	0,601	0,398	0,063
S3	0,275	0,498	0,487	0,463	0,203	0,011	0,013
<i>B.japonicum</i>	0,25	0,453	0,487	0,498	0,203	0,013	0,008
<i>B.canariense</i>	0,305	0,529	0,54	0,589	0,601	0,495	0,098
<i>B.algeriense</i>	0,137	0,226	0,323	0,383	0,221	0,111	0,011

Tableau5 : Matrice des caractères phénotypiques codés, pour une analyse ascendante hiérarchique (CAH).

Code	S1	S2	S3	<i>B.japonicum</i>	<i>B.canarieuse</i>	<i>B.algeriense</i>
Forme	0	1	0	0	1	1
Mobilité	1	1	0	0	1	1
Aspect	1	1	0	0	1	1
Couleur	0	1	0	1	0	0
EPS	1	0	1	0	1	0
Test Gram	0	0	0	0	0	0
Contour	0	1	0	0	1	1
Temps d'apparition des colonies	0	0	0	0	0	0
Élévation des colonies	0	1	0	0	1	1
Opacité des colonies	1	1	0	1	1	1
Type respiratoire	1	1	1	1	1	1
ONPG hydrolase	0	0	0	0	0	0
Citrate réductase	0	0	0	0	0	0
Tryptophanase	0	0	0	0	0	0
Nitrate reductase	1	1	1	1	1	1
Nitrite reductase	0	0	1	0	1	1
Fermentation lactose	0	0	0	0	0	0
Fermentation glucose	0	0	0	0	0	0
Fermentation du sucrose	0	0	0	0	0	0
Test BTB	1	1	1	1	1	1
TDA	1	1	1	1	1	1
PH4	0	0	0	0	0	0
PH5	0	0	0	0	0	0
PH6	0	0	0	0	0	0
PH7	0	0	0	0	0	0
PH8	1	1	1	1	1	1
PH9	1	1	1	1	1	1
PH10	1	1	1	1	1	1
100mM	0	0	0	0	0	0
200mM	0	0	0	0	0	0
300mM	0	0	0	0	0	0
400mM	0	0	0	0	0	0
500mM	0	0	0	0	0	0

Résumé

Ce travail a été mené sur 3 souches de *Bradyrhizobium* isolées de nodules racinaires de *Cytisus linifolius* comparées à 3 souches de références, à travers plusieurs expériences qui ont été réalisées, qui visaient à les distinguer par des caractéristiques cellulaires, physiologiques et biochimiques. La coexistence de ces bactéries est affectée par l'acidité et la salinité du sol. Le pH optimal pour la croissance de ces souches est de 6 à 7 et aucune croissance n'est apparue en présence de NaCl. Les souches S1 et S3 présentent l'activité nitrate réductase, cependant, la souche S2 possède en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase. Ces bactéries peuvent être utilisées dans le projet pour améliorer les sols dégradés dans les zones sèches et semi-arides et fournir une couverture végétale.

Mots clés : *Bradyrhizobium*, *Cytisus linifolius*, caractérisation biochimique

Abstract:

This work was carried out on 3 strains of *Bradyrhizobium* isolated from root nodules of *Cytisus linifolius* compared to 3 reference strains, through several experiments which were carried out, which aimed to distinguish them by cellular, physiological and biochemical characteristics. The coexistence of these bacteria is affected by the acidity and salinity of the soil. The optimum pH for growth of these strains is 6-7 and no growth occurred in the presence of NaCl. S1 and S3 strains exhibit nitrate reductase activity, however, the S2 strain possesses in addition to nitrate reductase activity, a nitrite reductase activity. These bacteria can be used in the project to improve degraded soils in dry and semi-arid areas and provide vegetation cover.

Key words: *Bradyrhizobium*, *Cytisus linifolius*, biochemical characterization

ملخص:

تم تنفيذ هذا العمل على 3 سلالات من *Bradyrhizobium* معزولة عن العقيدات الجذرية *Cytisus linifolius* مقارنة بـ 3 سلالات مرجعية، من خلال العديد من التجارب التي تم إجراؤها، والتي تهدف إلى تمييزها بالخصائص الخلوية، ويتأثر تعايش هذه البكتيريا بحموضة وملوحة التربة. الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو هذه السلالات هو 6-7 ولم يحدث أي نمو في وجود NaCl. السلالتان S1 و S3 لديهما نشاط اختزال النترات، ومع ذلك، فإن سلالة S2 تحتوي بالإضافة إلى نشاط اختزال النترات، وهو نشاط اختزال النتريت.

يمكن استخدام هذه البكتيريا في المشروع لتحسين التربة المتدهورة في المناطق الجافة وشبه القاحلة وتوفير غطاء نباتي.

الكلمات المفتاحية: *Cytisus linifolius*, *Bradyrhizobium*. التوصيف البيوكيميائي.