

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

UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

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

N° :



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE

FILIERE : ECOLOGIE ET
ENVIRONNEMENT

OPTION : ECOLOGIE URBAIN

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Professionnel

Par :

DEGHIM Hadil DAHOUM Souaad

Intitulé:

Etude de la croissance des rhizobia
isolées des zones arides

Soutenu devant le jury composé de :

Mme BEN HISSEN Saliha	MCA	Université de M'Sila	Présidente.
Mme AHNIA Hadjira	MCB	Université de M'Sila	Rapporteuse.
Mme ARAB Radhia	MCA	Université de M'Sila	Examinatrice.

Année universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENTS.

Au commencement de ce mémoire, nous avons à exprimer notre profonde gratitude à ALLAH, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, qui nous a guidés et nous a donné la force et la patience de persévérer tout au long de ces longues années d'études.

Nous voudrions ensuite adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice, Mme AHNIA HADJIRA, qui nous a fait l'honneur de diriger ce mémoire. Son encadrement précieux, ses conseils avisés, sa patience et sa gentillesse ont été d'une importance capitale pour la réussite de ce travail. Nous lui sommes particulièrement reconnaissants pour son soutien indéfectible et sa confiance en nos capacités.

Nous remercions également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire avec rigueur et bienveillance.

Madame BEN HISSEN SALIHA, Présidente du jury, merci de l'honneur que vous nous avez fait en présidant cette soutenance.

Madame ARAB RADHIA, Merci d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail. Votre expertise et vos précieux conseils ont été d'une grande aide.

Un grand merci à tous les enseignants du département de Sciences de la nature et de la vie pour leur dévouement et leur passion pour la transmission du savoir.

Enfin, nous tenions à exprimer notre gratitude à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Nos pensées reconnaissantes vont également à nos collègues étudiants de Master 2 Ecologie.

Ce mémoire est le fruit d'un travail acharné et d'une collaboration précieuse. Nous sommes reconnaissantes envers tous ceux qui ont contribué à sa réussite.

DEDICACE

Aujourd'hui, je dédie ma fatigue et cet humble travail avec une profonde gratitude à :

Mes chers parents

Piliers de ma vie, dont l'amour et le soutien inconditionnels m'ont permis de persévérer et d'accomplir mes objectifs.

Mes frères et sœurs

Sources d'inspiration et de joie, qui ont toujours été présents pour moi.

Mon cher frère Zikou

Confident et ami précieux, dont les encouragements et les conseils ont été d'une importance capitale.

*Aux enfants de la famille, **Anas, Rahaf, Jude et Ibrahim**, rayons de soleil qui illuminent mes journées.*

A mes amis de toujours, qui ont su me reconforter et me soutenir dans les moments difficiles.

*A mes professeurs, **AHNIA HADJIRA** qui m'ont transmis leur savoir et m'ont guidé sur le chemin de la connaissance.*

*A ma binôme et sœur **Hadil**, pour sa collaboration précieuse et son amitié indéfectible.*

Du plus profond de mon cœur, merci à chacun d'entre vous.

Souaad

DEDICACE

Ce travail est dédié à ALLAH, qui m'a guidé et soutenu tout au long de mon cheminement et dont la grâce et la bénédiction ont éclairé mon parcours. Je suis reconnaissant envers ALLAH pour sa direction, sa protection et son soutien inébranlable. Je remercie sa patience, sa miséricorde et son amour inconditionnel.

Je dédie ce travail à la personne que je suis, celle qui n'a jamais abandonné ses rêves, même lorsque les obstacles semblaient insurmontables. J'ai appris à croire en moi, à persévérer et à donner le meilleur de moi-même. Ce mémoire est la preuve de mon travail acharné, de ma détermination et de mon engagement. Je suis fier de ce que j'ai accompli et je remercie la personne que je suis pour sa force et son courage, et je suis impatient de voir ce que l'avenir me réserve.

Hadil

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I : synthèse bibliographique

I. Azote **3**

II. Cycle de l'azote **3**

II.1. Le processus de fixation de l'azote (N₂) **4**

II.2. La nitrification **4**

II.3. La dénitrification **5**

III. Fixation biologique de l'azote **5**

III.1. Fixateurs libres **5**

III.2. Fixateurs symbiotiques **6**

IV. la symbiose rhizobium-légumineuse **7**

IV.1. Partenaires de la symbiose : les légumineuses **7**

IV.2. Partenaires symbiotiques : les rhizobia **8**

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel **10**

II. Méthodes **10**

II-1. Morphologie des colonies **10**

II.2. Caractérisation cellulaire des souches étudiées	11
II.3. Caractérisation physiologique des souches étudiées	13
II.3.1. Effet du PH sur la croissance des souches étudiées	13
II.3.2. Effet de la température sur la croissance des souches étudiées	14
II.4. Caractérisation biochimique des souches étudiées	14
Chapitre III : Résultats et discussion	
II-1. Morphologie des colonies	15
II.2. Caractérisation cellulaire des souches étudiées	17
II.3. Caractérisation physiologique des souches étudiées	18
II.3.1. Effet du PH sur la croissance des souches étudiées	18
II.3.2. Effet de la température sur la croissance des souches étudiées	20
II.4. Caractérisation biochimique des souches étudiées	21
CONCLUSION	23
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	25
ANNEXES	28
Résumé	30

Liste des abréviations

YMA	Yeast Mannitol Agar.
YMB	Yeast Mannitol Broth.
D.O	Densité Optique.
ESC	Esculine citrate de fer.
PH	PotentialHydrogen.
NaCl	Chlorure de Sodium.
N2	Diazote.
NO3	Nitrate.
NH4	Ammonium.
NH3	Ammoniaque.
NO3/N2	Nitrate/Nitrite réductase.
MAN	Mannitol.
MNE	Mannose.
ARA	ARAbinose.
GLU	Glucose.
ADH	Arginine.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Le cycle de l'azote (Pujic, 2009).	3
2	Techniques d'ensemencement et d'isolement des microorganismes (Belmessikh et Mergoud, 2021).	11
3	Méthodes d'examen à l'état frais des souches étudiées.	12
4	Les étapes de la coloration de Gram (theory.labster.com).	13
5	Méthode utilisé pour Galerie AP20.	15
6	Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA S1, S2 et S3.	17
7	Observation microscopique de la souche S1, prise comme exemple, sous microscope optique à l'état frais (Grossissement 10 ×40).	18
8	Observation microscopique d'un frottis de bactérie gram négatif (Grossissement 10*100).	19
9	Effet du pH sur la croissance des souches.	20
10	Effet de la température sur la croissance des souches.	21
11	Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries AP20.	23

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Caractères morphologiques des colonies.	18
2	Résultats de la caractérisation biochimique.	22
3	La moyenne des DO obtenue aux différents Ph (Annexe II).	29
4	La moyenne des DO obtenue aux différentes températures (Annexe II).	29

Introduction

Introduction

Les zones arides couvrent environ un tiers de la surface de la Terre et sont caractérisées par des conditions environnementales extrêmes telles que la rareté de l'eau, des températures élevées et des sols souvent pauvres en nutriments.

Cependant, même dans ces environnements apparemment difficiles, la vie prospère toujours, les micro-organismes jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre écologique et la promotion de la fertilité des sols. Parmi ces organismes, les rhizobiums (bactéries symbiotiques fixatrices d'azote) jouent un rôle clé dans la promotion de la croissance des plantes, en particulier dans des conditions environnementales difficiles telles que les régions arides.

Les rhizobia sont des bactéries qui établissent une symbiose avec les plantes hôtes, en particulier les légumineuses. En raison de cette symbiose, les plantes profitent d'une nouvelle source d'azote, un élément indispensable à leur développement, tandis que les rhizobia reçoivent en retour des composés carbonés fournis par la plante.

Les légumineuses, famille végétale riche et diversifiée, jouent un rôle crucial dans la restauration des sols pauvres et dégradés. Elles établissent une association symbiotique remarquable avec des micro-organismes du sol appelés rhizobia. Cette symbiose permet aux légumineuses de fixer l'azote atmosphérique, élément nutritif essentiel pour la croissance des plantes, et d'enrichir ainsi le sol de manière naturelle. Grâce à elle, environ 40 à 60 millions de tonnes d'azote sont fixées chaque année (Graham et Vance 2003).

En Algérie, véritables alliées des sols algériens, les légumineuses, famille végétale abondante et diversifiée, s'avèrent précieuses pour deux raisons majeures : leur capacité à enrichir les sols en azote grâce à une symbiose unique avec les rhizobia et leur contribution à la régénération des sols pauvres et dégradés.

L'objectif principal de cette étude est d'analyser en profondeur la croissance des rhizobia isolés des zones arides. Cette analyse s'articulera autour de trois axes majeurs :

- Dans cette première partie, nous allons présenter une synthèse des connaissances actuelles concernant les rhizobia et les légumineuses, en mettant l'accent sur leurs liens symbiotiques.
- Dans la deuxième partie, nous aborderons en détail les techniques et les protocoles expérimentaux employés afin de mener à bien l'étude.
- Dans la troisième partie : les résultats obtenus concernant l'influence du pH et de la température sur la croissance des rhizobia seront exposés dans cette dernière partie.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Azote

L'azote (N) occupe une place essentielle dans le domaine agricole (Peyraud *et al.*, 2012), représentant 78 % de l'atmosphère. Il s'agit du quatrième élément des plantes ; il est employé pour fabriquer diverses biomolécules essentielles, les acides nucléiques (ADN, ARN), les hormones, ainsi que dans toutes les protéines structurales et enzymatiques (Epstein, 1972). Constitue l'azote 16 % des protéines végétales, constitue entre 1,5 et 2 % de la matière sèche des plantes (Frink *et al.*, 1999). Il joue un rôle crucial en tant qu'élément nutritif pour stimuler la croissance des cultures et augmenter les rendements (N'Dayegamiye *et al.*, 2007).

II. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote (**figure 1**) est un processus biogéochimique essentiel qui régule la disponibilité de l'azote dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Bockman *et al.*, 1990). Ce processus consiste à transformer le nitrogène en différentes formes, passant successivement de l'atmosphère au sol, à l'organisme et à nouveau à l'atmosphère. Le schéma ci-dessous le simplifie :

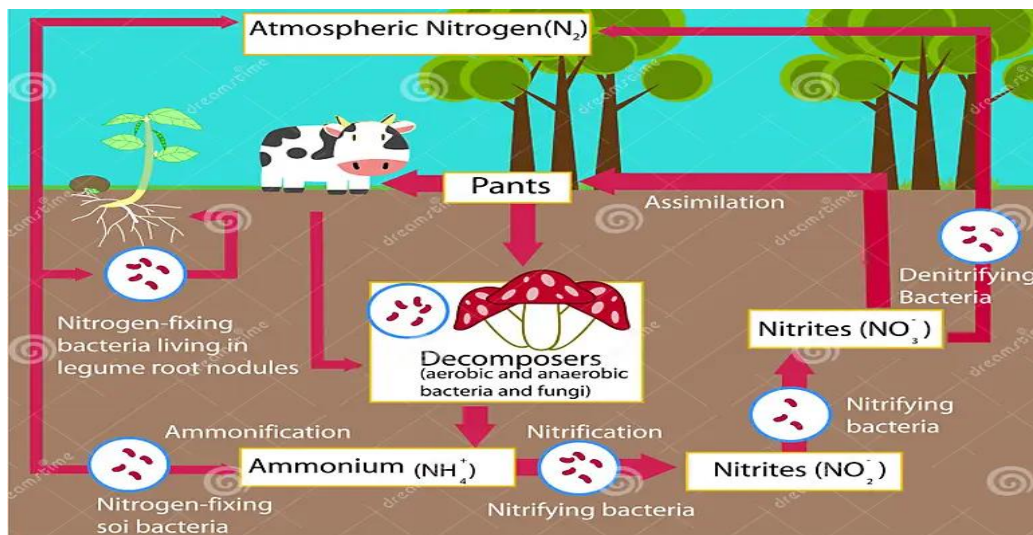


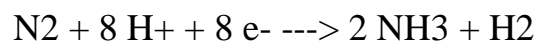
Figure 1 : Cycle d'azote (Pujic, 2009).

Chapitre I : synthèse bibliographique

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

Dans cette étape, le nitrate de l'atmosphère (N₂), qui se trouve principalement sous sa forme inerte, est converti en ammonium (NH₃). On peut réaliser la fixation du nitrogène à l'atmosphère en utilisant la technique de Lightning ou en produisant de l'ammoniaque à l'industrie à des températures et des pressions élevées. On peut également résoudre cela à l'aide de technologies humaines, principalement des activités industrielles qui génèrent de l'ammoniaque et des fertilisations riches en nitrogène (byjus.com).

La réaction impliquée dans le processus de Le processus de fixation de l'azote est le suivant :



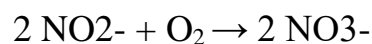
II.2. La nitrification

Organismes de nitrification se produit dans les sols grâce à l'intervention de micro-organismes spécifiques, ce qui entraîne la conversion de l'ammoniac (ou de l'ammonium) en nitrate en deux étapes :

- **Nitrosation** : sous l'action de bactéries nitreuses aérobies (Nitrosomonas).
- **Nitration** : par les bactéries nitrifiantes aérobies (Nitrobacter).

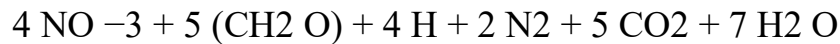
La nitrification provoque une acidification du sol dans les écosystèmes où les nitrates sont évacués vers les nappes phréatiques (Actuenvironnement.com).

La réaction impliquée dans le processus de nitrification est la suivante :



II.3. La dénitrification

La dénitrification consiste à convertir le nitrate (NO₃⁻) en nitrogène gaz (N₂), ce qui permet de le renvoyer dans l'atmosphère. Cette étape du cycle du nitrogène est la dernière et se produit en l'absence d'oxygène. Cela est réalisé par les bactéries dénitrifiantes *Clostridium* et *Pseudomonas*. Les équations suivantes indiquent :



III. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet la production de protéines à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère de l'environnement. C'est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse par les organismes (Roger *et al.*, 1996). La fixation biologique du nitrogène est catalysée par la nitrogénase complexe, qui permet de convertir le gaz azote (N₂) en ion ammonium (NH₄⁺), qui peut ensuite être employé pour fabriquer des protéines. Environ 175 millions de tonnes d'azote provenant de l'atmosphère sont réintroduites chaque année dans le cycle de la vie grâce à celle-ci (Roger *et al.*, 1996).

Les micro-organismes qui fixent l'azote sont responsables de cette fixation, qui est généralement divisée en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques.

III.1 . Fixateurs libres

Les micro-organismes appelés fixateurs libres ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique (N₂) en utilisant leur propre métabolisme, sans avoir besoin d'une association symbiotique avec des plantes. Ces bactéries jouent un rôle crucial dans le processus de conversion de l'azote gazeux en formes que les écosystèmes terrestres et aquatiques peuvent utiliser. Les sols sont fertiles grâce à leur aptitude à fixer l'azote, ce qui assure la disponibilité de cet élément essentiel pour la vie sur Terre.

Ces fixateurs libres, également connus sous le nom de bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques, sont en vie à l'état libre et ne nécessitent pas l'intervention de l'hôte pour réaliser le processus. Il existe différents groupes :

Chapitre I : synthèse bibliographique

- **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 fixateurs symbiotiques sont des micro-organismes qui vivent en association étroite avec les plantes, formant une symbiose. Ils jouent un rôle essentiel dans le cycle de l'azote en convertissant l'azote gazeux (N₂) de l'atmosphère en formes utilisables par les plantes.

Différents types de fixateurs symbiotiques :

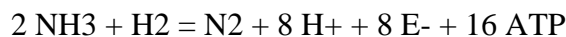
- **Rhizobia** : genre de bactéries Gram-négatives qui infectent les racines des légumineuses et forment des nodules. Elles fixent l'azote atmosphérique et le transmettent à la plante en échange de nutriments comme les sucres.
- **Frankie** : genre de bactéries Gram-positives qui fixent l'azote dans les nodules des actinorhizes, un groupe de plantes non légumineuses.

IV. Symbiose rhizobia-Légumineuses

Un avantage important des plantes de la famille des légumineuses est leur capacité à coexister avec des bactéries du genre *Rhizobium* dans le sol. Les bactéries, qui ont été différenciées en bactéroïdes, pourront se loger dans de petits organes racinaires appelés nodules lorsque la plante sera en contact avec les rhizobia. Les plantes fournissent aux bactéries les sources de carbone nécessaires à leur développement et une niche écologique. Les bactéries fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent à la plante sous forme d'ammoniac, qui peut être assimilé.

Les rhizobia se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote au sein du nodule (agriculture-de-conservation.com).

La nitrogénase est une enzyme bactérienne qui permet cette réaction et catalyse la réaction suivante :



IV.1 . Partenaires de la symbiose : les légumineuses

La famille des légumineuses ou Fabaceae compte plus de 18 000 espèces. Il s'agit de plantes dicotylédones qui sont largement utilisées dans l'alimentation humaine et animale, car elles sont très riches en protéines. On distingue deux catégories de légumineuses dans le milieu agricole :

- **Légumineuses fourragères** : elles sont utilisées pour nourrir les herbivores, en particulier pour le pâturage, le foin et l'ensilage. Les plantes de ce groupe comprennent la luzerne, le sainfoin, le lupin, le lotier, les trèfles et la vesce.
- **Légumineuses à grain** : les hommes peuvent les consommer. Les légumineuses à grains comprennent le soja, la féverole, la lentille, la fève, le haricot, le pois et les pois chiche (agriculture.gouv.fr).

Chapitre I : synthèse bibliographique

➤ Classification des Légumineuses :

- **Mimosoideae**

La famille des Mimosoideae est traditionnellement classée comme une sous-famille de la famille des Fabaceae. On les trouve principalement dans les climats tropical et subtropical et sont caractérisés par leurs fleurs radialement symétriques, souvent avec de nombreux stamens colorés qui les distinguent assez. L'ensemble comprend environ 62 genres et environ 2500 espèces, parmi les 10 % d'espèces déjà étudiées pour leurs nodulations (Maxted et Bennett, 2001).

- **Caesalpinoideae**

Caesalpinoideae est un genre composé de 163 genres et d'environ 4680 espèces. Il s'agit principalement de végétaux tropicaux ou subtropicaux. Ils ont une fleur irrégulière avec 5 pétales non distincts et des étamines visibles à l'extérieur (Judd et *al.*, 2001). Il y a 4 tribus d'espèces : Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae et Detarieae.

- **Papilionoideae**

Elle est une sous-famille de la famille des plantes fleuries Fabaceae, qui comprend 475 genres et près de 14,000 espèces réparties en 14 tribus. Principalement des arbres, des arbustes ou des plantes herbacées réparties à travers le monde. Ils se rencontrent dans les régions tempérées et tropicales et incluent des espèces familières telles que les pommes de terre, les pommes douces, le laburnum et d'autres légumes. Leur fleur est irrégulière et comprend 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène.

IV.2 . Partenaires symbiotiques : les rhizobia

Les rhizobiums représentent entre 0,1 et 8 % de la flore bactérienne totale du sol (Sadowsky et Graham, 1998). Ils sont des bactéries à Gram négatif, mobiles et non sporulantes. Ils vivent à l'état libre dans le sol et se présentent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Ils se

Chapitre I : synthèse bibliographique

distinguent en bactéroïdes branchés, sphériques ou en massue à l'intérieur du nodule pour fixer l'azote (Perry et *al.*, 2004).

Effectivement, les rhizobia sont des bactéries qui peuvent fixer l'azote atmosphérique lorsqu'elles sont associées de manière symbiotique à des légumineuses sur les racines (et parfois les tiges) desquelles elles forment des nodosités. Ces bactéries ont la particularité de

Posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase/hydrogénase qui permet cette fixation d'azote et qui ont donc une grande importance écologique. Ils réduisent les besoins en engrais chimiques azotés et améliorent la productivité des légumineuses dans les champs. L'inoculation rhizobienne.

La catégorisation actuelle des rhizobia est basée sur les séquences ADNr 16 S. les bactéries nodulant les légumineuses actuellement décrites appartiennent à trois sous-classes principales phylogénétiquement différentes :

- **Alphaproteobacteria :**

- **Famille *Rhizobiaceae* :** comprend le genre *Rhizobium*, ainsi que des genres comme *Allorhizobium* et *Pararhizobium*.
- **Famille *Bradyrhizobiaceae* :** abrite notamment le genre *Bradyrhizobium*, important pour la symbiose avec le soja.
- **Famille *Phyllobacteriaceae* :** ce groupe plus récent englobe des genres comme *Mesorhizobium* et *Azorhizobium*.

- **Betaproteobacteria :**

- **Famille *Burkholderiaceae* :** comprend le genre *Burkholderia*, associé à la symbiose avec des légumineuses tropicales.

- **Gammaproteobacteria :**

- **Famille *Methylobacteraceae* :** abrite le genre *Methylobacterium*, capable de fixer l'azote dans des conditions micro aérophiles.

Chapitre I : synthèse bibliographique

➤ Classification actuelle des rhizobia :

Les rhizobia font partie du phylum Bacteria, du domaine Bacteria. Ils sont classés en 482 espèces et 13 genres (Wier, 2016), parmi lesquels :

- *Rhizobium* qui contient 49 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 21 espèces
- *Ensifer, autrefois Sinorhizobium* contient 17 espèces.
- *Bradyrhizobium* qui contient 9 espèces.
- *Burkholderia* contient 7 espèces.
- *Azorhizobium* qui contient 2 espèces
- *Microvirga* qui contient 3 espèces.
- *Phyllobacterium* qui contient 3 espèces.
- *Ochrobactrum* qui contient 2 espèces.
- *Methylobactérieum* qui contient 1 espèce.
- *Cupriavidus* qui contient 1 espèce.
- *Devosia* qui contient 1 espèce.
- *Shinella* qui contient 1 espèce.

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

I. Matériel

Dans cette étude, trois souches de rhizobia isolées à partir de nodules de racine de légumineuses dans les régions arides d'Algérie ont été utilisées dans cette étude. Ces souches bactériennes proviennent d'une collection appartenant à un laboratoire d'écologie microbienne de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, en Algérie. En outre, *Bradyrhizobium algeriense* RST89 (Ahnia et *al.*, 2018) a été inclus comme souche de référence.

Cette étude constitue une avancée dans la compréhension des bactéries endosymbiotiques et souligne leur importance environnementale.

II. Méthodes

Différents tests phénotypiques ont été réalisés sur toutes les souches étudiées à savoir : une caractérisation culturelle ; une caractérisation morphologique suivie des tests physiologiques et biochimiques.

II.1 . Morphologie des colonies

Pour étudier les caractéristiques morphologiques des colonies par leur forme, taille, couleur, opacité et production d'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 2**).

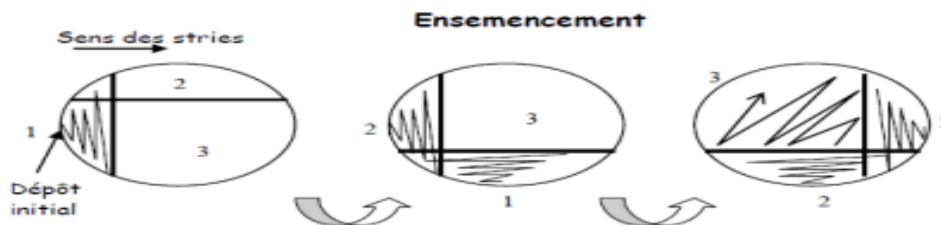


Figure 2 : Techniques d'ensemencement et d'isolement des microorganismes (Belmessikh et Mergoud, 2021).

II.2 . Caractérisation cellulaire des souches étudiées

L'analyse des caractéristiques cellulaires des souches visait à mieux comprendre leur structure interne et leurs propriétés physiologiques :

- **L'état frais**

L'analyse à l'état frais des souches bactériennes permet de déterminer leur forme et 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 observée sous microscope optique au grossissement 10×40 (**Figure 3**).

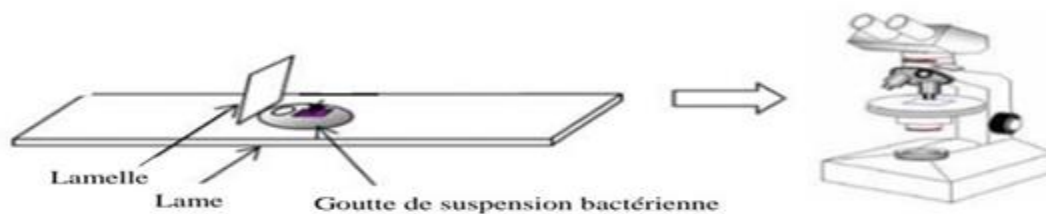


Figure 3 : Méthodes d'examen à l'état frais des souches étudiées.

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est une technique fondamentale de la microbiologie, utilisée pour classer les bactéries en deux groupes principaux en fonction des caractéristiques de leur paroi cellulaire : Gram + ou Gram -.

Les bactéries Gram + possèdent une paroi cellulaire riche en peptidoglycanes qui conserve la teinture violette cristalline, tandis que les bactériens Gram - présentent un mur cellulaire plus complexe avec une couche externe de lipopolysaccharide qui ne parvient pas à conserver le violet cristallin après la décoloration.

Cette technique joue un rôle crucial dans l'identification rapide des bactéries et sert souvent de test initial dans les analyses microbiologiques (**Figure 4**).

Chapitre II : Matériel et méthodes

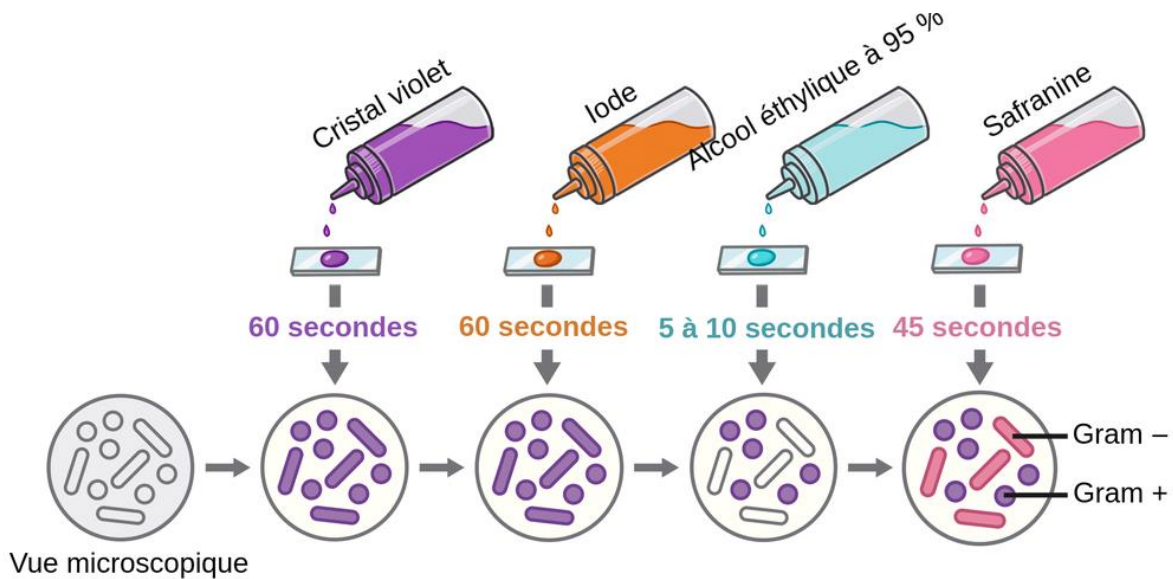


Figure 4 : Les étapes de la coloration de Gram (theory.labster.com).

➤ La technique consiste à :

1. **Nettoyage de la lame :** Nettoyer soigneusement la lame de verre avec un coton-tige imbibé d'alcool pour éliminer toute trace de graisse ou de résidus.
2. **Préparation du frottis :** Prélever un échantillon de la culture bactérienne et l'étaler uniformément sur la surface de la lame de verre. Laisser sécher le frottis à l'air libre.
3. **Fixation du frottis :** Fixer le frottis à la chaleur en passant la lame au-dessus d'une flamme de brûleur Bunsen pendant quelques secondes. Cette étape permet d'adhérer les bactéries à la surface de la lame.
4. **Coloration au violet de gentiane :** Appliquer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis et laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute. Le violet de gentiane se lie aux composants de la paroi cellulaire des bactéries.
5. **Rinçage :** Rincer abondamment le frottis à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.
6. **Mordant au Lugol :** Appliquer quelques gouttes de Lugol sur le frottis et laisser agir pendant 1 minute. Le Lugol agit comme un mordant, fixant le violet de gentiane dans les bactéries Gram-positives.
7. **Rinçage :** Rincer abondamment le frottis à l'eau distillée pour éliminer l'excès de Lugol.

Chapitre II : Matériel et méthodes

8. **Décoloration à l'alcool** : Décolorer le frottis en utilisant de l'alcool acétonique pendant 1 minute. L'alcool acétonique décolore les bactéries Gram-négatives, tandis que les bactéries Gram-positives conservent la coloration violette.
9. **Lavage** : Laver soigneusement le frottis à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'alcool acétonique.
10. **Contre-coloration à la fuchsine** : Appliquer quelques gouttes de solution de fuchsine sur le frottis et laisser agir pendant 1 minute. La fuchsine colore les bactéries Gram-négatives en rouge.
11. **Rinçage**
12. **Séchage** : Sécher délicatement le frottis entre deux feuilles de papier absorbant.
Observation au microscope optique : Observer le frottis au microscope optique à un grossissement de 10x 100 en ajoutant une goutte d'huile à immersion. Les bactéries
13. **Gram-positives** apparaissent en violet, tandis que les bactéries **Gram-négatives** apparaissent en rose.

II.3 . Caractérisation physiologique des souches étudiées

Le développement des bactéries dans le sol est influencé deux facteurs environnementaux essentiels : le pH et la température. L'analyse de leur influence sur les souches de référence permet d'approfondir notre compréhension des mécanismes de croissance bactérienne et de mettre en pratique ces connaissances dans différents domaines.

II.3.1 . Effet du pH sur la croissance des souches étudiées

Les souches étudiées ont été inoculées dans des tubes contenant 10 ml de milieu YMB dont le pH a été ajusté à six valeurs distinctes : 4, 5, 6, 7, 8, et 9. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm après une incubation de 10 jours à 28 °C sous agitation constante. Cette approche permet d'évaluer la capacité d'adaptation et de croissance des souches bactériennes en fonction de l'acidité ou de l'alcalinité de leur environnement. Les mesures de DO ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.2. Effet de la température sur la croissance des souches étudiées

L'objectif de cette expérience est d'identifier les températures optimales et maximales de croissance pour les souches bactériennes étudiées. Pour ce faire, des cultures ont été réalisées dans des tubes contenant 10 ml de milieu YMB et incubées à des températures distinctes (26°C, 28°C, 30°C et 32°C) pendant une période de 10 jours. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 620µm.

II.4 . Caractérisation biochimique des souches étudiées

Pour déterminer la caractérisation biochimique des souches, un test de galerie API 20 a été effectué. Le test API 20 s'inscrit comme une méthode standardisée couramment employée en Microbiologie pour l'identification des bactéries à Gram négatif, en particulier les entérobactéries. Ce test repose sur une série de 20 tests biochimiques miniaturisés permettant d'évaluer différentes activités enzymatiques et capacités métaboliques des bactéries testées.

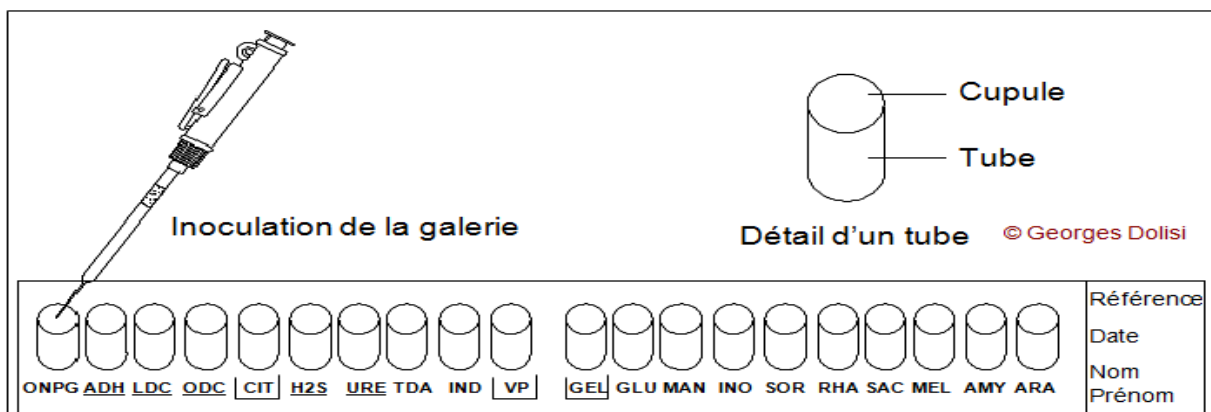


Figure 5 : Méthode utilisé pour Galerie AP20.

➤ Étapes de préparation :

- **Réhydrater les microtubes :** Retirer le protecteur de capuchon de la galerie API 20, ajouter 0,5 ml d'eau stérilisée à chaque microtube, et les laisser réhydrer pendant 15 minutes à la température ambiante.
- **Préparation de la suspension bactérienne :** Ajuster la turbidité normalisée à un équivalent McFarland 0,5. Utilisez un néphélomètre ou comparez la turbidité à une suspension de référence.

Chapitre II : Matériel et méthodes

➤ Étapes d'infection :

- Prelever 0,5 ml de suspension bactérienne stérilisée.
- Inoculer chaque microtube avec 0,5 ml de suspension bactérienne, en évitant les bulles d'air.
- Inoculer les puits de stérilisation : Ajouter 0,5 ml d'eau stérilisée aux puits.
- Incubation : Identifier la stérilisation bien avec le nom de la souche bactérienne et la date d'infection.
- Placez le puits inversé dans un incubateur bien réglé à la température de croissance optimale.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion

Les différents tests phénotypiques ont été réalisés sur l'ensemble des souches, en comparaison avec la souche de référence du genre *Bradyrhizobium*.

II.1 . Morphologie des colonies

Des colonies bactériennes sont apparues après 8 à 10 jours d'incubation à 28 °C sur milieu YMA, indiquant une croissance lente caractéristique des *Bradyrhizobium*. Ces colonies présentent une morphologie lisse et circulaire, d'un diamètre variant entre 2 et 3 mm, avec un contour régulier et une coloration blanche. Elles peuvent être translucides.

Certaines souches, comme S3, produisent des Exopolysaccharides (**Figure 6**).

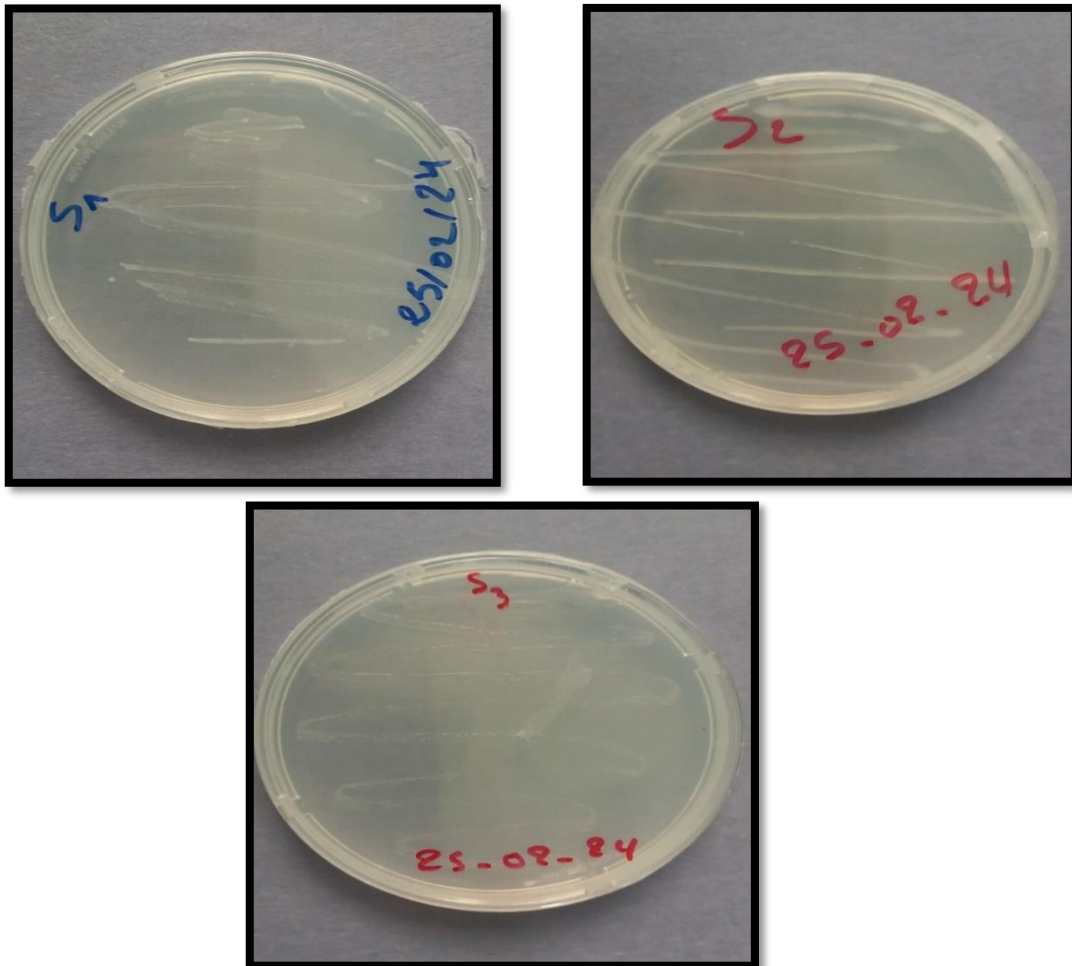


Figure 6 : Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA S1, S2 et S3.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 1: caractères morphologiques des colonies

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

II.2 . Caractérisation cellulaire des souches étudiées

- L'état frais

L'examen microscopique des différentes suspensions bactériennes a révélé que toutes les souches sont constituées de petits bâtonnets à extrémités arrondies et dotés d'une mobilité. Ces bactéries présentent un aspect brillant caractéristique, conféré par la présence de granules de *poly- β -hydroxybutyrate* (Pedrosa, 1988).

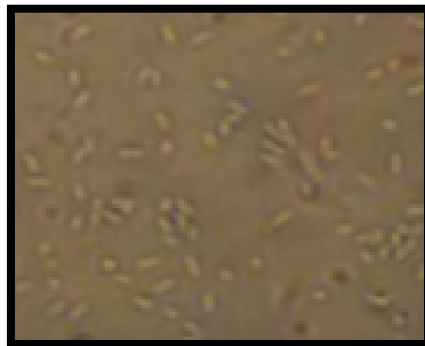


Figure 7 : Observation microscopique des bactéries, prise comme exemple, sous microscope optique à l'état frais (Grossissement 10 \times 40).

- **Coloration de gram**

L'analyse par coloration de Gram a confirmé l'appartenance des souches aux bactéries à Gram -, en raison de la coloration rose des bacilles observés. Cette caractéristique est en accord avec la description des rhizobia selon Jordan (1984).

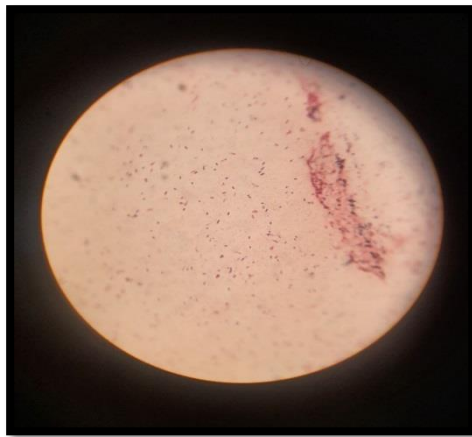


Figure 8 : Observation microscopique d'un frottis de bactérie gram négatif (Grossissement 10*100).

II.3 . Caractérisation physiologique des souches étudiées

Dans cette étude, nous avons exploré l'effet du pH et de la température sur la croissance des rhizobia isolés des zones arides au cours d'une incubation de 10 jours à 28 °C. Les données recueillies représentent la moyenne de trois répétitions effectuées pour chaque combinaison de pH et de température.

II.3.1 . Effet du PH sur la croissance des souches étudiées

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches (S1, S2, S3) sont illustrés dans **la figure 9**. La souche (S2) montre la plus grande stabilité et une croissance moyenne plus élevée, tandis que les souches (S1) et (S3) présentent une plus grande variabilité. La croissance optimale pour toutes les souches se situe autour de pH 6 et pH 7.

Chapitre III : Résultats et discussion

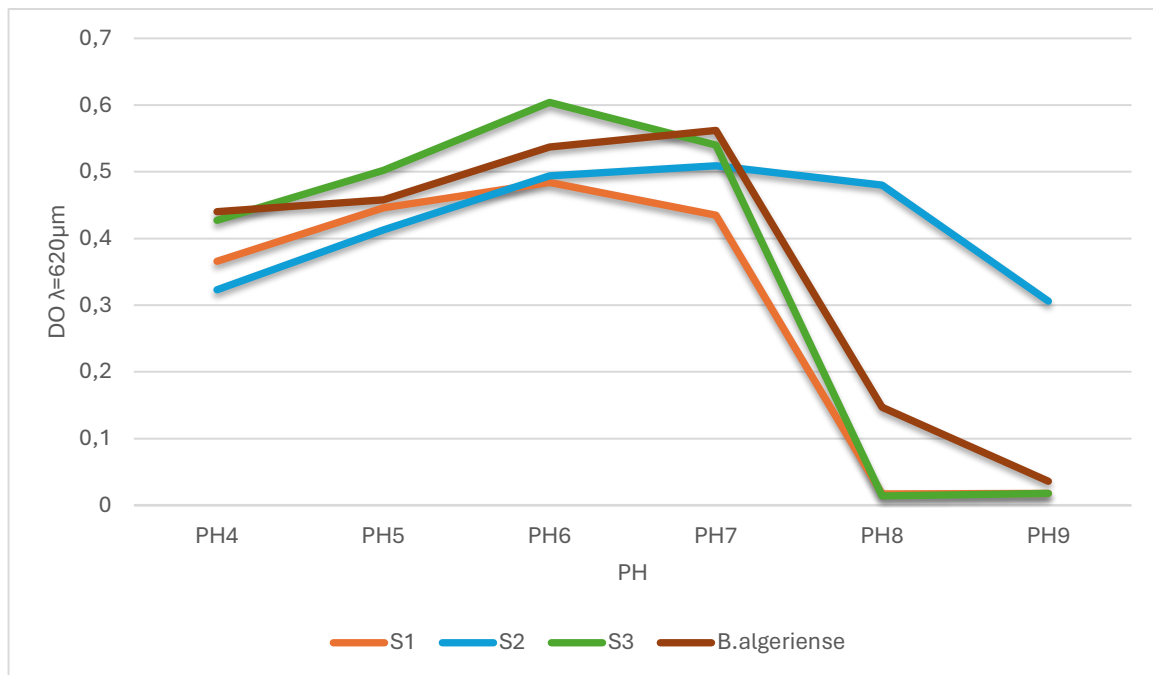


Figure 9 : Effet du pH sur la croissance des souches.

- **S1** : Présente la plage de pH optimal la plus étroite, avec la croissance la plus faible à pH 8 et la plus élevée à pH 6. Cela suggère une forte sensibilité aux niveaux de pH extrêmes.
- **S2** : Maintient une croissance relativement stable sur tout le spectre du pH, avec la croissance la plus élevée à pH 7. Cela indique une tolérance plus large aux variations de pH.
- **S3** : Présente la plus grande variabilité de croissance en fonction du pH. Elle montre la croissance la plus élevée à pH 6 et la plus faible à pH 8. Cela suggère une forte sensibilité, mais elle peut prospérer dans des conditions optimales (pH 6).

Ces résultats contrastent avec les résultats d'El Hilali (2006), qui suggéraient une moindre influence négative de l'alcalinité sur la survie des rhizobiums, avec une tolérance à des pH allant jusqu'à 9 pour la majorité des souches.

De plus, les recherches d'Appunu et Dhar (2006) ont mis en évidence un lien entre l'acidité du sol et la limitation de la fixation symbiotique de l'azote, expliquée par une réduction de la survie des rhizobiums.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.2 . Effet de la température sur la croissance des souches étudiées

Ces résultats ont été obtenus en examinant l'effet de la température sur la croissance de trois souches (S1, S2 et S3). Les données recueillies révèlent une croissance variable à des températures de 26°C, 28°C, 30°C et 32°C (**Figure 10**).

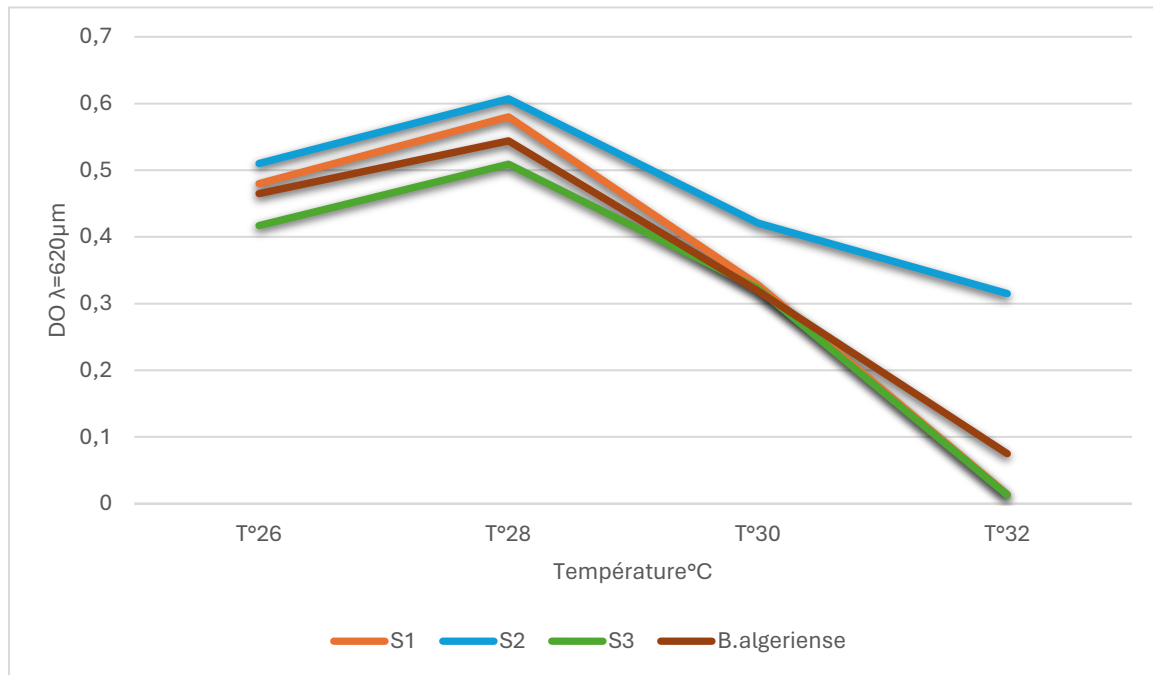


Figure 10 : Effet de la température sur la croissance des souches.

Il est intéressant de noter que la souche S2 montre systématiquement une croissance supérieure à celles de S1 et S3, où l'on constate que la croissance se situe entre 28 et 30 °C.

Une température de 28 °C semble être la condition optimale pour toutes les souches, en particulier S2 et S3, qui atteignent toutes deux leur croissance maximale à cette température.

La souche S1 présente la croissance minimale la plus faible à 32 °C et la variance la plus élevée, ce qui indique une moindre résistance aux variations de température. Cela suggère une sensibilité potentielle aux changements de PH.

Le caractère mésophile des Rhizobia a été mis en évidence par Graham (1992) et Zahran (1999). Ces chercheurs ont montré que la plage de température optimale pour la croissance des rhizobia se situe entre 28 et 31 °C. Il est important de noter que de nombreuses souches rhizobiennes ne peuvent pas se développer à des températures supérieures à 37 °C.

II.4 . Caractérisation biochimique des souches étudiées

À la suite de l'incubation, les données obtenues ont fait l'objet d'une analyse approfondie, et les résultats sont présentés dans le **tableau 2** :

Tableau 2 : Résultats de la caractérisation biochimique.

SOUCHES	ONPG	ADH	LDL	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
S2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

- **Recherche de la β -galactosidase (test ONPG)**

La souche S2 présente un résultat négatif (Tableau 3), donc ils ne possèdent pas la β -galactosidase, contrairement à la souche S1 qui marque le virage de couleur indiquant la possession de l'enzyme β -galactosidase et suggèrent que la bactérie peut fermenter le lactose.

- **Assimilation des sucres comme seule source de carbone**

Les tests GLU et SAC ont mis en évidence que toutes les souches étudiées ne peuvent pas absorber le sucre comme source de carbone, à l'exception de la souche S2 qui a démontré une absorption positive.

- **Assimilation des acides aminés comme source d'azote**

Les résultats des tests ADH, ODC et LDC ont révélé que toutes les souches étudiées sont capables d'assimiler l'arginine, l'ornithine et la lysine, respectivement (**Figure 11**).

Ces résultats suggèrent une capacité polyvalente des souches à utiliser une variété de sources d'azote et une flexibilité métabolique dans l'acquisition d'azote.

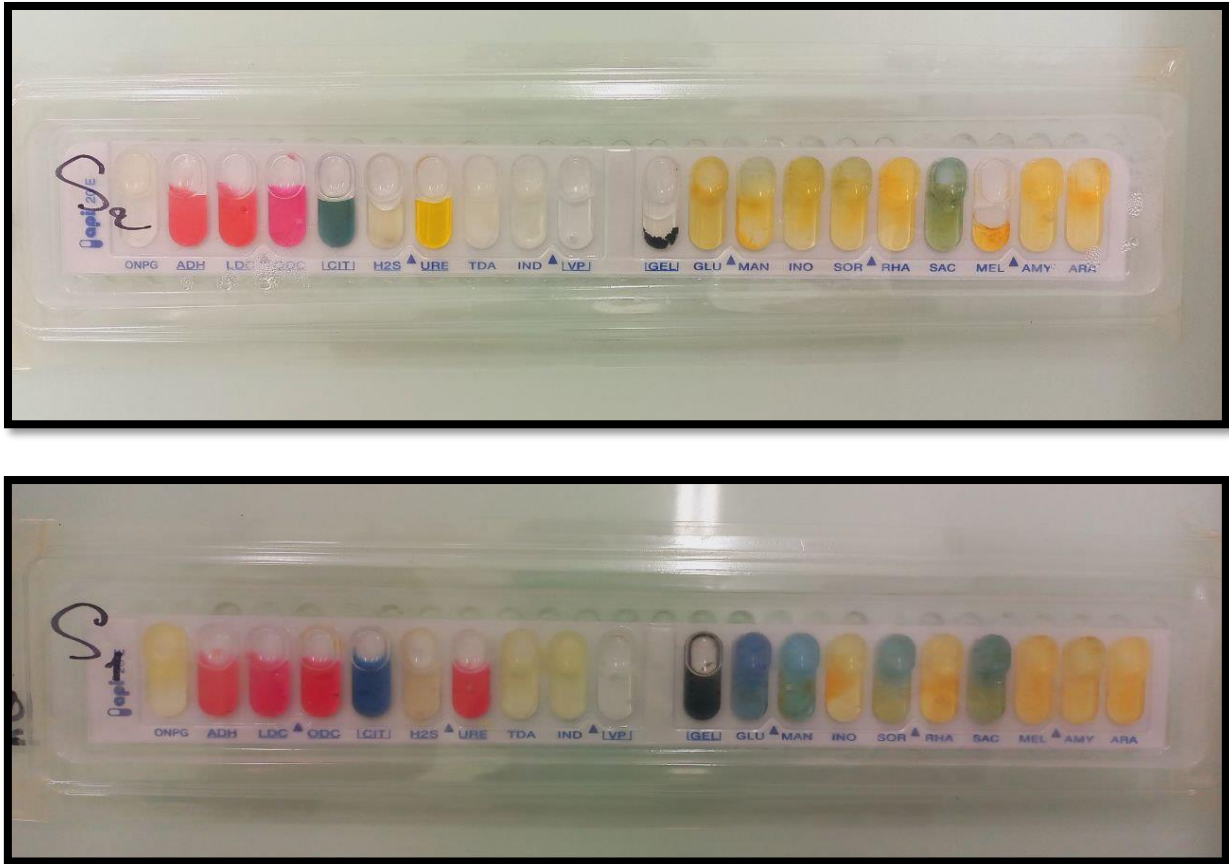


Figure 11 : Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries AP20.

- **Hydrolyse de l'urée**

La présence de l'enzyme uréase chez la souche S1 lui confère un avantage métabolique en lui permettant de recycler l'azote et de synthétiser des composés azotés essentiels, comme en témoigne la coloration rose du milieu de culture. Les autres souches, dépourvues de cette capacité, présentent une coloration jaune du milieu, indiquant l'absence d'hydrolyse de l'urée et de son implication métabolique.

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons mené une caractérisation phénotypique de trois souches rhizobiennes isolées à partir de nodules racinaires de légumineuses, en comparaison à une souche de référence du genre *Bradyrhizobium*.

L'analyse des caractéristiques culturales et cellulaires a révélé que les souches isolées forment des colonies blanches opaque ou translucides. Les cellules, de type petits bâtonnets mobiles à Gram-. Parmi ces souches, la souche S1 se distingue par la présence d'exopolysaccharides.

Les tests physiologiques indiquent que la croissance des souches est optimale à 28 °C. La majorité des souches testées présentent une très bonne croissance entre pH 6 et pH 7.

Les résultats de la caractérisation biochimique montrent que tous les isolats produisent une réaction d'alcalinisation, à l'exception de la souche S2 qui montre une réaction d'acidification. Concernant le test de la fermentation du Saccharose, du Citrate et de la Tryptophan Désaminase (TDA) et du H₂S, les isolats testés ont révélé des résultats négatifs.

Grâce à la caractérisation physiologique des souches rhizobiennes isolées ; notre étude met en lumière leur potentiel d'utilisation dans les environnements arides et semi-arides. Ces résultats encouragent de nouvelles recherches sur l'exploitation des rhizobiums comme alternative aux engrais chimiques, contribuant potentiellement à la durabilité environnementale et économique.

REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

A

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

Appunu, C et Dhar, B. (2006). Symbiotic effectiveness of acid-tolerant Brady rhizobium strains with soybean in low pH soil Africa Journal of Biotechnology.5(10).842-845.

B

Bøckman, O. C., Kaarstad, O., Lie, O. H., & Richards, I. Agriculture et fertilisation (les engrais-leur avenir. Leur rôle dans l'alimentation de notre planète. Les défis de l'environnement. Y-a-t-il une alternative ?).

BELMESSIKH A. et MERGOUD L. (2021). TP_n_2_MICROBIOLOGIE.pdf.Techniques d'ensemencement et d'isolement des microorganismes,4p.

E

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

Frink, C. R., Waggoner, P. E., & Ausubel, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1175-1180.

G

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.

J

Jordan, D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae. Conn 1938.p.234-254. In: N.R Krieg and J.H. Holt (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. The William and Wilkins Co., Baltimore. 234- 242.

Jordan D.C. (1984). Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams et Wilkins. Baltimore. USA. Pp 234-244.

Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. et Stevens P. (2001). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Ed : de boeck. pp.415-418.

M

Maxted N et Bennett, S.J. (2001). 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.

N

N'Dayegamiye, A., Giroux, M., & Gasser, M. O. (2007). La contribution en azote du sol reliée à la minéralisation de la MO : facteur climatique et régions agricoles influençant les taux de minéralisation d'azote. In *Colloque sur l'azote, CRAAQ-OAQ* (pp. 2-17).

P

Pedrosa, F. D. O., & Yates, M. G. (1988). Physiology, biochemistry, and genetics of azospirillum and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. *Critical reviews in plant sciences*, 6(4), 345-384.

Peyraud, J. L., Cellier, P., Aarts, F., Béline, F., Bockstaller, C. C., Bourblanc, M., ... & Veysset, P. (2012). *Les flux d'azote liés aux élevages : réduire les pertes, rétablir les*

Références bibliographiques

équilibres (Doctoral dissertation, ministère de l'Alimentation, de l'agriculture et de la pêche et ministère de l'Écologie, de l'énergie, du développement durable, des transports et du logement).

R

Roger, P., Dommergues, Y., Balandreau, J., & Dreyfus, B. (1996). La fixation biologique de l'azote : Quelles potentialités pour le développement. *Ostrom, France, 32.*

S

Sadowsky, M.J. and Graham, P.H. (1998). Soil biology of the Rhizobiaceae. 155-172 p.

W

Weir B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ rhizobia. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.

Site web

<https://earthclipse.com/environment/process-of-nitrogen-cycle.html>

<https://byjus.com/biology/nitrogen-cycle/>

https://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/nitrification.php

<https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-Bacterie-Rhizobium-Symbiose.html>

<https://agriculture.gouv.fr/les-legumineuses-une-famille-de-vegetaux-redecouvrir>

<https://theory.labster.com/fr/steps-gramstain/>

ANNEXES

Annexes

Annexe I

Composition des Milieux de Cultures.

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol.....	10.00g
K ₂ HPO ₄	0.50g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.20g
NaCl.....	0.10g
Extrait de levure.....	0.50g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	6.8

Ajusté à ph 6.8

Stériliser à 120°C pendant 30min.

Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMB.....	1000ml
Agar.....	18g
Ph.....	6.8

Ajusté à ph 6.8

Stériliser à 120°C pendant 30min.

Annexes

Annexe II

La moyennes des différents tests effectués

Tableau 4 : La moyenne des DO obtenue aux différents pH.

Souches	PH4	PH5	PH6	PH7	PH8	PH9
S1	0.366	0.446	0.484	0.435	0.017	0.018
S2	0.323	0.413	0.494	0.509	0.480	0.306
S3	0.427	0.502	0.604	0.54	0.014	0.018
<i>B. algeriense</i>	0.440	0.458	0.537	0.562	0.147	0.036

Tableau 5 : La moyenne des DO obtenue aux différentes températures

Souches	T°26	T°28	T°30	T°32
S1	0.48	0.58	0.328	0.014
S2	0.51	0.607	0.421	0.315
S3	0.417	0.509	0.323	0.013
<i>B. algeriense</i>	0.465	0.544	0.319	0.075

Résumé

Notre étude vise à explorer de manière approfondie les caractéristiques phénotypiques de trois souches de Rhizobia en examinant leurs propriétés cellulaires, morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les analyses révèlent que toutes les souches sont mobiles et Gram-. Les tests biochimiques mettent en lumière la diversité de ces souches. De plus, les trois souches étudiées présentent une croissance optimale entre pH 6 et 7 et affichent un développement maximal à 28 °C.

Compte tenu du potentiel prometteur de ces souches rhizobiennes pour la restauration des sols arides, il est crucial d'étendre l'investigation à d'autres régions et d'approfondir les connaissances par des tests en conditions réelles.

Mots clés : croissance, pH, phénotypique, Gram-, physiologiques.

Abstract

Our study aims to comprehensively explore the phenotypic characteristics of three Rhizobia strains by examining their cellular, morphological, physiological, and biochemical properties.

Analyses revealed that all strains are mobile and Gram-negative. Biochemical tests highlighted the diversity of these strains. Additionally, the three strains studied exhibited optimal growth between pH 6 and 7 and displayed maximum development at 28 °C.

Given the promising potential of these rhizobial strains for arid land restoration, it is necessary to extend the investigation to other regions and deepen knowledge through real-world testing.

Keywords: Growth, pH, phenotypic, gram-, physiological.

ملخص

تهدف دراستنا إلى استكشاف الخصائص الظاهرية لثلاث سلالات من الريزوبيا بشكل شامل من خلال فحص خصائصها الخلوية والشكلية والفسولوجية والكيميائية الحيوية.

أظهرت التحليلات أن جميع السلالات متحركة وسلبية الجرام. أبرزت الاختبارات الكيميائية الحيوية تنوع هذه السلالات. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت السلالات الثلاث المدروسة نموًا مثاليًا بين الأس الهيدروجيني 6 و7 وأظهرت أقصى تطور عند 28 درجة مئوية.

نظرًا لإمكانية هذه السلالات الريزوبية الواعدة في استعادة الأراضي القاحلة، فمن الضروري توسيع نطاق التحقيق ليشمل مناطق أخرى وتعميق المعرفة من خلال الاختبارات في الظروف الواقعية.

الكلمات المفتاحية: نمو درجة الحموضة، نمط ظاهري، سلبي جرام، فسيولوجية.