



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

Attaf Zoulikha

Le : dimanche 24 juin 2018

Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant les Astragales de la région de Biskra.

Jury :

Mme. MOKRANI Djamila	MAA	Université de Biskra	Promoteur
M. BELKESSA	MAB	Université de Biskra	Président
Mme. HAMMIA	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 - 2018

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur M^{me} MOKRANI Djamila. D'avoir bien voulu nous encadré tout au Long de cette étude de toute confiance qu'elle nous a accordée en nous Confiant ce travail ainsi que ses conseils scientifiques et son Encouragement.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon oncle Dr. Attaf Abd ALLAH ET sa femme M^{me} Saidi Hanane pour leur conseil et leur efforts avec moi.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ingénieur de laboratoire Baia Abd el Kader pour la prise en charge de notre travail.

J'adresse mes sincères remerciements aux responsables de laboratoire de Département de Science de la Nature et de la Vie

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions

A tous les enseignants du département des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie.

A tous nos collègues qui ont participé et aidé au bon déroulement de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Aux êtres les plus chers dans le monde : mon père Bachir , ma mère Saida

A mon chère Frère Fateh et sa femme Nadjima

Et

A mes chères frères : Mohamed Chirif et Abd El Hak

A mes sœurs que j'aime beaucoup : Nawaim, Sana, Halima Et Chaima

A mes cousines : Amel, Marwa, Safaa, Saida Et Asmaa

Une spéciale dédicace à : mon oncle Dr. Attaf Abd ALLAH ET sa femme

M^{me} SAIDIHANANE

A tout ma famille : Attaf

A tous mes amis sans exception : Hadjer, Ikram, Sara

A tout mes collègues sans exception : Fatima , Ilhem, Halima, Sarra

A toute ma promotion de Biologie

Je te dis merci et merci tous.

A toutes les personnes qui m' ont aidé pour l'élaboration de ce travail

A toutes les personnes qui connaissent Zoulikha Attaf

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Généralité

1.1.Legumineus.....	03
1.1.1.Classification des legumineuses	03
1.1.2.Genre <i>Astragalus</i>	04
1.1.2.1.Espece <i>Asragalus gombo</i>	04
1.1.2.2.Espece <i>Astragalus marioticus</i>	04
1.1.2.3.Espece <i>Astragalus armatus</i>	04
1.1.2.4. Espece <i>Astragalu scrusiatus</i>	05
1.1.3.Importance d'Astragalus.....	07
1.2.Bacterie Nodulant Legumineuses.....	07
1.2.1.Caracteres Generaux.....	08
1.2.1.Classification des BNL.....	08
3.1.Mecanisme de nodulation.....	10
1.3.1.Formation des Bacteroides.....	10
1.3. Infection et nodulation.....	10
1.3.2.1.Infection.....	10
a.Phase de pre-infection.....	11
b.Phase de l'infectionet de la formation des nodule.....	11
c.Phase de fonctionnement des nodules.....	11
d.Phase de dégénérescence.....	11

Partie II : partie expérimentale**Chapitre 2 : matériels et méthodes**

2.1. Isolement des bactéries a partir des nodules conservées.....	13
2.1.1 stérilisation des nodule.....	14
2.2.Caractérisation morphologique et culturaux.....	15
2.2.1.Principaux milieu de culture utilises.....	15
2.2.2. Purification des isolats.....	15
2.2.3. Conservation des isolats.....	15
2.3. Examen microscopique.....	16
2.3.1.Coloration de Gram.....	16
2.4. Caractérisation phénotypique des isolat.....	16
2.4.1. Tests de galerie api 20E.....	16
2.4.2. Sensibilité aux phages.....	17
2.4.2.1. Isolement des bactériophages.....	18
2.4.2.2. Analyse des phages par la méthode de double couche.....	18
2.4.3. Résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	19
2.4.4. Résistance intrinsèque aux métaux.....	19
2.5.Tolerance aux chlorure de sodium.....	19
2.6.Effet de la température.....	20
2.7.Examen de la mobilité.....	20

Chapitre 3 : Résultats et discussions

3.1. Caractérisation morphologique et culturaux des isolats.....	22
3.1.1. Isolement et identifications.....	22
3.1.2. Croissance sur YMA+RC.....	23
3.1.3.Coloration de Gram.....	24
3.1.4 Tests de galerie api 20E	24
3.1.4.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone.....	25
3.1.4.2. Assimilation des acides aminés comme source d'azote.....	25
3.1.4.3..Hydrolyse de l'urée.....	26
3.1.4.4. Réduction du nitrate.....	26
3.1.4.5. Hydrolyse de gélatine.....	27
3.1.4.6. Recherche de la β -galactosidase (Test ONPG).....	27

3.1.5. Sensibilité aux phages.....	26
3.1.6. Résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	27
3.1.7. Résistance intrinsèque aux métaux.....	28
3.1.8. Tolérance aux chlorure de sodium.....	29
3.1.9. Effet de température.....	30
3.1.10. Mobilité des souches.....	32
Conclusion.....	33
Référence bibliographique.....	34

Annexe

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 01	Classification des <i>Rhizobiacées</i>	08
Tableau 02	Solutions d'antibiotiques utilisés.....	19
Tableau 03	Identification des isolats en utilisant système l'API 20 E.....	24

Liste des figures

Figure .1 :	Espèce <i>Astragalus gombo</i>	05
Figure 2 :	Espèce <i>Astragalus marioticus</i>	05
Figure 3 :	Espèce <i>Astragalus armatus</i>	06
Figure 4 :	Espèce <i>Astragalus cruciatus</i>	06
Figure .5 :	Processus de la nodulation.....	12
Figure 6 :	Localisation géographique des zones de prélèvement	14
Figure 7 :	Technique d'isolement par la méthode des cadrons.....	15
Figure 8 :	Conservation des shouches dans le milieu YMA+CaCO ₃	16
Figure .9:	Inoculation de preculture dans système API 20E	17
Figure 10:	Mannitol mobilite.....	21
Figure 11:	Morphologie et la Croissance des isolats sur YMA+RC.....	23
Figure 12 :	Identification des isolats en utilisant système l'API 20E	28
Figure 13:	Sensibilité des isolats aux bacteriophage (Photos original).....	29
Figure 14:	Effet des différents antibiotiques sur la croissance des souches nodulant d'astragalus.....	30
Figure.15 :	Effet des métaux lourds sur la croissance des souches nodulant d'astragalus.....	31
Figure 16 :	Tolérance au Chlorure de Sodium.....	32
Figure 17:	Effet de tamperature.....	33
Figure 18 :	Mannitol mobilité.....	34

Liste des abréviations

A	<i>Astragalus</i>
ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide Désoxynucléique
AMY	Amygdalin
ARA	Arabinose
ARN	Acide Ribonucléique
BNL	Bactéries Nodulant les Légumineuses
CIT	Citrate
GEL	Gélatinase
GLU	Glucose
H	Heure
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
IND	Indole
INO	Inositol
LDC	Lysine décarboxylase
MAN	Mannitol
MEL	Melibiose
MNA	Mannitol Nitrate Agar
MNB	Mannitol Nitrate Broth
Nal	Nalidixicacid
Neo	Neomycin sulfate
Nor	Nofloxacin
ODC	Ornithine décarboxylase
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside
PCR	Réaction en chaine par Polymérase
RC	Rouge Congo
REP	Réseau d'éducation prioritaire
RFLP	Restriction Fragment LengthPolymorphism
RHA	Rhamnose
SAC	Saccharose

Liste des abréviations

SOR	Sorbitol
TDA	Tryptophane désaminase
URE	Uréase
VP	Pyruvate de sodium
YMA	Yeast Mannitol Agar
YMB	Yeast Mannitol Broth
YS	Yeast Saccharose

Introduction

Introduction

L'atmosphère terrestre est composée à peu près de 80% de N₂. L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier (Zahran,1999).

Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrate (NO₃⁻) ou parfois, d'ions ammonium (NH₄⁺). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Drevon et Hinsinger, 2004).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est une propriété de certains procaryotes. Cette fixation se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N₂) en ammoniaque (NH₃), forme de l'azote assimilable par les végétaux (Mbengue, 2010).

Les plants fixateurs d'azote ont le double avantage d'améliorer la fertilité des sols appauvris et de fixer les sols érodés. Parmi les espèces de Légumineuses capables de s'associer en symbiose avec les Rhizobia,des milliers ont été répertoriées (Coizhy1988 ; Faria et *al.*, 1989).

Les légumineuses constituent une source importante de protéines et des lipides dans l'alimentation humaine et animale. Elles ont une particularité biologique qui leur permet de s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées), pour former des organes symbiotiques « les nodosités» au sien des quels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par les plantes (Mylonaet *al.*, 1995)

La symbiose (légumineuses/ BNL) présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés et améliorer les rendements des cultures et la fertilité des sols (Riah, 2014).

Le genre *Astragalus L.* présenté par des plantes fleurissantes, contient plus de 2500 espèces, la plupart du temps pérennes. Ce genre est réparti dans des régions climatiques méditerranéennes, le long des côtes pacifiques de l'Amérique du Sud du et, en Europe méridionale et l'Afrique du Nord (Baziza et *al.*, 2013).Ces bactéries induisent sur la racine de la plante hôte et induisant la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) connues à ce jour, sont des bactéries Gram négatif, appartenant à la sous-classe α ou β des protéobactéries(Zakhia,2004).

L'objectif de notre travail est d'étudier la caractérisation phénotypique des bactéries associées aux nodules d'*Astragalus* récolté des différentes régions de Sud-Est Algérien (Biskra) et valoriser le patrimoine national des légumineuses spontanées surtout dans les zones Sahariennes. Notre travail est constitué de 3 chapitres :

- Le premier chapitre sous forme d'une synthèse bibliographique, comporte des généralités sur la symbiose légumineuse-BNL ainsi que les étapes de nodulation.
- Le deuxième chapitre, matériel et méthodes, comprenant les tests de galerie API 20E, la sensibilité des souches aux rhizobiophages, et aux antibiotiques, la résistance intrinsèque des souches aux différents métaux, l'effet de température et la tolérance de chlorure de sodium.
- Le troisième chapitre comprenant les résultats et discussions, conclusion et perspectives.

Partie I : Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1 : Généralité

1.1. Légumineuses

Les légumineuses représentent une des familles les plus importantes et les plus variées des *Angiospermes* réparties sur une aire géographique diversifiée. Seul un nombre réduit des espèces sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale, certaines sont des espèces médicinales et quelques-uns sont toxiques. Les légumineuses viennent en second lieu après les cultures céréalières (Cheriet, 2015).

Cette famille, l'une des plus importantes du règne végétale (10 000 espèces environ).est caractérisée par un ovaire forme d'un seul carpelle qui se transforme en un fruit d'un type particulier, appelé autrefois *légume* et que l'on désigne plutôt actuellement sous le nom de *gousse*.(Ozenda,2004).

1.2. Classification des légumineuses

-Les *Mimosoideae*

Les fleurs sont symétriques. Sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (Glycine, Acacia,...) (Maxted et Bennett, 2001).

- Les *Caesalpinioideae*

Sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des *Caesalpinieae* et *Cassieae* ; les tribus *Cercideae* et *Amherstieae* étant très peu nodulées(Maxted et Bennett, 2001).

- Les *Papilionaceae* ou *Fabaceae*

Représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, sont habituellement incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil, ou avec une étamine. Parmi les 21 %d'espèces déjà examinées la grande majorité (97%) sont nodules (pois, haricot, fève, lentille...) par les rhizobia (Maxted et Bennett, 2001).

1.1.2. Genre *Astragalus*

L'*Astragalus* (*Fabacée*), est un genre largement distribué dans toutes les régions tempérées du monde. (Rios, 1997). Ce genre, le plus important de la famille des légumineuses, comporte plus de 1500 espèces, la plupart d'orient ; une cinquantaine d'espèces se rencontrent en Afrique du nord et quinze environ au Sahara.(Ozenda,2004).

A. Gosse épaisse, renflée, dépassant un centimètre de diamètre, droite ; fleurs jaunes, grandes. **Série I** .

B. Gosse étroite, ne dépassant pas cinq millimètres de diamètre, droite ou fortement arquée ; fleurs de teint variable.

1. Gosse arquée en demi-cercle, plus ou moins dilatée. **Série II**.

2. Gosse droite ou peu arquée, plus ou moins dilatée. **Série III**.(Ozenda, 2004).

Le genre *Astragalus* est assez bien représenté en Algérie. En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'astragales (45 taxons en comptant les sous espèces). Ces espèces se divisent en espèces annuelles et vivaces qui colonisent plusieurs types d'habitat et appartiennent à différentes aires de répartition (Baziz, 2015).

1.1.2.1. Espèce *Astragalus gombo*

Plantes à tige bien développée, élevée ; fleures en grappes axillaires, sessiles ou presque feuilles de grande taille, à pétioles robustes à très nombreuses folioles (Ozenda,2004). Fleur grande, de 25 mm ; gousse à parois épaisses ligneuse très dure, ornée de grosses nervures et terminée en bec robuste et long Assez commun dans tout le Sahara Endémique. (Figure 1) (Ozenda,2004)

1.1.2.2. Espèce *Astragalus maréoticus*

D'après Delille en (1813), l'*Astragalus mareoticus* est un échantillon complet avec fleurs et fruits, stigmat non bardu, gousse presque glabre, à poils courts ; fleurs bleuâtre-pale, feuilles longues à 6-8 paires de folioles commun au Sahara (Figure 2). (Ozenda, 2004)

1.1.2.3. Espèce *Astragalus armatus*

Plante très épineuse, Les Pétiole devenant dures et aigus, feuilles pennées à folioles petites, très caduques, rameaux écailleux, glabres, gousse uniloculaire non divisée longitudinalement par une cloison, à parois parcheminées, calice renflé en vésicule, enfermant

le fruit ; Lisière nord du Sahara, en bordure des hauts plateaux.(Figure3)
(Ozenda, 2004)

1.1.2.4. Espèce *Astragalus cruciatus*

Astragalus cruciatus est un groupe de fruits, montrant nettement l'épaississement des gosse à leur base, grappe de gosse a pédoncule allonge, dépassant nettement la feuille axillant, au moins dans la haut de la plante. Commun dans tout le sahara (Figure 4).(Ozenda, 2004)



Figure.1 .Espèce *Astragalus gombo*



Figure..2 :Espèce *Astragalus marioticus*



Figure. 3 : Espèce *Astragalus armatus*



Figure.4 : Espèce *Astragalus cruciatus*

1.1.3. Importance d'*Astragalus*

L'*Astragale* contient de nombreux éléments actifs, tels que des flavonoïdes, des polysaccharides, des glycosides tri terpènes, des acides aminés et des traces de minéraux (Saoudi, 2008).

-Du point de vue économique et industriel, certaines espèces sont utilisées comme source de gomme adragante, substance largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et dans la production de divers produits alimentaires comme les crèmes glacées, les lotions, les spiritueux et les gommes à mâcher.

-En médecine traditionnelle, les plantes sont utilisées depuis des millénaires par les Hindous et les Chinois. En Inde, la pâte de feuilles est utilisée pour réduire le taux de sucre dans le sang, alors que les racines sont mâchées par les femmes pour stimuler la lactation. D'autres espèces présentes des activités antituberculeuses, antitussives et de purification du sang.

-En Chine, les racines d'*Astragales* sont utilisées comme traitement du diabète et des néphrites. Elles sont également utilisées pour la régénération des tissus, la cicatrisation des plaies et la fabrication de médicaments visant à renforcer le système immunitaire après les traitements anti cancéreux.

-Un grand nombre d'*Astragales* est utilisé pour l'alimentation du bétail. D'autres espèces sont toxiques

-Les propriétés immunitaires de cette plante semblent ramener à un niveau normal le nombre de cellules T (un globule blanc de la famille des lymphocytes) dans les cas de certains cancers.

- Comme agent thérapeutique, l'astragale est recommandée dans les cas de: faiblesse, engourdissements, asthme, nervosité, tendance aux infections, transpirations nocturnes, rhumes et gripes, douleurs arthritiques, déficience du système immunitaire et insuffisance de-L'Astragale contient également un flavonoïde nommé astragaline, qui est un puissant antioxydant(Saoudi, 2008).

1.2. Bactéries nodulant les légumineuses

Les rhizobia sont les bactéries aérobies du sol, leur nom signifie étymologiquement ce qui vit dans les racines. Les rhizobia sont les partenaires symbiotiques des légumineuses, ils induisent la formation des nodules à l'intérieur desquels ils fixent l'azote atmosphérique en Ammoniac forme utilisable par les plantes en échange, la plante hôte fournit à la bactérie un

micro-habitat favorable et les substrats carbonés issus de la photosynthèse (Ouslim, 2016). La symbiose légumineuse/BNL est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux *rhizobia* pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven et al., 2000).

1.2.1. Caractères généraux

Les Rhizobia sont des bactéries Gram négatives, strictement aérobies, possédant une forme des bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur et non sporulant (Jordan, 1984). Ces sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

1.2.2. Classification des BNL

Selon le Bergues Manuel (Jordan, 1984) les rhizobia appartiennent au règne des procaryotes, à la division des *Gracilicutes*, au domaine des *Bacteria*, à l'embranchement des *Proteobacteria*, à la classe Alpha, à l'ordre *Rhizobia* les et à la famille *Rhizobiaceae*.

Une nouvelle classification des rhizobia a été décrite par Mitchell Andrews * and Morag E. Andrews (2017) (Tab 01).

Tableau 01 : Classification des *Rhizobiacées* par Mitchell Andrews * and Morag E. Andrewes (2017)

Papilionoidieae Tribes and Genera	Rhizobia-Field
<i>Cicereae</i>	
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Cicer canariense</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Fabeae</i>	
<i>Lathyrus aphaca, L. nissolia, L. pratensis</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Lathyrus japonicas</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Lathyrus odoratus</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Lens culinaris</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia amoena, V. bungei, V. villosa</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia cracca</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia hirsuta</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia faba</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia multicaulis, V. sylvatica, V. tetrasperma</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia sativa</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Vicia sepium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Galega</i>	<i>Neorhizobium</i>
<i>Galega officinalis</i>	
<i>Galega orientalis</i>	<i>Neorhizobium</i>

Galegeae	
<i>Astragalus adsurgense</i>	<i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Astragalus aksuensis</i> , <i>A. betetovii</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Astragalus complanatus</i>	<i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Astragalus chrysopterus</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Astragalus discolor</i> , <i>A. efoliolatus</i> , <i>A. kifonsanicus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Astragalus melilotoides</i>	<i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i>
<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Astragalus mongholicus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Astragalus polycladus</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Astragalus scaberrimus</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Biserrula pelecinus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Carmichaelia australis</i> , <i>C. monroi</i> ,	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Clanthus puniceus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Colutea arborescens</i>	<i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Glycyrrhiza eurycarpa</i>	<i>Ensifer</i>
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Glycyrrhiza multiflora</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	<i>Ensifer</i>
<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Glycyrrhiza</i> sp.	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Lessertia annulans</i> , <i>L. capitata</i> , <i>L. diffusa</i> , <i>L. excisa</i> , <i>L. frutescens</i> , <i>L. herbacea</i> , <i>L. microphylla</i> , <i>L. pauciflora</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Lessertia</i> sp.	<i>Ensifer</i>
<i>Montigenanovae-zelandiae</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Oxytropis glabra</i>	<i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
<i>Oxytropis kansuensis</i> , <i>O. myriophylla</i> , <i>O. psammocharis</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Oxytropis meinshausenii</i>	<i>Rhizobium</i>

1.3. Mécanisme de nodulation

Si les nodosités des racines des légumineuses résultent d'une association symbiotique avec les bactéries *Rhizobium*, des nombreuses plantes non légumineuses fixatrices d'azotes (*Alnus*, *Comptomia* ...) forment des nodosités en association avec l'Actinomycètes *Frankia*.

Les lobes des nodosités correspondent à des extrémités racinaires modifiées qui s'étendent parfois pour former des racines ordinaires. Une fois qu'il a constitué des vésicules dans la nodosité racinaire, *Frankia* est capable de fixer l'azote libre de l'atmosphère du sol. La plante reçoit ainsi des composés azotés et fournit des sucres au microorganisme en retour (Nabors, 2004).

1.3.1. Formation des bactéroïdes

L'envahissement des bactéries dans des cellules de la plante hôte est débuté par la formation d'une gouttelette d'infection. Les gouttelettes d'infection peuvent former au bout des fils intracellulaires courts d'infection (par exemple dans haricots de *Phaseolus* ou plus habituellement, aux positions dans l'infection filète où la paroi des cellules devient abrupte et les cellules bactériennes entrent en contact direct avec la membrane de plasma de cellule. Les bactéroïdes mûrs de membrane de cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de polyhydroxy butyrate ou (PHB) (Juergen Prell *et al.*, 2006).

1.3.2. Infection et la nodulation

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation des nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (Anonyme, 2004).

1.3.2.1. Infection

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre, étapes majeures (figure 5) : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez *et al.*, 1991).

a. Phase de pré-infection

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre des bactéries au niveau des racines (**Richter, 1993**).

Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïde qui activent les facteurs *nod* déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales (**Hopkins, 1999**).

b. Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme de lors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux. Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (**Hopkins, 1999**).

d. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme de lors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux. Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (**Hopkins, 1999**).

La membrane péribactéroïdienne a pour rôle la stabilité du système hôte/symbiose ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (**Richter, 1993**).

e. Phase de dégénérescence

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol (**Richter, 1993**).

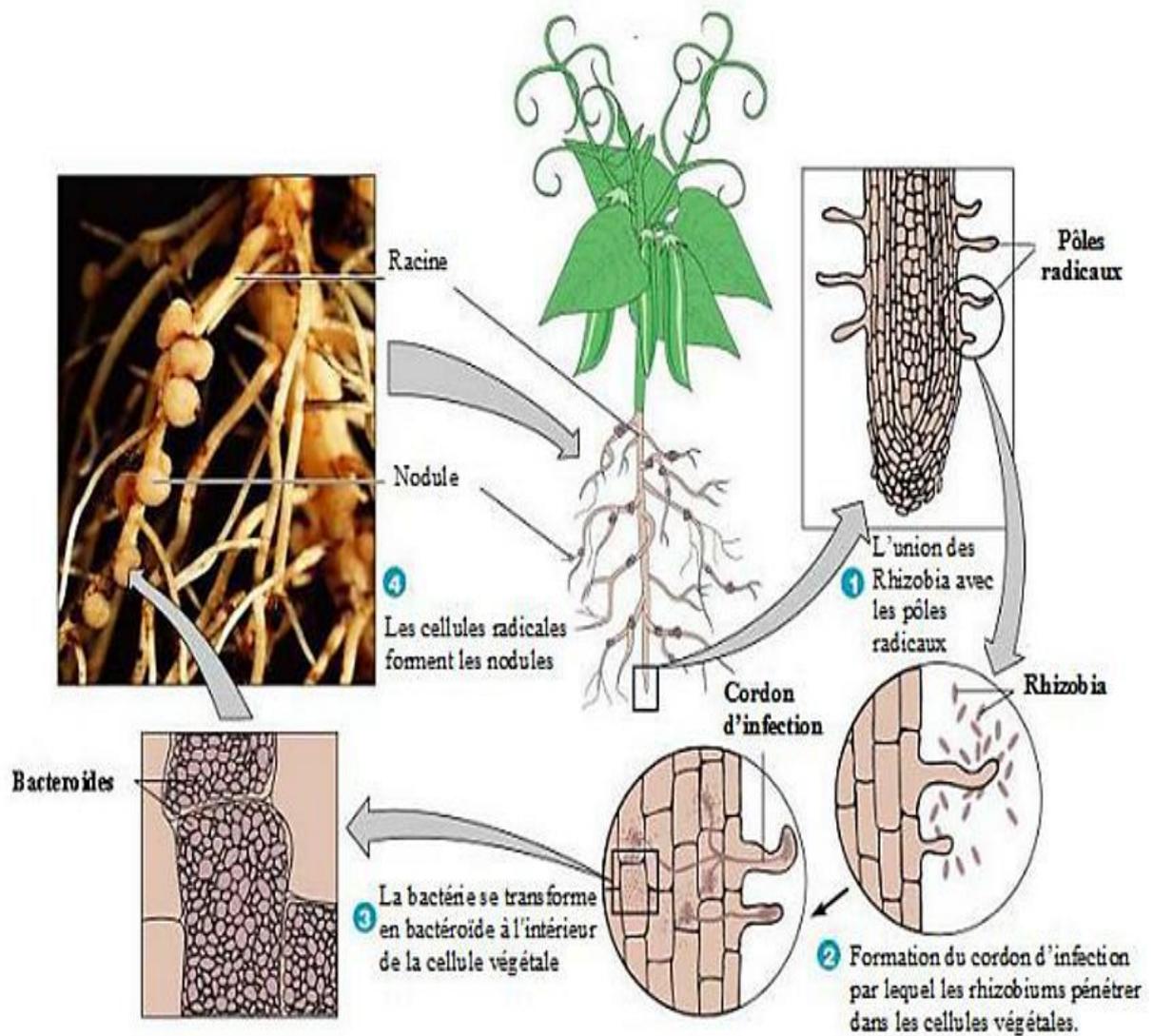


Figure 5 : Processus de la nodulation (Giles *et al.*, 2004)

Partie II

Partie Expérimentale

Chapitre II

Matériel et méthodes

2.1. Isolement des bactéries à partir des nodules conservés

Les nodules ont été obtenus à partir d'une collection faites par les étudiants des années passées dans plusieurs régions de Sud-Est Algérien. Nous avons choisi des échantillons collectés à partir, El Hadjeb et Fontaine des gazelles et El choucha de la wilaya Biskra.

Site de collecte des nodules

La wilaya de Biskra est située au Sud - Est de l'Algérie aux portes du Sahara. Avec une altitude de 112 m au niveau de la mer. Ce qui fait d'elle une des villes les plus basses d'Algérie. La wilaya s'étend sur une superficie de 21671 km² (Farhi, 2014). Elle est située entre le 4°15' et le 6°45' Est de longitude et entre le 35°15' et le 33°30' degré Nord de latitude. Son altitude varie entre 29 et 1600 mètres part rapport au niveau de la Méditerranée. Elle est limitée au Nord par les wilayas de Khenchela, de Batna et de M'sila, au Sud par les wilayas de d'Ouargla et El-Oued, à l'Est par la wilaya de Khenchela et à l'Ouest par la wilaya de Djelfa (MOUSSI, 2012).

Notre site d'échantillonnage est la Fontaine des Gazelles, à la Daïra d'El-outaya, wilaya de Biskra.

Notre deuxième site d'échantillonnage est la commune d'EL Hadjeb, wilaya de Biskra
Notre troisième site d'echantionnage est la région d'el choucha ala commune d'EL Hadjeb

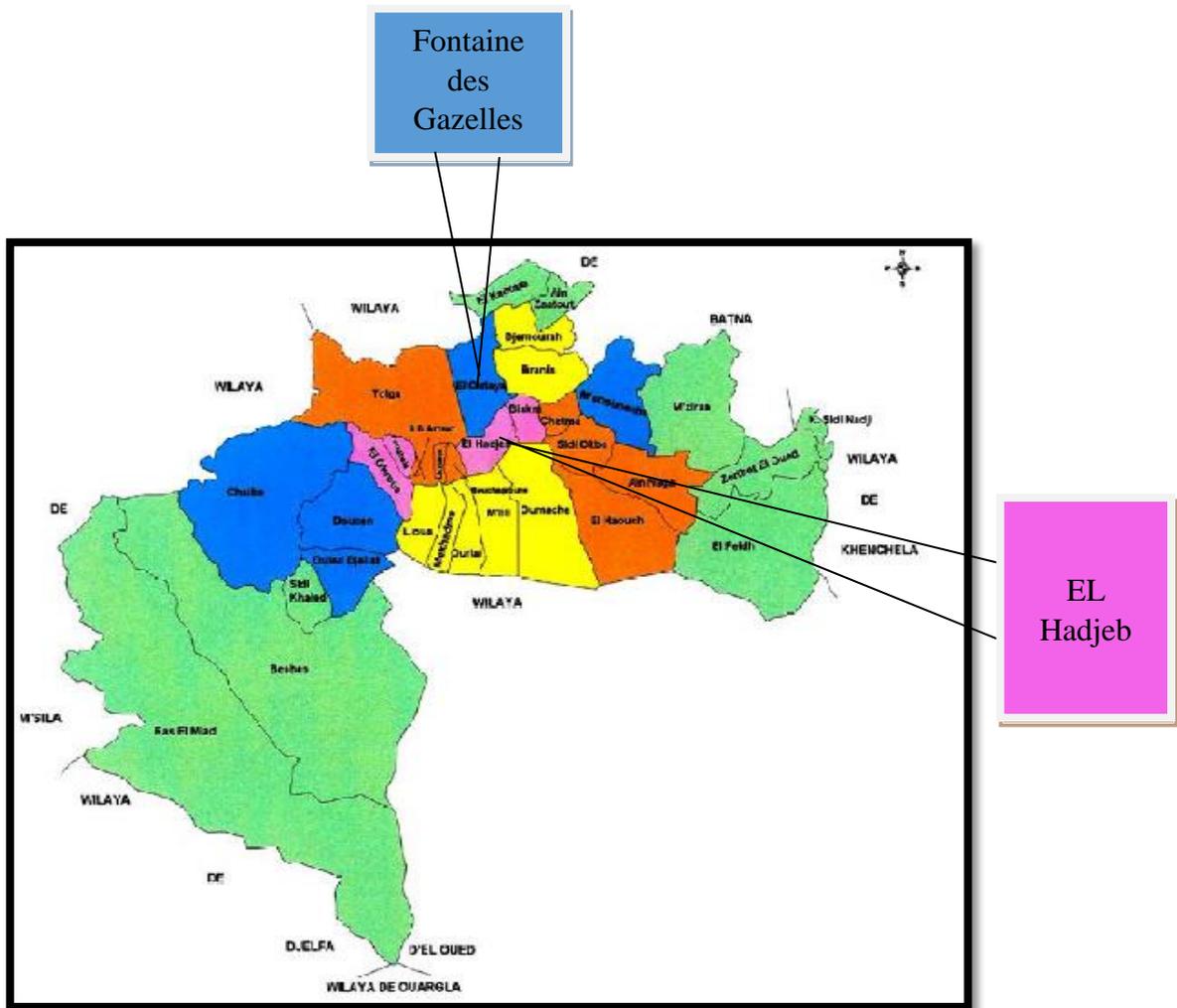


Figure 6 : Localisation géographique des zones de prélèvement dans la région de Biskra (Site web 2).

2.1.1. Stérilisation des nodules et Isolement des souches à partir des nodules (faites par les étudiants des années passées) .

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodule est étalé (Vincent, 1970), sur gélose coulé en boîte (YMA +RC) (voir Annexe 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quater cadrans (figure 7), de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser, les boites sont incubées 48 à 72 heures à 28°C.

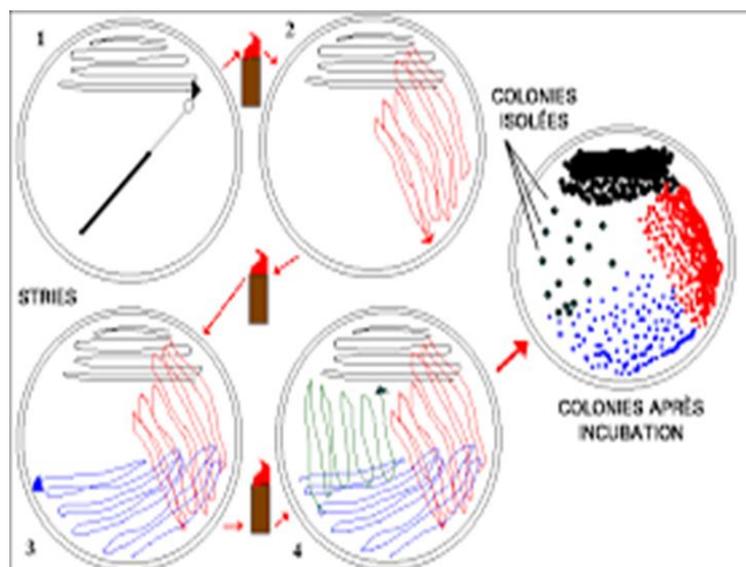


Figure7 : Technique d'isolement par la méthode des cadrons (Site web 3).

2.2. Caractères morphologique et cultureux

2.2.1. Principaux milieux de culture utilisés

La composition des différents milieux se trouve dans (annexe 1).

- Milieu liquide : - YMB (YeastManitolBroth).

- Milieu solide : -YMA (YeastManitol Agar).

-YMA+RC (YeastManitol Agar + Rouge Congo).

Le pH des milieux est ajusté à 6.8, et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 mn.

2.2.2. Purification des isolats

La méthode consiste à ensemercer sur le milieu YMA+RC. Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994) ; des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats sont nécessaires pour leur purification.

2.2.3. Conservation des isolats

Avant de conserver les souches, elles sont ensemençées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h (phase exponentiel) dans un

incubateur à une température de 28°C. La conservation est faite sur YMA additionné de 3g/l de carbonate de calcium (CaCO₃) comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés (figure :8). Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 28°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).



Figure.8. : Conservation des souches dans le milieu YMA+CaCO₃ (photo original).

2.3. Examen microscopique

2.3.1. Coloration de Gram

Des observations microscopiques ont été réalisées sur des lames dont la préparation de culture en YMA et étalée en couche mince, séchée et fixée .puis les lames subissent une coloration de Gram. L'examen microscopique a une importance majeure lors de la purification, car une lame homogène

2.4. Caractérisation phénotypique des isolats

2.4.1. Test sur galerie API 20E

Galerie API 20E de (BioMérieux, France) est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. La

galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les pré cultures fraîchement préparées ont été utilisées pour remplir les puits des galeries (figure9). Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par-dessus. L'ensemble est incubé à 28°C pendant 24 à 48h. Après addition des réactifs nécessaires à la révélation de différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant (voir annexe 2).



Figure 9 : Inoculation de pré culture dans les puits de galerie API 20E (photo original)

2.4.2. La sensibilité aux phages

La plupart des bactéries peuvent être infectées par les phages. L'environnement du sol abonde de virus qui peuvent infecter les microorganismes. Dans la mesure où l'interaction entre phages et leurs hôtes est fortement spécifique, elle peut faire l'objet d'outil pour les études écologiques des rhizobia. Ces derniers se distinguent par leur résistance et sensibilité aux bactériophages.(Saoudi ,2007).

D'après Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben(1994) la méthode est réalisée en deux étapes qui sont :

2.4.2.1. Isolement des bactériophages

Faire une récolte d'échantillons de sol là où se cultivaient les plantes. Prendre un échantillon de sol de la rhizosphère avec tout le matériel racinaire, nodules, ...et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

Dans 10 flacons de 150ml mettre 50ml de bouillon mannitol nitrate (MNB) (Vincent, 1970) (Annexes 1). Inoculer les flacons avec une souche bactérienne. Incuber à 28°C avec agitation. Quand la première série de cultures est en phase exponentielle de croissance (24 à 48h après inoculation), ajouter 1g de sol dans chaque flacon. S'assurer que chaque flacon est inoculé avec le sol des différents sites, incuber 18-20h à 25-30°C. Centrifuger la suspension pendant 12 mn4500 tours/mn ensuite filtré le surnageant sur membrane 0.20µm. Le filtrat contient les rhizobiophages qui, par leur taille, passe à travers la membrane filtrante. Ajouter au filtrat 10ml d'une culture fraîche de chaque souche utilisée. Incuber avec agitation 18-20h. Centrifuger puis filtrer. Reprendre l'opération deux fois. Le trouble des cultures bactériennes diminue sensiblement 8-10h après addition du filtrat phagique. Le dernier filtrat est la suspension phagique. Répartir le filtrat dans des tubes de 20ml et ajouter quelques gouttes de chloroforme ; conserver à 4°C.

2.4.2.2. Analyse des phages par la méthode de double couche

- Réaliser des dilutions 10 en 10 à partir des filtrats dans des tubes contenant 9ml de milieu YS (Annexe 1).
- Ajouter 0,1 ml de chaque dilution à des tubes contenant 2,5 ml de MNA mou et maintenir à 50°C.
- Additionner ce mélange à 0,5 ml d'une culture fraîche, bien mélanger et faire couler sur une boîte contenant du milieu YMA.
- Laisser les boîtes sécher pendant 10-15 mn et incuber pendant 24-72 h à 30°C.

2.4.3. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Les tests ont été réalisés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA solide. Les boîtes ont été subdivisées en 12 secteurs. Faites des puis dans Chaque secteur et remplirens les puis avec 10 µl d'une préculture fraîchement préparée (El-Hilali, 2006). Le milieu a été additionné de différentes quantités d'antibiotiques selon la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1985). Les solutions d'antibiotiques (voir tab) ont été stérilisées par filtration (filtre 0.22µm) puis additionnées au milieu YMA préalablement autoclavé et maintenu à une température de 55°C. Les antibiotiques ont été testés en µg/ml à des concentrations variant de 5 à 15 pour la norfloxacine, et de 10à 20 la neomycine sulfate, et de 130 à 150 pour l'acide nalidixique (voir annexe1). Les résultats de chaque test ont été évalués après une semaine d'incubation à 28°C.

Tableaux .2. Solutions d'antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Solvants
L'acide nalidixique	NaOH
Néomycine	Eau distillée
Norfloxine	Eau distillée

2.4.4. Résistance intrinsèque aux métaux

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à quatre différents types de métaux. Le test a été réalisé en suivant le même protocole de la sensibilité aux antibiotiques. Les solutions de différents métaux ont été stérilisées par filtration (Millipore 0,22 µm) puis additionnées au milieu YMA gélosé pour aboutir à des concentrations en µg/ml variant de 650 à 750 pour ZnCl₂, et de AlCl₂, de 450 à 550 pour CuCl₂, de 7à 9 pour HgCl₂. Les résultats de chaque test ont été évalués après une semaine d'incubation à 28°C.

2.5. Tolérance au Chlorure de Sodium

Pour tester la tolérance de nos isolats au NaCl à différentes concentrations nous avons utilisé le milieu YMB. Le NaCl est rajouté à la concentration voulue : 1% ; 2%,,3% et 5% et

10% La tolérance au NaCl est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la D.O. λ_{600} , après incubation 48h à 28°C.

2.6. Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YMA et incubées à différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C, 40°C

2.7. Examen de la mobilité

A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever de la suspension bactérienne de 24 heures, faire une piqûre centrale dans un tube de milieu manitol mobilité (figure 10), incubé pendant 24 heures à 30°C



Figure .10..mannitol mobilité (photo originale)

Chapitre 3

Résultat et discussion

3.1. Caractérisation morphologique et culturaux des isolats

3.1.1. Isolement et identification

Dans ce travail, nous avons analysé des souches de rhizobia isolées des nodules racinaires de la légumineuse *Astragalus gombo*, *Astragalus maréoticus*, *Astragalus armatus*, *Astragalus cruciatus*. Notre analyse a été effectuée sur 14 souches purifiées à partir des nodules conservées des sols de différentes régions de la wilaya de Biskra.

Parmi les méthodes d'identification du rhizobia, nous sommes basés sur celles préconisées par Vincent (1970) ; et Somasegaran et Hoben (1994).

3.1.2. Croissance Sur YMA+Rc

L'ensemencement Des Souches Isolées A Partir Des Nodules Des *A.gombo* ; *A armatus* ; *A cruciatus* ; *A maréoticus* ; Sur Le Milieu YMA +Rouge Congo a donné des colonies qui absorbent faiblement le RC.

La culture des isolats sur milieu YMA+RC (figure11) a permis d'obtenir des colonies de formes circulaires, translucides, légèrement relevées de texture crémeuse, transparente ou opaque et mucilagineuse, convexe avec un diamètre de 0.5 à 10 mm. Cela est le caractère général des rhizobia (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994)

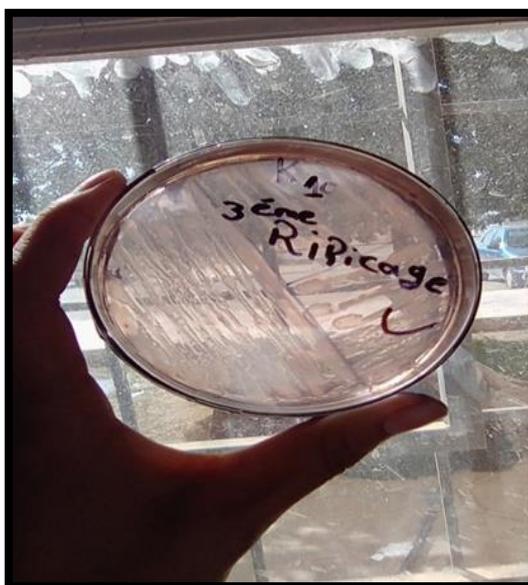


Figure 11 : Morphologie et la Croissance les colonies des isolats sur YMA+RC (photo original)

3.1.3. Coloration de Gram

L'observation microscopique permis d'observer des cellules en bâtonnets courts Gram négatifs, la même observation est enregistrée par Vincent (1970), Somasegarn et Hoppen(1994) au cours des études précédentes sur les rhizobia.

3.1.4. Test sur galerie API 20 E

Ce test est réalisé dans le but de voir la source carbonée préférée par les différentes souches étudiées, c'est une base de l'identification biochimique. Nous avons testé 9 isolats (k4 ; F1 ; M15 ; H6 ; GB6 ; GR5 ; C15 ; CB4 ; M61 ; Les résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Identification des isolats en utilisant système l'API 20 E

Test	Substrat	Slouches testées								
		GR5	GB6	C15	CB4	M15	M61	K4	F1	H6
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	Arginine	+	-	+	+	+	+	-	+	-
LDC	Lysine	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ODC	Ornithine	+	-	+	+	+	+	-	+	-
CIT	Citrate	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	Urée	+	+	-	-	-	-	-	-	+
TDA	Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	Tryptophane	-	-	-	+	+	-	-	-	-
VP	Pyruvate de sodium	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GEL	Gélatineemprisonnantdes particules de charbon	-	-	-	+	+	+	-	-	-
GLU à ARA	Substratcarboné	+	+	+	+	+	+	+	+	+

NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(+) : Réaction positive		(-) : Réaction négative								

3.1.4.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

Le virage au jaune pour les neufs sucres (GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, EMEL, AMY, ARA), montre que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone à partir du glucose jusqu'au arabinose (Figure.12) même résultat a été rapporté par Lindström et Lehtomaki (1988) pour des souches de *Rhizobium galegae*. Sebihi, (2008) a signalé que la mesure de la densité optique fait apparaître que le glucose, et sorbitol, donnent un bon développement pour la plupart des souches de rhizobia nodulants la légumineuse fourragère, *Hedysarum perrauderianum*.

L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches indique que les rhizobia ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides ou les sucres composés (Stowers, 1985).

3.1.4.2 Assimilation des acides aminés comme source d'azote

Le virage de couleur est variable selon la source d'azote (Figure 12). Ainsi toutes les souches capables d'assimiler l'arginine (test ADH) sauf K4 et GB6, ils sont capables d'assiler l'ornithine (test ODH) sauf K4 et H6, le tryptophane (tes TDA), et une reaction negative est enregistrer le tryptophane par le test (IND).

Ainsi ; Toutes les souches marques sont incapables d'assimiler la lysine confirmé par le test (LDC) par contre la souche C15 peut assimiler cet acide aminée donc elle possède l'enzyme lysine décarboxylase. Ces résultats indiquent que nos souches a une large assimilation des acides aminés comme une source d'azote. Sebihi (2008) a signalé aussi que la croissance de leur isolat de rhizobia nodulants *Hedysarum perrauderianum* sur le milieu défini 8 est variable selon la source d'azote, ainsi toutes les souches peuvent croître en présence de la majorité des acides aminés. Squartini *et al.*,(2002) dans la description du *Rhizobium sulae*, ala trouve que la majorité des souches sont capables d' assimiler l'arginine et autres acides aminée comme source d' azote.

3.1.4.4. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par *Jarvis et al* (1977).

Après l'incubation les souches GR5, C15, M61 peuvent hydrolyser l'urée par contre les souches H6, M15, K4, GB6, CB4, F1 n'ont pas pu hydrolyser, donc ces souches ne possèdent pas l'enzyme uréase. L'étude sur les BNL nodulant les légumineuses de genre *Trigonella* (Chabbi, 2010) montre que les souches TB7, TF1 et TF5 acidifient le milieu en donnant des colonies rose sur un milieu vire le rouge (rouge de Phénol) vers le jaune. Par contre les souches TB1, TB4, TB10, TF2, TM6, TM7, TM8 et TM11 donnent un autre aspect avec une couleur rose violet du milieu c'est-à-dire alcalinise le milieu (uréase +).

3.1.4.5. Réduction du nitrate

La capacité de toutes les souches d'*Astragale* testées à réduire le nitrate est représentée dans la (figure 12). Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrates (I et II) (voir Annexe 1) toutes les souches donnent une couleur rouge ce qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites. La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991) avec *Rhizobium japonicum* et les souches *rhizobium* nodulant les légumineuses dans les environnements salin respectivement, Munns (1968) dans leur résultats obtenus à partir de son étude sur les souches rhizobia nodulant l'espèce *Medicagosativa* ont rapporté que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective.

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 (El-Hilali, 2006).

3.1.4.6. Hydrolyse de gélatine

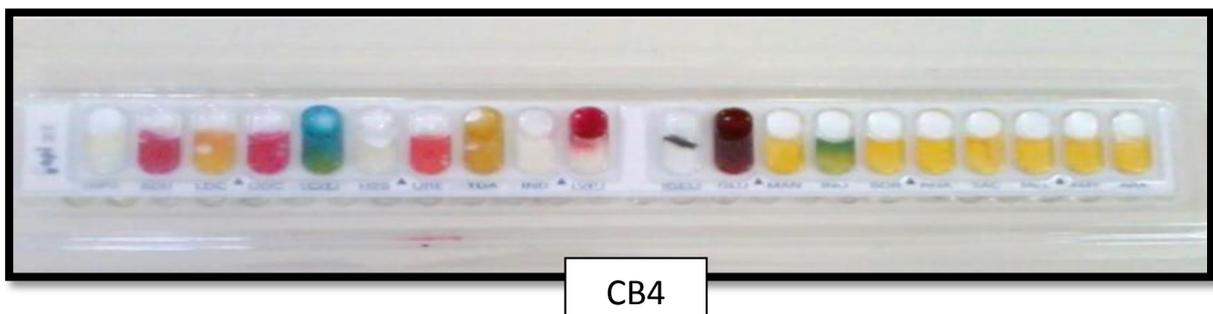
Le test a été effectué pour déterminer la capacité des microorganismes à produire l'enzyme de la gélatinase et l'utilisation de gélatine comme source média. La dégradation de la gélatine indique la présence de la gélatinase (Kaberi et *al.*, 2015).

La présence d'un précipité noir diffusé dans la cupule de test GEL dans les souches GR5, C15, H6, CB4, F1, M61, indique que nos souches capables d'hydrolyser la gélatine donc elles possédant la gélatinase. Ces résultats sont comparables aux travaux de Sadowsky et *al.* (1983) sur leur souche de rhizobia nodulant le soja ; Hunter et *al.*, (2007) avec *rhizobium selenireducens*; Gauri et *al.*, (2011) avec des souches de rhizobia nodulant *Trifolium alexandrinum*; Kaberi et *al.*, (2015) dans leur étude sur les rhizobia nodulant *Accaciaalata*.

3.1.4.7. Recherche de la β -galactosidase (test ONPG)

La β -galactosidase est un enzyme inductible, c'est-à-dire qu'elle n'est synthétisée que lorsque le lactose pénètre dans la cellule bactérienne ; il suffit quelques molécules de lactose intracellulaire pour que la synthèse de la β -galactosidase aura lieu, cette enzyme joue un rôle particulier lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries (Sebihi, 2008).

Après incubation des galeries, on observe que la couleur de test ONPG ne change pas (Figure 12) donc toutes les souches testées sont incapables de dégrader le lactose, donc on peut dire que nos souches ne produisent pas la β -galactosidase. Par contre toutes les souches nodulants l'*Astragalus armatus* produisent une β -galactosidase (Saoudi, 2008)



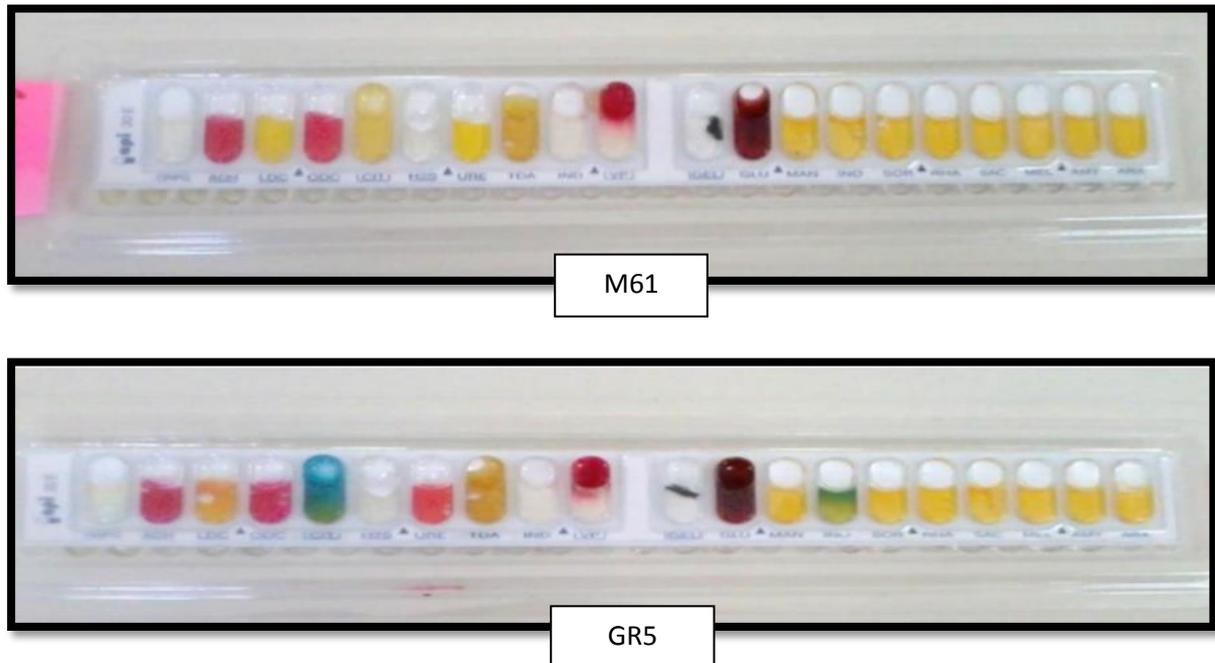


Figure 12 : Identification des isolats en utilisant système l'API 20E (photo original).

3.1.5. La sensibilité aux phages

Le test phagique a été réalisé selon Somasegaran et Hoben (1994) et Vincent (1970), il fait apparaître des plages de lyses (figure :13) dans toutes les boîtes ce qui indique que tous les isolats sont sensibles aux rhizobiophages ainsi présents dans les extraits de sol. .

L'apparition des petites plages de lyse indique que nos souches ont développé une petite résistance contre les rhizobiophages. Puisque, les interactions entre les rhizobiophages et leurs hôtes sont hautement spécifiques, ils peuvent être des outils valables dans les recherches écologiques avec les rhizobia (Somasegaran et Hoben, 1994)

Nos résultats sont similaires aux résultats de Saoudi (2008) sur les bactéries nodulant les légumineuses de genre *A. armatus*. Et parallèlement avec les travaux de Lajudie et *al.*, (1998) sur *R. lupinis*, *R. trifolii* et *R. leguminosarum*, ils ont montré que les bactériophages ont été isolés dans la plupart des espèces de rhizobia

Le rôle principal des rhizobiophages est de contrôler la population du rhizobia dans les différents sols. Des bactériophages peuvent être utilisés pour l'identification et la différenciation des souches bactériennes (Mehdipour-Moghaddam et *al.*, 2008).

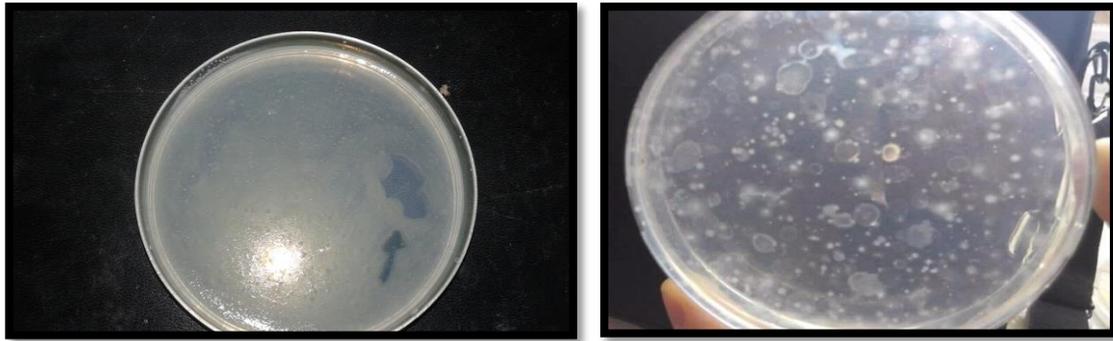


Figure. 13. Sensibilité des isolats aux bactériophages (Photos originale).

3.1.6. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Les profils de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de différents antibiotiques sont d'un intérêt écologique très important puisqu'ils permettent d'identifier une souche de rhizobia déterminée introduite dans un sol particulier (Obaton, 1971). Les tests antibiotiques ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des souches

La résistance aux antibiotiques dans notre étude révèle que toutes les souches présentent des fortes concentrations de résistance avec l'acide nalidixique pouvant aller jusqu'à de 130 µg/ml. Par contre, une résistance faible a été enregistrée avec la norfloxacine à des concentrations entre 5 et >15 µg/ml chez la plupart des souches étudiées. et la plus faible résistance est marquée avec la neomycine sulfate à des concentrations entre 10 à >20 µg/ml (figure 14). Les travaux sur les rhizobia des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum* représentent aussi une résistance à l'acide nalidixique (Torche et al., 2010).

Gauri et al. (2011) montre que 88% des isolats de *trifolium alexandrinum* utilisés dans leur étude étaient résistants à l'acide nalidixique qui est un inhibiteur de la gyrase d'ADN.

Et d'autre part, Gauri et al. (2011) mentionnent que les souches résistantes à la Neomycine ont souvent été liées à la perte d'efficacité dans la fixation de l'azote.

Une résistance intrinsèque aux antibiotiques peut donc être importante, du point de vue écologique, pour les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée et d'une plus grande aptitude à survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques (Cacciari et al., 2003).

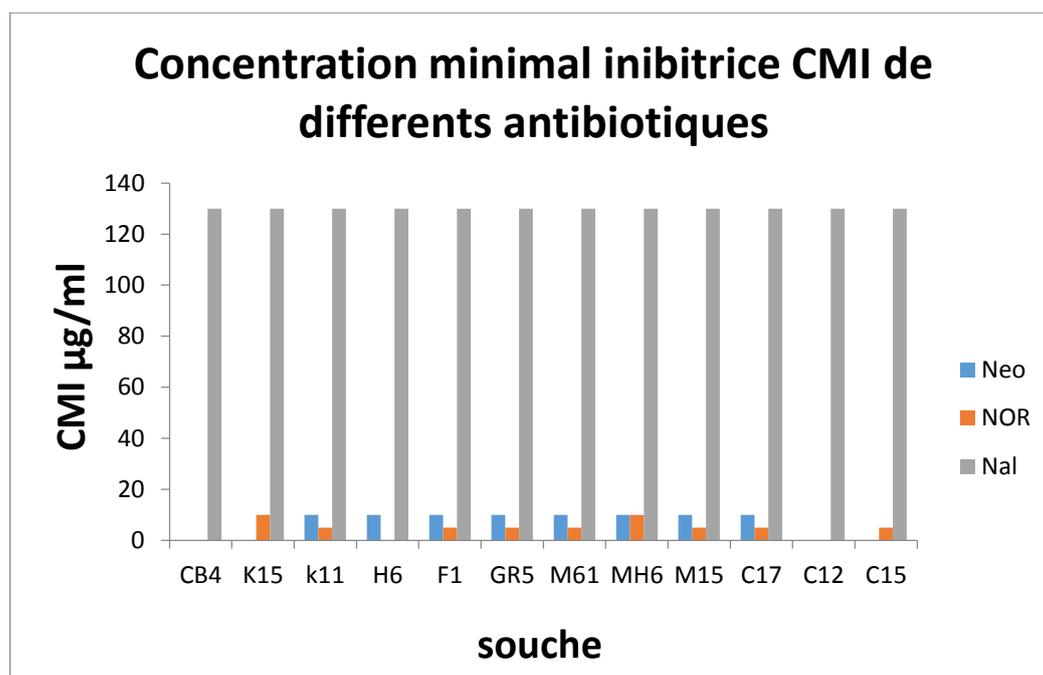


Figure .14. Effet de différents antibiotiques sur la croissance des souches nodulant *d'Astragalus*

3.1.7. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

Les souches tolèrent les métaux lourds à des concentrations différentes. La concentration inhibitrice est différente selon les souches et les métaux lourds.

L'effet de quatre différents métaux lourds sur le développement des souches de *Astragalus* a été évalué (figure 15). La plus forte résistance a été enregistrée pour le chlorure d'aluminium et de zinc. Les concentrations varient entre 600 à 750 µg/ml. ces résultats obtenus se concordent avec les travaux de El-Hilali, (2006) dans l'étude de souches de rhizobia nodulants *Lupinus luteus*, plus de 80% des souches montrent une grande résistance à l'aluminium et de Zinc. A l'opposé, une plus faible résistance a été enregistrée pour le chlorure de cuivre testés de 450 à 550 µg/ml et le chlorure de mercure testés de 7 à 9 µg/ml. Ces deux métaux s'avèrent donc les plus inhibiteurs pour le développement des souches. Ces résultats est en accord avec Chabbi, (2010) ainsi toutes les souches de rhizobia nodulant *Trigonella* montrent une nette sensibilité au chlorure de mercure ($HgCl_2$). Par contre Struffi et al., (1998) ont montré une résistance du *Rhizobium sullivanii* au plomb et au cuivre, alors qu'elle présente une nette sensibilité au mercure.

La résistance au mercure est la plus étudiée des résistances aux métaux lourds du monde bactérien. Les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines. Un mécanisme complexe de

résistance, bien conservé chez les bactéries et codé en majorité par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (Monchy, 2007).

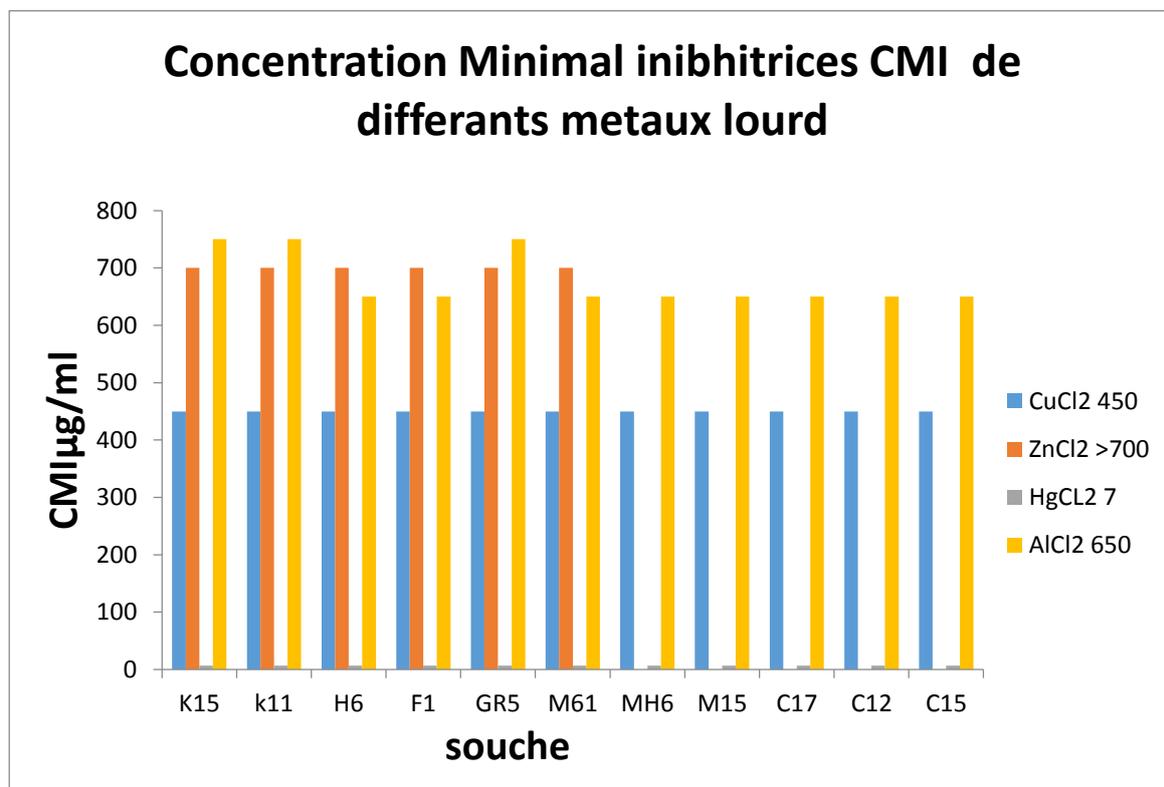


Figure. 15. Effet de différents métaux lourds sur la croissance des souches nodulant *dAstragalus*

3.1.8. Tolérance au Chlorure de Sodium

L'étude de la tolérance au sel sur milieu YMA des isolats, a été testée à 1%, 2%, 3%, 5% et 10%.

L'évaluation de la tolérance des souches à la salinité a été confirmée dans des milieux de différentes concentrations de NaCl. La majorité de nos isolats poussent en présence de différentes concentrations de NaCl, croissance optimale à la concentration 1%, 2%, 3%; croissance moins faible à la concentration 5% et plus faible à la concentration 10%. (figure.16). (Saoudi; 2010); On remarque que les bactéries dans leur majorité, supportent des concentrations de NaCl jusqu'à 400 mm.

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobies s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1991).

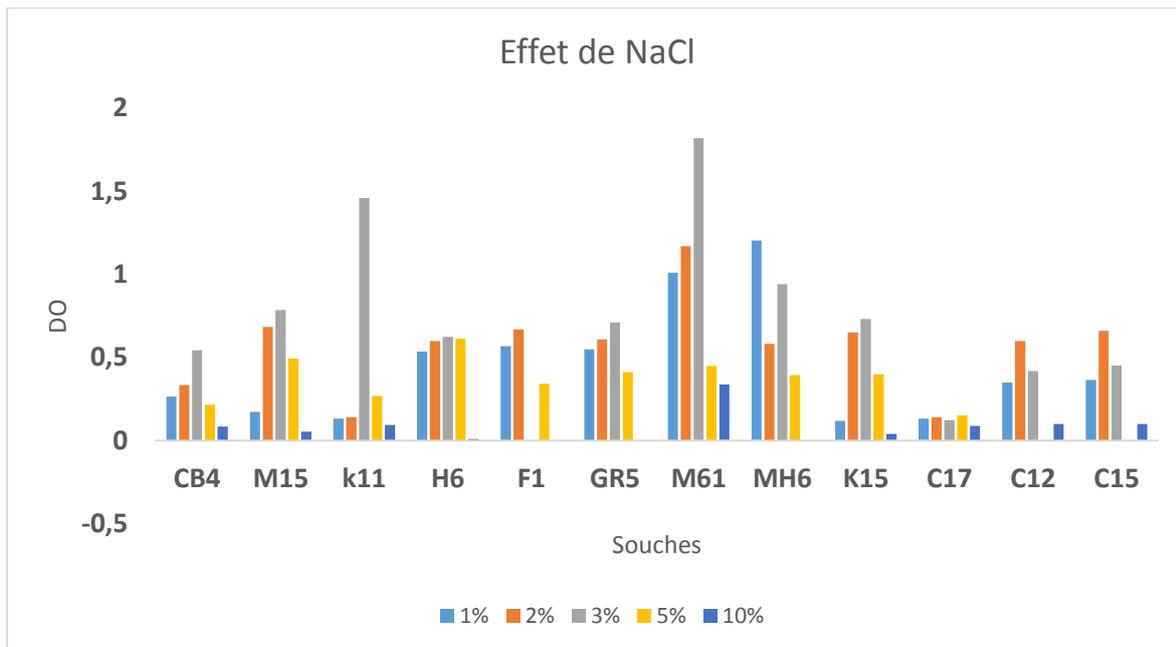


Figure.16. : Tolérance au Chlorure de Sodium

3.1.9. Effet de la température

La majorité des isolats tolèrent des températures variant de 4 à 37°C. A la température 4°C, la croissance n'est pas observée chez des souches k11, k15 et C 17 et On remarque également une croissance faible chez les isolats CB4 et C15. A la temperature 28°C on observe bon croissance chez tous nos isolas. Nos isolats peuvent même supporter une température de 40°C.

Il résulte de ce test que la majorité des isolats présentent une bonne thermo tolérance tant aux basses qu'aux hautes températures. (Somasegaran et al., 1984) a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des isolats est 28°C.

3.1.10. Mobilité des souches

Les souches sont mobiles et provoquent une acidification sur le milieu mannitol mobilité avec un virage de la couleur vers le jaune, nos résultats sont similaire aux travaux de Chabbi(2010).en étudiant les rhizobia nodulant le *Trigonella*.



Figure.18. Mannitol mobilité (Photo original)

Conclusion

Conclusion

La fixation symbiotique d'azote atmosphérique par les *Rhizobia* (bactérie fixatrice d'azote) est une réaction importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse.

Dans le but d'étudier la diversité des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus*, nous avons effectuées une caractérisation phénotypique d'une collection Algérienne des souches locales conservées de rhizobia nodulant L'*Astragalus* de déférant région de la wilaya de Biskra. Cette caractérisation comporte une étude morphologique et culturale, suivi d'une série de tests nutritionnels, biochimiques sur la sur galerie API 20, résistance aux antibiotiques et aux différents métaux, sensibilité aux phages et physiologique par les différentes concentrations de Na Cl et température.

Les résultats montrent que les souches isolées appartiennent au rhizobia à Gram négative et de différentes tailles, avec une croissance rapide, cette rapidité en croissance a des bénéfices via le domaine pratique surtout dans la production d'inoculum. En milieu **YMA+RC**, les souches absorbent peu ou pas le **RC**.

Les résultats des tests nutritionnels et biochimiques sur la galerie API 20E ont montré la capacité des rhizobia à utiliser une grande chaîne de sucres comme une source de carbone et d'assimiler l'arginine, ornithine, tryptophane comme source d'azote la souche C15 seulement capable assimiler la lysine comme source d'azote. La recherche des enzymes spécifiques nécessaires à la réaction symbiotique, démontrent que les souches ont la capacité de réduire le nitrate et la plupart des souches hydrolyse la gélatine.

La résistance des souches aux trois différents antibiotiques testés a indiqué une grande résistance à l'acide nalidixique et elles sont peu sensibles pour la neomycine et la norofoxine.

Pour les tests physiologique tous les isolats ont la capacité de développer dans différentes concentration de NaCl et à des températures différentes, ils ont la température optimale est un à 28°C

Toutes ces caractéristiques ont permis la mise en évidence d'une grande diversité phénotypique, mais l'étude reste incomplète en absence du niveau génétique. Pour vérifier cette proposition, nous avons besoin de compléter cette étude en utilisant des techniques moléculaires tels que REP / PCR-RFLP, séquençage des gènes ARNr 16S et hybridation ADN/ADN

Référence
Bibliographiques

Référence Bibliographie

Anonyme.2004. Biological Nitrogen Fixation. Page web, consultée en janvier 2004:www.national forage and grasslands curriculum.

Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom Cacciani I., Dimattia E., Quatrini P., Moscatelli M.C., Grego S., Lippi D., et De paolis M.R. 2003. Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. IRD Éditions (Ed). Open Edition Books, Marseille, France, 313 p.-[4] p

Corby, H. D. L.(1988). -Type of rhizobial nodules and their distribution among the leguminosae. *Kirkia*, 13 : 53-124.4)

Chabbi R. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Thèse de Magistère en Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, Algérie, 111 p

Cheriet D. 2015. Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago sativa* L.) fixatrices d'azote. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 117p

De lajudie, P., E Laurent-Fulele, A. Willem, U. Tork, R. Coopman, M. D. Collins, Kesters, and M. Gillis. 1988a. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Senecio*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48, pp. 1277-1290

Drevon, J.J., Hinsinger P., 2004 : Nutrition phosphatée et réponse des plantes et de la symbiose rhizobienne à la déficience en phosphore.

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 en Microbiologie et Biologie Moléculaire, Université Mohammed V – Agdal Rabat, Maroc, 92p.

Farhi A. 2001. Macrocéphalie et pôles d'équilibre : la wilaya de Biskra, L'Espace géographique. 3^{ème} édit (tome 30), 245-255 pp.10)

Faria, M. S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I. & Sutherland, J.M. (1989). - Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist*, 111 : 607-619.11)

Giles E.D., Oldroyd., Dawnin, J.A., 2004 : Calcium, Kinases and nodulation signaling in legume. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5 : 566-576.12)

- Gauri., Ashok K S., Rajendra P. B., Shailjja P., Manjinder K. B., Ashok N. 2011. Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of Trifolium alexandrinum. Agricultural Technology 7(6) : 1705-1723 pp
- Hopkins W.G., 1999 : Introduction to plant physiology, Second Edition. John Wiley and sons, Inc.
- Hunter W. J., Kuykendall L.D., Manter D. K. 2007. Rhizobium selenireducens sp. nov. A Selenite-Reducing-Proteobacteria Isolated From a Bioreactor. Microbiol 55: 455-460
- Jarvis B.D., W.T.S., T.S.M.C. learn., I.G.C. Robertson., G.R. Fanin. 1977. Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and Rhizobium strains from agricultural plants. New Zealand J. agric Res. 20, pp 42-52.
- Jordon, D.C., 1984 : Fanning III. Rhizobiaceae. 1938. In: N.R. Kreig and JH Holt. Edition Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. The Williams & Williams Co. Baltimore. pp : 234-254.
- Juergen Prell and Philip Poole, 2006 : Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. School of Biological Sciences, University of Reading, UK, RG6 6AJ.
- Kaberi D., Bibhs D., Piyush P. 2015. Isolation and characterization of root nodule bacteria associated with *Cassia alata* of Southern parts of Assam, India. Pure & applied bioscience 3(1): 58-63 pp
- Lindström K., and Lehtomäki S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 50, 277-287 pp
- Maxted, N. ; Bennett, S. J., 2001. Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. Current plant science and biotechnology in agriculture, volume 39, Springer
- McNeil D. L. 1982. Variation in *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. Appl. Environ. Microbiol. 44, 647-652
- Mehdipour-Moghaddam M., Bouzari M., Emtiazi G. 2008 : Isolation and Identification of Rhizobium Bacteriophages in Gilan and Isfahan Provinces, Iran. Research Journal of Biological Sciences 3(9) 1097-1101 pp
- Mitchell Andrews * and Morag E. Andrews. 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses pp5

- Monchy S. 2007. Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidusmetallidurans* CH34. Thèse de doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.
- Moussi A. H. 2012. Analyse systématique et étude bioécologique de la faune des acridiens (*Orthoptera, Acridomorpha*) de la région de Biskra. Thèse de doctorat, Université de Constantine, Algérie
- Munns D. N. 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil*. 29, 33–49 pp.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T., 1995 : Symbiot nitrogen fixation. *Plant Cell* 7 : 869-885.
- Nabors M., 2004 : Biologie végétale (structures, Fonctionnement écologie et biotechnologies), Edition PEARSON . pp : 224-225..
- Obaton M. 1971. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobiums*. *C. R. Acad. Sci. Ser. D*. 272, 2630-263
- Ouslim S. 2016. BNL associées aux légumineuses alimentaires (*Vicia faba* L) dans l'ouest Algérien (caractérisation et importance). Thèse de Doctorat, Université d'Oran, Algérie, 131pp.
- OZENDA P. 2004. Flore et végétation du Sahara : CNR. 3ème édition, Paris. pp. 279.
- OZENDA P. 2004. Flore et végétation du Sahara : CNR. 3ème édition, Paris. pp. 298-304
- Riah N. 2014. Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse de doctorat en Biochimie et Microbiologie Appliquée, Université Constantine 1, Algérie, 119 p.
- Richter G., 1993 : Métabolisme des végétaux , physiologie et biochimie, Edition Press polytechniques et universitaires Romandes. p : 526
- Rios J. L., Waterman P. G. (1997). A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus* photo the rapyresearch, Vol 11, PP411-418

Sadowsky M. J., et Keyser H. H., Ben Bohlool B. 1983. Biochemical characterization of Fast-and Slow-Growing rhizobia that nodulate soybeans. *Bacteriol* 33 (4) : 716- 722 pp.

Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. and Lara M., 1991 : Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 : 507-528.

Saoudi M., 2008. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes, Université Mentouri de Constantine, Algérie, 99

Sebihi F. Z. 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes, Université Mentouri de Constantine, Algérie, 110 p. p

Squartini A., Struffi P., Doring H., Pobell S.S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E.,

Velazquez E., Mateos P.F., Molina E.M., Dazzo F.B., Caselia S., Nuti M.P. 2002:

Rhizobium sulla sp. nov. (formerly 'rhizobium hedysari'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Stowers M. D. 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 89-108 p

Somasegaran P., Hoben H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc 450 pp

Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P. 1998: Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia

nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology.* 84(1) pp 81-89.

Torche A., Benhizia Y. Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D. 46 Squartini A. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* des f., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* des f. et *H. naudinianum* Coss. *Sciences & Technologie*, N°32, pp.43-50.

Vincent J. M. 1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria.

Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

Werner D., 1992 : Symbios is of plants and microbes, Edition London : Chapman Hall.

Zahran H.H., 1999: *Rhizobium* legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. Microbiol. Molec. Rev. 63(4) : 968-989

Zakhia F. 2004. Diversité des bactéries hôtes de légumineuses méditerranéennes en Tunisie et au Liban. Thèse de Doctorat en Biologie de l'Evolution et Ecologie, Université Montpellier II, France, 195 p.

Site web :1

https://www.google.dz/search?q=astragalus+armatus&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=Eps h05rOCcOhRM%253A%252Cdaz2RmI3s4pTVM%252C_&usg=__ujGzmUuVhj6n0xAfWIAzBJJAg08%3D&sa=X&ved=0ahUKEwjhnmikd_bAhVFuhQKHfVnBgQQ9QEIPTAE#imgrc=Eps h05rOCcOhRM:

Site web 2 :

https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&ei=yrMoW8ttj65Sw86esAI&q=carte+geographique+de+biskra&oq=carte+geographique+de+bis&gs_l=img.1.0.0.20498.45716.0.50352.35.33.0.2.2.0.358.5803.0j16j12j1.29.0....0...1c.1.64.img..6.29.5373...0i67k1j0i30k1j0i8i30k1j0i24k1.0.bHI-ftOxIr4#imgdii=DvrFZ6zOAqBk8M:&imgrc=5_7IZceoiQFgMM

Site web 3 :

https://www.google.dz/search?q=technique+d%27isolement+par+la+methode+des+cadrans&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjy9DUj9_bAhXBUhQKHfVnBgQQ9QEIPTAE#imgdii=kExE9pbVOLR72M:&imgrc=i-1vn7wBkL7JzM:

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 :

Milieux de culture et reactives utilisés

Milieu	Compositions	Quantité	Photo
YMB (YestMannitol Broth) (VINCENT, 1970).	Mannitol K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O NaCl Extrait de levure Eau distillée	10.00 g 0.50 g 0.20 g 0.10 g 0.50 g 1000 ml	
YMA (YestMannitol Agar) (VINCENT, 1970)	YMB Agar	1000ml 15g	

<p>RC (Solution stock de rouge Congo) (VINCENT, 1970)</p>	<p>Rouge Congo Eau distillée</p>	<p>0.25 g 100 ml</p>	
<p>YMA-RC (VINCENT, 1970)</p>	<p>YMA Solution stock de rouge Congo</p>	<p>100ml 10 ml</p>	
<p>Réactifs du nitrate Réductase (GUIRAUD, 1998)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réactif I • Réactif II 	<p>Acidesulfanilique Acide dilué à 25% α naphtylamine Acide dilué à 25%</p>	<p>1 goutte 1 goutte</p>	

<p>YS (Extrait de levure- Saccharose) (VINCENT, 1970).</p>	<p>Saccharose K₂HPO₄ MgSO₄. 7H₂O CaSO₄ NaCl FeCl₂. 6H₂O Extrait de levure Eau distillée</p>	<p>2.5 0.5 0.2 0.16 0.1 0.02 0.5 1000ml</p>	
<p>MNB /MNA (Mannitol Nitrate) (Vincent, 1970)</p>	<p>Solution A Mannitol Na₂HPO₄12H₂O Na₂SO₄ 10H₂O KNO₃ FeCl₂6H₂O Thiamine- HCl Biotine Agar Eau distillée Solution B MgCl₂6H₂O CaCl₂6H₂O Eau distillee</p>	<p>10g 0.45g 0.06g 0.60g 0.01g 100µg 0.5µg 7.5g 1000ml 0.1g 0.1g 100ml</p>	

Annexe 2 :**a).Résistance intrinsèque des souches nodulant *Astragalus* aux 3 antibiotique .**

Souches	Antibiotiques ($\mu\text{g/ml}$)		
	Neomycine sulfate	Norfloxacine	Acide Nalidixique
CB4	>20	>15	130
K15	>20	10	130
K11	10	5	130
H6	10	>15	130
F1	10	5	130
GR5	10	5	130
M61	10	5	130
MH6	10	10	130
M15	10	5	130
C17	10	5	130
C12	>20	>15	130
C15	>20	5	130

b).Résistance intrinsèque des souches nodulant *Astragalus* aux 4 metaux lourds

Souches	Métaux lourds ($\mu\text{g/ml}$)			
	CuCl_2	ZnCl_2	HgCl_2	AlCl_2
CB4	450	700	7	750
K15	450	700	7	750
K11	450	700	7	650
H6	450	700	7	650
F1	450	700	7	750
GR5	450	700	7	650

M61	450	700	7	650
MH6	450	700	7	650
M15	450	700	7	650
C17	450	700	7	650
C12	450	700	7	650
C15	450	700	7	650

c).Effet de NaCl

Souches	Concentration de Na Cl				
	1%	2%	3%	5%	10%
CB4	0,265	0.334	0.545	0.215	0.086
K15	0,174	0.685	0.787	0.495	0.055
K11	0,134	0.14	1.46	0.27	0.099
H6	0.537	0.6	0.625	0.614	0.011
F1	0.569	0.668	-0.003	0.342	0.003
GR5	0.55	0.61	0.712	0.412	0.003
M61	1.01	1.17	1.82	0.45	0.339
MH6	1.204	0.583	0.942	0.394	0.002
M15	0.12	0.652	0.732	0.4	0.04
C17	0.134	0.14	0.24	0.152	0.088
C12	0.35	0.6	0.42	0.003	0.1
C15	0.366	0.661	0.452	-0.003	0.101

d).Tableau d'interprétation de la galerie API 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétolène	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

المخلص

تم عزل عدد من البكتيريا العقدية الجذرية للبقوليات الرعوية من مختلف مناطق ولاية بسكرة بهدف تحقيق هذه الدراسة. الخصائص المظهرية للعينات تغطي الدراسة الغذائية والكيميائية باستعمال galerie API 20 E وتحديد مقاومتها وحساسيتها للفيروسات وللمضادات الحيوية وأيضا لمختلف المعادن الثقيلة. النتائج بينت قدرة العينات المعزولة على استعمال كل السكريات المستخدمة كمصدر للكربون لوجود اختلاف من مصدر الى اخر مع قدرتها العالية لاستعمال الاحماض الأمينية وتحليل النترات و الجيلاتين.

العينات المنتقات لهذه الدراسة اظهرت حساسية عالية في وجود الفيروسات البكتيرية ومقاومة عالية لمختلف المعادن الثقيلة وحمض الناليدكسيك ومقاومة منخفضة للنوروفلوكسين وكيريتات النيوميسين

الكلمات المفتاحية : عقدة ، *Astragalus* الخصائص الظاهرية ، ريزوبيوم ، التثبيت التعايشي

المخلص

تم عزل عدد من البكتيريا العقدية الجذرية للبقوليات الرعوية من مختلف مناطق ولاية بسكرة بهدف تحقيق هذه الدراسة. الخصائص المظهرية للعينات تغطي الدراسة الغذائية والكيميائية باستعمال galerie API 20 E وتحديد مقاومتها وحساسيتها للفيروسات وللضادات الحيوية وأيضا لمختلف المعادن الثقيلة. النتائج بينت قدرة العينات المعزولة على استعمال كل السكريات المستخدمة كمصدر للكربون لوجود اختلاف من مصدر الى اخر مع قدرتها العالية لاستعمال الاحماض الأمينية وتحليل النترات و الجيلاتين.

العينات المنتقات لهذه الدراسة اظهرت حساسية عالية في وجود الفيروسات البكتيرية ومقاومة عالية لمختلف المعادن الثقيلة وحمض الناليديكسك ومقاومة منخفضة للنوروفلوكسين وكيريتات النيوميسين

الكلمات المفتاحية : عقدة ، *Astragalus* الخصائص الظاهرية ، ريزوبيوم ، التثبيت التعايشي

Résumé :

Des souches ont été isolés à partir des bactéries nodulant la légumineuse, des astragales isolés de différents régions de la wilaya de Biskra afin de réaliser nous étude.

Les caractéristiques phénotypiques des isolats portent sur une étude morphologique suivie d'une série d'analyse de tests : nutritionnelle, biochimiques sur la galerie API 20E, la détermination de la résistance et de la sensibilité des isolats aux rhizobiophage, et aux antibiotiques, et aux différents métaux .

Les isolats ont la capacité d'assimiler la majorité des sucres comme source de carbone, et d'assimiler les acides aminés comme source d'azote, ils ont aussi capable d'hydrolyser le nitrate et la gélatine.

Les isolat testées représentant une grande sensibilité aux bactériophages et grand résistant aux différents métaux et à l'acide nalidixique et faible résistance à la norfloxacine et la neomycin sulfate.

Mots clé : *Nodule*, *Astragalus* ;caractérisation phénotypique, Rhizobia,Fixation symbiotique

Abstract

Différents isolates were isolated from bacteria nodulating *Astragalus*, they were isolated from different regions of the willaya de Biska for our study.

The phenotypic characteristics of isolates concern a morphological study followed by a series of the analysis : nutritional, biochemical galerie API 20E gally, the sensibility of the rhizobiophag and antibiotics, various metals resistance and sensibility of isolates.

The isolates have the ability to assimilate most sugar as a source of carbon, and assimilating amino acids as a source of nitrogen, they are also capable of hydrolyzing nitrate and gelatin.

The Strains tested showed high sensibility to bacteriophages and high résistance to various heavy metals and nalidixic acid and low résistance to norfloxacine and neomycin sulfate.

Key words: nodule , , *Astragalus*, phenotypic characterization, Rhizobia. Symbiotic fixation