



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

Référence /

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :

BEN AMOR Fairoz

Le : **jeudi 28 juin 2018**

Diversité phénotypique des bactéries nodulants *Phaseolus vulgaris* L. cultivé dans différents sols

Jury :

Mme. LEBBOUZ Ismahane	MCB	Université Biskra	Président
M. REBAI Redouane	MAB	Université Biskra	Examineur
Mme. BENCHARIF Selma	MAA	Université Biskra	Rapporteur

Année universitaire: **2017 - 2018**

Remerciements

Dans le cadre de la réalisation de ce travail, je remercie avant tout Allah tout puissant, de m'avoir accordé la santé, guidée vers le bon chemin et de m'avoir permis d'accomplir cette présente recherche.

*Je voudrais d'abord remercier mon encadrante **Mme BENCHARIF SELMA**, qui a le mérite de terminer ce travail de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

J'adresse mes remerciements aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail. Sans oublier les Ingénieures du laboratoire de la Faculté et ceux de la bibliothèque pour leurs aides.

Dédicace

A ma mère

A mon père

A mes frères et sœurs

A ma famille

A toutes mes chères amies

Fairoz

Table des matières

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre 1. Les légumineuses	
1.1. Généralités.....	3
1.2. Importance des légumineuses.....	5
1.2.1. Importance économique.....	5
1.2.2. Importance agronomique.....	5
1.3. Genre <i>Phaseolus</i>	5
1.3.1. Généralités et Classification.....	5
1.3.2. Espèce <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	6
1.3.3. Nutrition azotée chez le haricot.....	7
Chapitre 2. Les bactéries nodulants les légumineuses « <i>Rhizobia</i> »	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Caractères généraux.....	8
2.2.1. Caractères symbiotiques.....	8
2.2.2. Caractères morphologique des <i>Rhizobia</i>	8
2.2.3. Caractères cultureux.....	8
2.2.4. Caractères biochimique.....	8
2.3. Classification.....	9
2.4. Nodulation.....	11
2.4.1. Pré-infection.....	11
2.4.2. Infection.....	12
2.4.3. Développement du nodule (Organogénèse de nodule).....	12
2.5. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.....	12

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage du sol.....	14
3.2. Matériel végétal.....	15
3.2.1. Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	15
3.2.2. Stérilisation des graines.....	16
3.2.3. Mise en germination des graines.....	16
3.2.4. Culture en pots.....	16
3.3. Collecte des nodules.....	16
3.4. Conservation des nodules.....	17
3.5. Caractères cultureux.....	18
3.5.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	18
3.5.2. Isolement des souches à partir des nodules.....	18
3.5.2.1. Stérilisation et réhydratation des nodules.....	18
3.5.2.2. Ecrasement des nodules.....	19
3.5.2.3. Ensemencement du broyat nodulaire.....	19
3.5.2.4. Vérification de la pureté des souches.....	19
3.5.3 Caractérisation morphologique des isolats.....	20
3.5.4. Vitesse de croissance.....	20
3.6. Identification biochimique.....	20
3.6.1. Caractérisation enzymatique.....	20
3.6.1.1. Test catalase.....	20
3.6.1.2. Test oxydase.....	20
3.6.1.3. Recherche du citrate perméase.....	21
3.6.1.4. Hydrolyse de l'urée.....	21
3.6.1.5. Production d'indole.....	21

3.6.2. Résistance aux antibiotiques.....	21
3.7. Etude physiologique.....	21
3.7.1. Tolérance à salinité (NaCl).....	21
3.7.2. Effet du PH.....	21
3.7.3. Effet de la température.....	22
3.8. Test nutritionnel.....	22
3.8.1. Assimilation des sucres.....	22
Chapitre 4. Résultats et discussions	
4.1. Test de nodulation.....	23
4.1.1. Absence ou l'apparition des nodules.....	24
4.1.2. Nombre de pots.....	24
4.1.3. Nombre des nodules.....	24
4.1.4. Couleur des nodules.....	24
4.1.5. Forme des nodules.....	25
4.2. Caractérisation phénotypique des <i>Rhizobia</i>	25
4.2.1. Caracerisation morphologique des isolats et des et des bactéries.....	25
4.2.1.1. Aspect morphologique des siolats sur les milieux YMA, YMA+RC.....	25
4.2.1.2. Caractérisation microscopique.....	27
4.2.1.3. Détermination des rapidités de croissance.....	27
4.3. Caractérisation biochimique.....	29
4.3.1. Recherche d'enzymes spécifiques.....	29
4.3.2. Résistance aux antibiotiques.....	32
4.4. Caractérisation physiologique.....	33
4.4.1. Effet du chlorure de sodium.....	33
4.4.2. Effet du PH.....	34
4.4.3. Effet de la température.....	35

4.5. Test nutritionnel.....	36
4.5.1. Utilisation des sucres comme source de carbone.....	36
Conclusion.....	38
Références.....	40
Annexes	
Résumé	

Tableau 1. Classification récente des <i>Rhizobia</i>	9
Tableau 2. Présentation des régions d'étude.....	15
Tableau 3. Résultats du test de nodulation.....	23
Tableau 4. Test de confirmation pour les isolats.....	25
Tableau 5. Caractérisation morphologique des isolats de <i>Rhizobia</i>	26
Tableau 6. Résultats de la caractérisation microscopiques des bactéries isolées.....	27
Tableau 7. Résultat du test au bleu de bromothymol.....	28
Tableau 8. Résultats du test biochimiques	30
Tableau 9. Résultats de test de la résistance aux antibiotiques	32
Tableau 10. Résultats de croissance sur différente concentration de NaCl	34
Tableau 11. Représentation des résultats de l'effet du PH sur les souches bactériennes	35
Tableau 12. Représentation de l'effet de la température sur les isolats bactériens	36
Tableau 13. Résultats d'assimilation des sucres.....	37

Figure 1. Phylogénie des Fabacea.....	4
Figure 2. Fleurs formé par la sous famille Léguminosea.....	4
Figure 3. Nodule de racine de l'haricot commun et Fleur de la <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	7
Figure 4. Shéma représentatif des différente étape de la noulation.....	13
Figure 5. Localisation géographique des sites de prélèvement.....	14
Figure 6. Rincage des racines et nodules.....	17
Figure 7. Conservation des nodules selon Vincent (1970).....	18
Figure 8. Réhydratation des nodules (Photo originale).....	19
Figure 9. Aspect des isolats sur: YMA+RC ;YMA.....	28
Figure 10. Isolats sur YMA+BTB (a) à croissance rapide (b) à croissance lente.....	29
Figure 11. Résultats de test d'oxydase.....	31
Figure 12. Résultats de test de catalase.....	31
Figure 13. Résultats de test de citrate perméase.....	31
Figure 14 : Résultats de l'antibiogramme.....	32
Figure 15. Effet des différents antibiotiques sur la croissance des isolats.....	33

Liste des abréviations

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses

BTB : Bleu de Bromothymol

EPS : Exopolysaccharides

FN: Facteur Nod

Phv: *Phaseolus vulgaris* L.

RC: Rouge Congo

T : Température

TY: Tryptone Yeast

YMA: Yast Mannitol Agar,

YMB: Yast Mannitol Bouillon, Yeast Mannitol Broth

Introduction générale

Introduction

Comme la plupart des pays en voie de développement, l'Algérie n'échappe pas au phénomène de la croissance démographique qui n'est pas suivie par une augmentation de la production agricole alimentaire (Chebbi et Lachaal, 2004). Du point de vue nutritionnel, l'organisme humain a besoin d'un apport minimum journalier par les protéines, mais la situation des pays en développement nécessite l'élargissement de la base alimentaire de l'humanité et la lutte contre les carences protéiques par l'extension des cultures de légumineuses qui sont cultivées pour leur graine et tiennent une place importante dans l'alimentation humaine et animal; de plus, elle constitue une source de protéine végétale particulièrement peu coûteuse (Pitureau Mirand, 2003 et Joyeux, 2015). En effet le système de la production «J'achère-blé» est devenue une nécessité stratégique afin de garantir la sécurité alimentaire d'après Latati (2015).

Les légumineuses (haricot, pois, soja, lentilles et pois chiche) sont l'une des cultures les plus importantes en raison non seulement de leur qualité nutritionnelle due à sa richesse en acides aminés lysine et thréonine qui sont en très basse teneur dans les céréales, mais pour leurs divers avantages agro-environnementaux, socio-écologique et économique (Russel et *al.*, 1989 et Lazreg-Ben Friha, 2008).

D'après Russel et *al* (1989) et Bohlool et *al* (1992), l'avantage des légumineuses à graines est leur capacité de se développer dans les sols avec des niveaux bas de l'azote disponible. Dans l'agriculture, il y a une incapacité d'acheter l'engrais d'azote et dans les régions éloignées les équipements de transport sont restreints. Les études de la persévérance exigent que des solutions de rechange aux engrais azotés doivent être recherchées. La fixation biologique de l'azote (FBN), un processus microbiologique qui transforme l'azote atmosphérique en forme consommable par la plante, offre cette alternative.

Des nouvelles initiatives internationales de recherche ont été réalisées afin d'augmenter le rendement des légumineuses à graine en développant de meilleures plantes et améliorer la fixation de l'azote biologique (Russel et *al.*, 1989).

En régions méditerranéenne, la culture des légumineuses est souvent exposée à des contraintes variables de sols. Parmi les quelles, la salinité et la déficience en Phosphore (P) sont des facteurs majeurs limitant sa production, surtout quand la croissance des plantes est dépendante de la fixation symbiotique de l'azote (FSN) (Faguire, 2012).

L'aridité et la sécheresse sont une menace pour le Nord-Africain y compris l'Algérie, qui provoque la diminution de la biomasse végétale (Vallejo et *al.*, 1999 ; Mouhouche, 2001).

Grâce à leur capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses, les *Rhizobiums* occupent une place très importante dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols (Selami, 2015).

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est un processus indispensable non seulement à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux *Rhizobia* afin d'obtenir les nutriments nécessaires pour leur développement.

Notre travail a pour objectifs :

- L'isolement ; la purification et la caractérisation des bactéries nodulants *Phaseolus vulgaris* L.
- La révélation de la biodiversité des isolats du point de vue morphologique, physiologique et biochimique.

Ainsi, notre travail s'articule autour de 2 parties :

La première partie présentera une synthèse des données bibliographiques, un premier chapitre rapporte l'importance des légumineuses y compris les haricots et le deuxième chapitre fera le point sur les *Rhizobia* et leur capacité de fixer l'azote.

La deuxième partie, présentera les outils méthodologiques utilisés et nous présenterons des résultats obtenus au cours de cette expérimentation et leur discussions.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1.

Les légumineuses

1.1. Généralités

Les Légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des Fabacées (Cheriet, 2016), qui représente la plus grande famille de plantes supérieures en nombres d'espèces après Orchidacée et les Astéracée (Cronk et *al.*, 2006) avec environ 964 genres et plus de 24 000 espèces [1].

Les légumineuses appartiennent à l'ordre Fables, famille Leguminosae ou Fabaceae. Elle présente une grande diversité (Fig.1). La plupart des légumineuses cultivées appartiennent à la sous famille Papilionoideae et plus précisément aux tribus Phaceola, et des Trifolia.

La classification es botaniste basé sur la forme es fleurs des légumineuses définie trois sous-familles: les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Papilionoideae (Fig.2) (Terefework et *al.*, 2000 ; Selami, 2015)

Les légumineuses à graines restent toujours une part importante de l'alimentation particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme (Broughton, 2003). On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*) (Selami, 2015).

Dans le monde végétal, les légumineuses ont la capacité de mettre en place une symbiose avec certaines bactéries naturellement existantes dans le sol (Schneider et Huyghe, 2015). Elles ayant acquis la capacité à noduler au cours de l'évolution, et sont regrouper dans un clade monophylétique, le clade fixateur d'azote (NFC), symbiotique (Soltis et *al.*, 1995 et Soltis et *al.*, 1999).

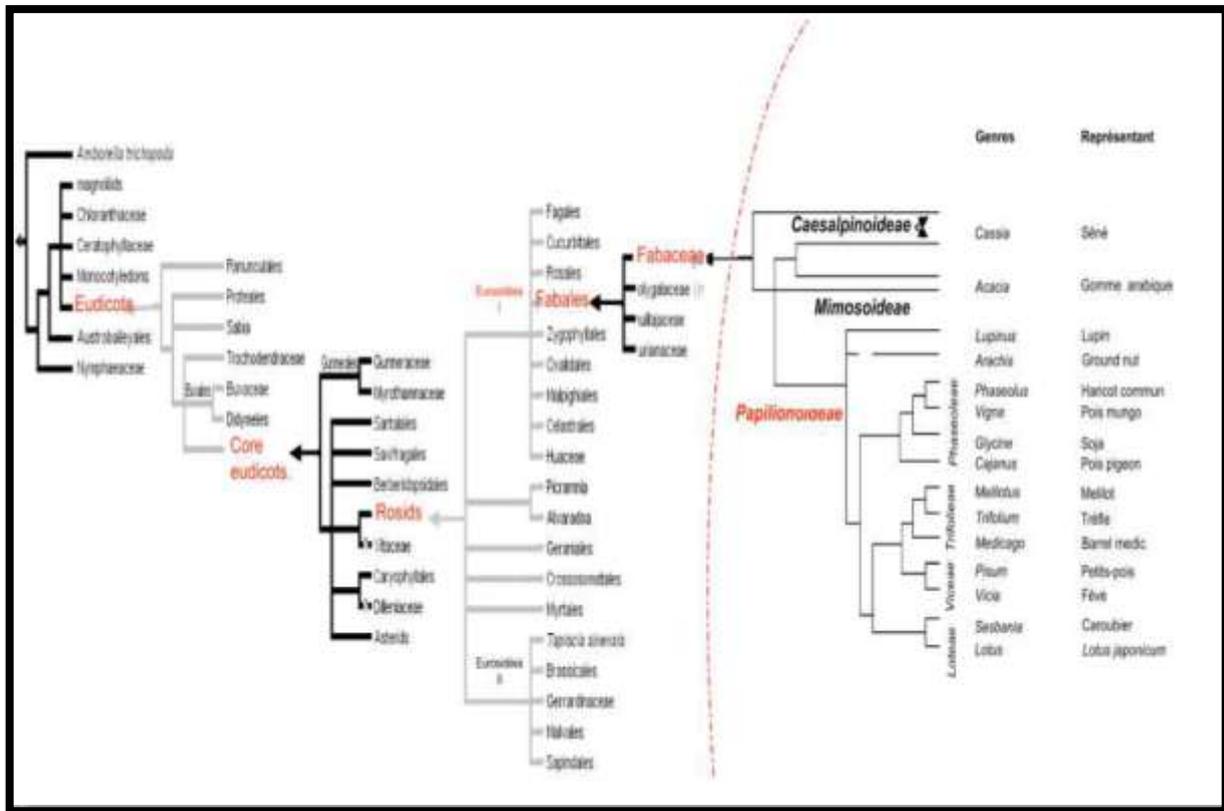


Figure 2. Phylogénie des Fabaceae (Young et al, 2003)



Figure 1. Fleurs formé par la sous famille Légumineosea (Howeison et Dilworth, 2016)

a) Caesalpiinoideae b) Mimosoideae c) Papilionoideae

1.2. Importance des légumineuses

1.2.1. Importance économique

La majorité des Légumineuses d'intérêt économique appartient aux Papilionoideae (Terefework et *al.*, 2000). Nous savons maintenant que la culture des légumineuses ne nécessite pas d'apport d'engrais azoté d'origine industrielle, ce qui est d'un avantage considérable en termes d'économie, le transport et l'épandage des engrais azotés sont, en effet, très coûteux (Baba Arbi, 2016).

La culture des légumineuses réduit le coût économique de l'usage intensif des intrants chimique dans l'agriculture (Russell et *al.*, 1989).

Les légumineuses sont une source essentielle et bon marché des protéines végétales pour la population du monde entier (FAO, 2016).

1.2.2. Importance agronomique

Les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et contribuent au maintien de la fertilité des sols. En effet, les légumineuses accumulent des concentrations importantes d'azote dans leurs tissus. Une partie de cet azote est réincorporée au sol via la décomposition des tissus ce qui permet de rétablir la fertilité des sols après des cultures plus exigeantes tel que les céréales (Ghalem, 2000).

Ainsi, la majeure partie des Légumineuses (88% des espèces étudiées ; Faria et *al.*, 1989) interagit avec des *Rhizobia* pour former des nodules fixateurs d'azote (Hirsch et *al.*, 2001) et comprend donc des candidats potentiels pour l'agriculture en tant qu'engrais vert azoté ou pour l'enrichissement des sols (Selami, 2017).

Du point de vue agricole, des systèmes de cultures intercalaires incluant des légumineuses favorisent la fertilité des sols, améliorent les rendements et contribuent à un système alimentaire plus durable (FAO, 2016).

1.3. Genre *Phaseolus*

1.3.1. Généralités et Classification

Le genre *Phaseolus* est grand, incluant approximativement 80 cultivés et espèces sauvages, mais la *Phaseolus vulgaris* est la seule espèce de *Phaseolus* à avoir atteint une répartition mondiale. Le haricot commun et les haricots du genre *Phaseolus*, sont originaires d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Le haricot commun a été domestiqué

indépendamment en Amérique centrale (Mexique et Guatemala) et dans les Andes d'Amérique du Sud (principalement le Pérou) pendant plus de 5000 ans et ensuite transporté vers d'autres continents (Bernal et Graham, 2001).

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* et ordre des Fabales. Au sein des *Phaseolinae*, les deux genres *Phaseolus* et *Vigna* sont les plus importants et contiennent à eux seuls le plus grand nombre d'espèces cultivées comme légumineuses vivrières. La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. Gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greenm. et le haricot commun *P. vulgaris* L. Ce sont des plantes diploïdes de nombre chromosomique $2n$ (Silué, 2009).

Chez le haricot, on distingue deux classes commerciales majeures, les haricots verts et les haricots secs.). La majeure partie de la production et de la consommation du haricot, à l'échelle mondiale, est représentée par les haricots secs (FAO, 2009). Selon Faguire (2012), la production mondiale en haricot sec en 2007 était estimée à 19,29 millions de tonnes.

1.3.2. Espèce *Phaseolus vulgaris* L.

L'haricot de *Phaseolus vulgaris* est une plante annuelle herbacée. Elle est généralement à racine pivotante mais qui forme après des racines secondaires longues de 10 à 15 cm se développant sur toute la racine principale (Ndèye, 2002) sur lequel se forme des nodules après 15 à 20 jours des semis des graines (Saoudi, 2017)(Fig.3a). Les feuilles sont trifoliées, habituellement ovales (Kroll, 2000) . Les fleurs sont regroupées en grappes. Chaque grappe porte quatre à dix fleurs. Leurs couleurs sont variables suivant les variétés, à savoir blanche, crème, mauve ou rose (Fig.3b).

Selon Guinard (1998), la position systématique du *P. vulgaris* est la suivant ;

- Régne : végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédone
- Ordre : Fabales
- Famille : Fabacées
- Genre : *Phaseolus*

-Espèce: *Phaseolus vulgaris*



Figure 3. (a) Nodules des racines de l'haricot commun (photo originale Kamau, 2014) (b) Fleur de la *Phaseolus vulgaris* L.

1.3.3. Nutrition azotée chez le haricot

Comme pour la plupart des légumineuses, la nutrition azotée du haricot est assurée soit par assimilation des nitrates du sol soit par fixation biologique d'azote atmosphérique (Franco et al., 1979 ; Faguire, 2015). Le haricot a été décrit par plusieurs auteurs comme étant une légumineuse à faible capacité de fixation d'azote, comparée à d'autres espèces de légumineuses comme le le soja des sols de la culture mais aussi, à la compétitivité des souches de *Rhizobium* indigènes ineffectifs.

Chapitre 2.

**Les bactéries nodulants les
légumineuses « *Rhizobia* »**

2.1. Définition

Les BNL sont des bactéries de sol qui participent comme symbiontes des légumineuses aux processus biologique de la fixation de l'azote (FBN) (Lebbida, 2009 ; Zakhia et *al.*, 2004). Ce dernier est effectué par des bactéries, généralement connues sous le nom de *Rhizobia*, ce terme décrit le phénotype (causant des nodules de racine) selon Sebihi (2008).

2.2. Caractères généraux

2.2.1. Caractères symbiotiques

L'infectivité d'un *Rhizobium* s'exprime par sa spécificité à travers sa capacité de noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes (Cheriet, 2016).

Le caractère d'effectivité ou d'efficience est défini par la capacité de ces *Rhizobia* à réduire l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, à l'intérieur des nodules, qui se traduit par la couleur rouge ou rose de ces dernières (présence de l'enzyme de fixation d'azote) (Sadowsky et *al.*, 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Prin et *al.*, 1993).

2.2.2. Caractères morphologique des *Rhizobia*

Les *Rhizobia* sont des bactéries Gram-négative (Sato et *al.*, 2005) , strictement aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électron d'une longueur de 1,2 à 3,0 µm et une largeur de 0,5 à 0,9 µm, non sporulant (Jordan, 1984).

Ces bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

2.2.3. Caractères cultureux

Les milieux au mannitol et à l'extrait de levure sont les milieux les plus utilisés pour la culture des *Rhizobia* . Ce sont les sources qui sont fournies par les éléments organiques et inorganiques (Allen et Allen, 1950). Le taux de croissance optimum de la majorité de *Rhizobia* se produit entre 25 et 30 °C. Les *Rhizobia* préfèrent la neutralité, leur pH optimum est de 6.8 - 7.0 (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Beck et *al.*, 1993).

2.2.4. Caractères biochimique

Les *Rhizobia* produisent de grandes quantités d'éléments extracellulaires (EPS) et également les lipopolysaccharides constitutives de la membrane externe (Jordan 1984) chimioorganotrophes sont capables d'utiliser une large gamme de hydrates de carbone,

neutrophiles (pH entre 6 et 7) et mésophiles (température optimale de croissance est entre 25 et 30°C) (Sadowsky et *al.*, 1983 et Somasegaran et Hoben.,1985).

2.3. Classification

La classification des BNL s'enrichit chaque année de plusieurs espèces, au fur et à mesure de l'exploitation de la diversité des bactéries symbiotiques associées aux légumineuses selon Sebihi (2008).

Selon la classification actuelle (Tab.1), des bactéries appartenant à différents genres et classe taxonomiques sont connues : les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (classe des alpha-protéobactéries), *Bulkholdera* et *Ralstonia* (classe des beta-protéobactéries), ainsi que certaines gamma-protéobactérie.

Tableau 1. Classification récente des *Rhizobia* (Benada et Fikri Ben-Brahim, 2014)

Genus species	Isolation source
Class: Alphaproteobacteria	
Order: Rhizobiales	
Family: Rhizobiaceae	
Genus: Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>
<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. cellulolyticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>
<i>R. radiobacter</i>	*

Continued Table 1	
<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. hawassense</i>	Different agroforestry legume trees
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. shonense</i>	Different agroforestry legume trees
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i> species
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus</i> species
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia</i> , <i>Lotus berthelotii</i>
Genus: Phyllobacterium	
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Family: Methylobacteriaceae	
Genus: Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> spp.
Genus: Microvirga	
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp.
<i>M. lotononidis</i>	Different legume host
<i>M. zambiensis</i>	Different legume host
Family: Brucellaceae	
Genus: Ochrobactrum	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>
Family: Hyphomicrobiaceae	
Genus: Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. dobereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>A. oxalatifilum</i>	
Genus: Devosia	
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>
Family: Bradyrhizobiaceae	
Genus: Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koschunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
Class: Beta Proceobacteria	
Order: Burkholderiales	
Family: Burkholderiaceae	
Genus: Burkholderia	
Continued Table 1	
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
Genus: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine</i> , <i>Vigna</i> , <i>Cajanus</i>
<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Neptunia</i> , <i>Leucaena</i>
<i>E. terangae</i>	Different host plants
<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula</i> , <i>Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
Genus: Shinella	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Family: Phyllobacteriaceae	
Genus: Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Cicer</i> , <i>Anthyllis</i> , <i>Astragalus</i> , etc.
<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i> , <i>Chamaecrista</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Prosopis</i> ,
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thioganiceticum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana</i> spp.
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>
<i>M. abyssinicae</i>	Different agroforestry legume trees

Continued Table 1	
<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. heleaia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
Genus: Cupriavidus	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> sp.
Class: Gamma-Proteobacteria	
Order: Pseudomonadales	
Family: Pseudomonaceae	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Robinia pseudoacacia</i>

* Espèces sans capacité de nodulation décrite incluses dans les genres *Rhizobial*.

2.4. Nodulation

L'établissement de la symbiose entre une Légumineuse et son *Rhizobium* spécifique se manifeste par une séquence des événements qui débutent par l'infection bactérienne et qui se terminent par la formation d'un nodule (Selami, 2015 et Baba Arbi, 2016). Les étapes de ce processus sont les suivantes :

2.4.1. Pré-infection

L'interaction entre les deux partenaires débute par un dialogue moléculaire spécifique (Long, 1996 et Cheriet, 2016).

Ce dialogue moléculaire débute par l'exsudation via les racines des Légumineuses de composés phénoliques, principalement des flavonoïdes qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol et sont capables d'activer la transcription des gènes *Nod* chez les *Rhizobia* (Selami, 2015)

Des facteurs de surface comme les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) chez la bactérie et la lectine et autres adhésines chez la plante sont inclus dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries aux poil adsorbants des racine de la plante (Long 1996 et Cohen et al., 2001).

2.4.2. Infection

La pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui se recourbe de façon caractéristique et comprise les bactéries engagées dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi et un filament d'infection se développe (Hirsch et *al.*, 2001).

Le cordon (filament) d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse les bactéries dans les cellules du méristème nodulaire (Franche et *al.* 2009).

2.4.3. Développement du nodule (Organogénèse de nodule)

Le cordon d'infection continue à pénétrer à travers les couches cellulaires dans la zone méristématique active jusqu'aux cellules les plus internes. L'apparition continue de bactéries dans les cellules s'accompagne de l'augmentation de la dimension de l'ébauche nodulaire (Beringer et *al.*, 1979). Dans les cellules de ces nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes, capables de réduire l'azote atmosphérique N₂ en une forme assimilable par la plante-hôte. Le type de nodule dépend de la plante hôte et non de son symbionte. Généralement les Légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle...) forment des nodules indéterminés, alors que les Légumineuses tropicales (soja, haricot...) forment habituellement des nodules déterminés (Hirsch, 1992).

2.5. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote ; elle peut se faire selon des voies biologiques ou chimiques (Chafi et *al.*, 2009).

La fixation biologique de l'azote est un processus métabolique exclusivement réalisé par les organismes procaryotes soit par des fixateurs libres ou des fixateurs symbiotiques tels que des bactéries appelées communément *Rhizobia* ou BNL «Bactéries Nodulant les Légumineuses» (Moulin, 2002), qui s'associent à la majorité des plantes de la famille des Légumineuses. Et représente le système symbiotique le plus efficaces en termes de fixation azotée (Graham et Vance, 2003).

La réduction de l'azote est très exigeante en énergie : il faut 16 molécules d'ATP (donneur d'énergie dans les cellules) pour réduire une molécule d'azote. C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Dénarié, 2000).

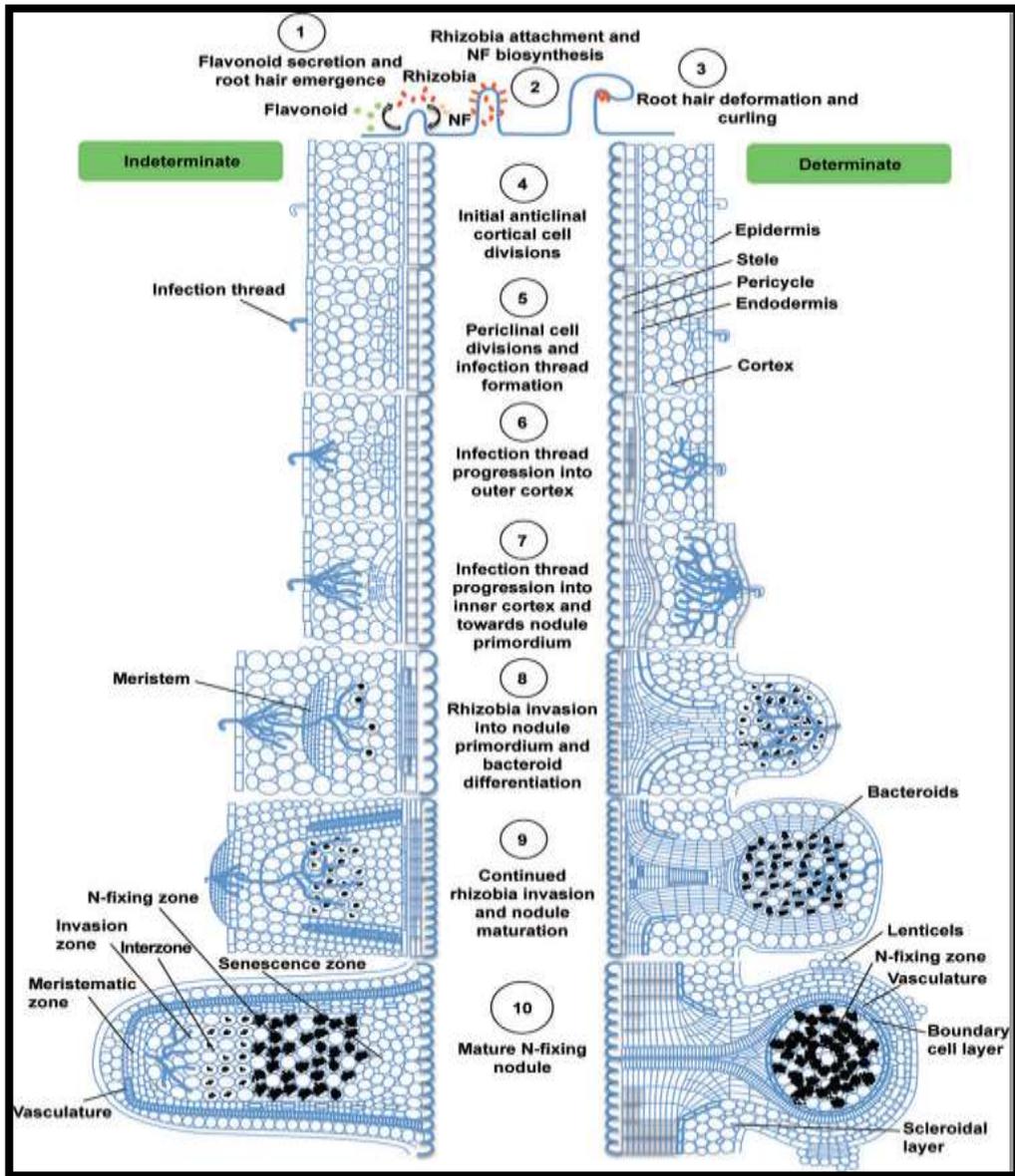


Figure 4. Schéma représentatif des différentes étapes de la nodulation (Ferguson *et al.*, 2010)

Recherche expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage du sol

Onze échantillons de sols sont prélevés de diverses zones géographiques de l'Algérie (Tab.2 ; Fig.5).

Tous les prélèvements sont effectués dans l'horizon 0 - 20 cm. Ces sols diffèrent en fonction de leur nature et de leur couleur, mais aussi de la culture précédente ou de la flore prédominante dans la localité.

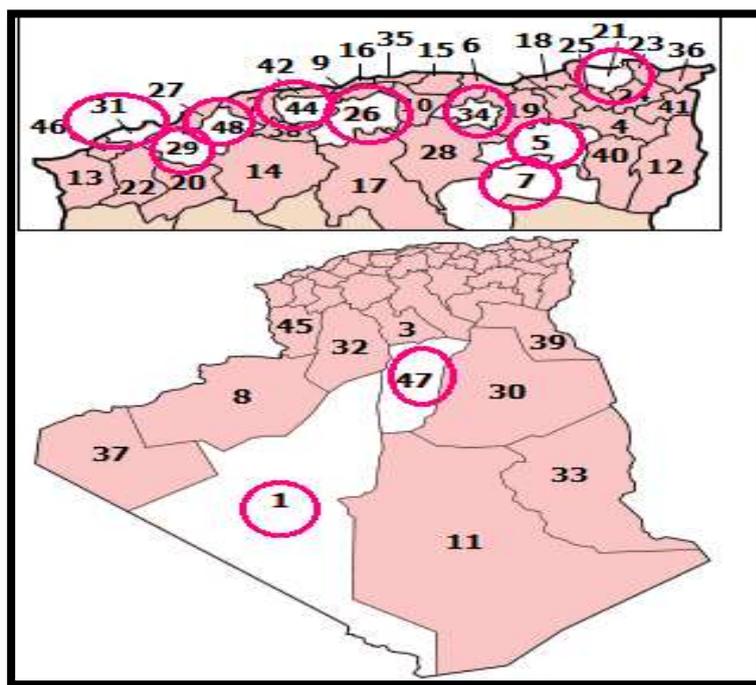


Figure 5. Localisation géographique des sites de prélèvement [2]

Tableau 2. Présentation des régions d'étude

Code de l'échantillon de sol	Code de la wilaya	Non des sites	Coordonnées géographiques [3]
ES1	44	Ain Defla, Algérie	Latitude: 36.2652, Longitude: 1.9703 36° 15' 55" Nord, 1° 58' 13" Est
ES2	21	Skikda, Algérie	Latitude: 36.8667, Longitude: 6.9 36° 52' 0" Nord, 6° 54' 0" Est
ES3	05	Batna (N'Gaous), Algérie	Latitude: 35.5618, Longitude: 5.61092 35° 33' 42" Nord, 5° 36' 39" Est
ES4	31	Oran, Algérie	Latitude: 35.7028, Longitude: -0.649256 35° 42' 10" Nord, 0° 38' 57" Ouest
ES5	26	Médéa, Algérie	Latitude: 36.2675, Longitude: 2.7501 36° 16' 3" Nord, 2° 45' 0" Est
ES6	29	Mascara, Algérie	Latitude: 35.3833, Longitude: 0.15 35° 22' 60" Nord, 0° 9' 0" Est
ES7	47	Ghardaia, Algérie	Latitude: 32.4833, Longitude: 3.68333 32° 28' 60" Nord, 3° 40' 60" Est
ES9	34	Bordj bouarréridj, Algérie	Latitude: 36.0667, Longitude: 4.76667 36° 4' 0" Nord, 4° 46' 0" Est
ES10	01	Adrar, Algérie	Latitude: 27.8667, Longitude: -0.283333 27° 52' 0" Nord, 0° 16' 60" Ouest
ES11	48	Relizane, Algérie	Latitude: 35.7333, Longitude: 0.55 35° 43' 60" Nord, 0° 33' 0" Est
ES12	07	Biskra(El Hadjeb), Algérie	Latitude: 34.7904, Longitude: 5.59683 34° 47' 25" Nord, 5° 35' 49" Est

3.2. Matériel végétal

3.2.1. Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

La collection de graines de l' haricot conservée au laboratoire de microbiologie contient des variétés très utilisées en Algérie. Ces variétés sont fournies par une société privée spécialisée dans la vente des semences.

3.2.2. Stérilisation des graines

La surface des graines de la plante *Phaseolus vulgaris L.* est stérilisée par immersion durant 5 min dans de l'hypochlorite de calcium (CaCl_2O_2) à 5,25%. Les graines sont rincées avec de l'eau distillée stérile. Au dernier rinçage, les graines sont laissées gonfler pendant 3 heures, afin d'éliminer celles en mauvais état. Les semences qui flottent ont été écartées, seules jugées saines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri.

3.2.3. Mise en germination des graines

La germination des graines a été réalisée dans des boîtes de Pétri en verre stérile contenant du papier filtre humidifié avec de l'eau distillée stérile. Les boîtes sont enveloppées avec du papier aluminium et incubées à 25°C à l'obscurité jusqu'à apparition des radicelles

3.2.4. Culture en pots

Après germination des graines et apparition des radicelles, les graines sont transférées dans des pots en plastique de 300 ml renfermant 250 g de sol de chaque région étudiée et sont mises en culture pendant 4 à 5 semaines.

Les pots sont placés sur des dispositifs de culture à une ambiance maintenue entre 20 et 25°C sous un éclairage additionnel de 10.000 lux réglé à une photopériode de 16 heures de jour et de 8 heures de nuit.

Les pertes en eau résultant de l'évaporation et de l'évapotranspiration sont déterminées toutes les 48 heures par pesée des pots et compensées par l'addition d'une quantité équivalente d'eau. Ces tests ont été réalisés à raison de 3 répétitions par échantillon de sol dans des pots supportant chacun 3 plants.

3.3. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante mise en culture dans chaque échantillon de sol. Les racines et les nodules sont rincés à l'eau courante puis sont mis à conservation (Fig.6).



Figure 6.Rincage des racines et nodules (Photo D.P. Beck, 1993)

3.4. Conservation des nodules

La méthode utilisée pour une longue période de stockage est celle décrite par Somasegaran et Hoben (1994) et Vincent (1970). Qui consiste à remplir des flacons stériles au quart de leurs volumes par un déshydratant tel que CaCl_2 recouvert d'une couche de coton sur lequel déposés les nodules (Fig.7).

La dessiccation est réalisée dans des flacons étiquetés en indiquant le nom de la plante hôte, la date et le lieu de prélèvement, la date et le lieu de conservation. Il est recommandé de placer dans un seul tube les nodosités issues d'une même plante.

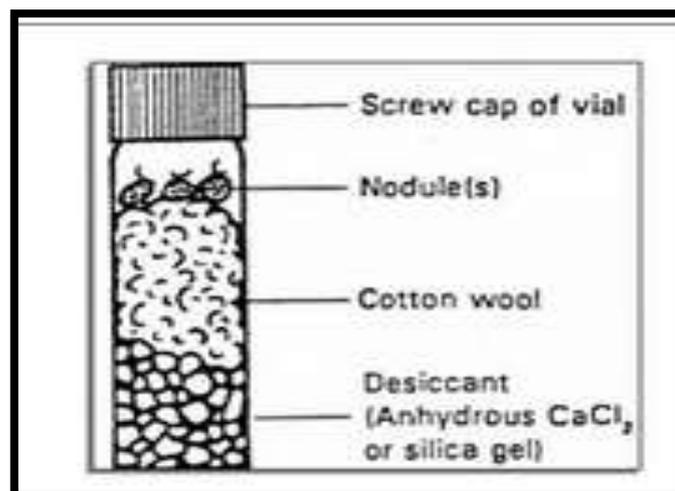


Figure 7. Conservation des nodules selon Vincent (1970)

3.5. Caractères cultureux

3.5.1. Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques et les solutions qui sont dont la composition est la suivante :

- Milieux Liquides : YMB (Yeast Mannitol Broth)
- Milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar)
- YMA+RC (Yeast Mannitol Agar+ Rouge Congo)
- YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol)

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20mn et le pH des milieux est ajusté à 6,8.

3.5.2. Isolement des souches à partir des nodules

3.5.2.1. Stérilisation et réhydratation des nodules

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol absolu, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile. Au dernier rinçage, les nodules sont laissées gonfler pendant 30 minutes (Vincent, 1970) (Fig.8).



Figure 8. Réhydratation des nodules (Photo originale)

3.5.2.2. Ecrasement des nodules

La méthode d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent (1970). Les nodules stériles sont immergés par l'eau distillée stérile, puis sont écrasés par matériel stérile jusqu'à l'obtention d'un jus trouble.

3.5.2.3. Ensemencement du broyat nodulaire

Une goutte du broyat obtenu est étalée à l'aide d'une anse de platine flambé à l'avance sur milieu YMA+RC (voir annexe 1) en boîtes de Pétri (Vincent, 1970). Cela se fait sous la hotte microbiologique. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant.

3.5.2.4. Vérification de la pureté des souches

Des repiquages successifs sur milieu YMA sans rouge de Congo (voir annexe 1) ont été pratiqués, l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies isolées, sont incubées à 28°C.

Une fois purifiées, les souches isolées sont conservées à -20°C en milieu TY liquide additionné de 40% de glycérol pour le soucier maître et à 4°C en tubes à essai sur milieu TY solide incliné pour la sous collection de travail.

3.5.3 Caractérisation morphologique des isolats

3.5.3.1. Aspect macroscopique des colonies

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu YMA, après quelques jours d'incubation à 28°C. Ce test vise à étudier les caractères suivants : l'aspect, la forme, la couleur, la taille, la viscosité.

3.5.3.2. Aspect microscopique des colonies

Afin d'exclure les contaminants gram positif, une coloration de gram est été réalisée afin de voir si les cellules sont colorées en rose (gram négative).

3.5.4. vitesse de croissance

Sur le milieu YMA+BTB (voir annexe 1) nos isolats sont ensemencés. L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive.

3.6. Identification biochimique

3.6.1. Caractérisation enzymatique

3.6.1.1. Test catalase

Ce test consiste à mettre les bactéries en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La dégradation de ce dernier en eau et dioxygène visible par la formation des bulles démontre la présence de la catalase.

3.6.1.2. Test oxydase

Le test oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries gram négative qui produisent cette enzyme.

A l'aide d'une pince stérile on place les disques oxydases conservés dans des flacons sur des boîtes pétries stériles ; et par l'utilisation d'une pipette pasteur stérile, nous faisons le prélèvement d'une colonie bien isolé. On n'utilise pas une anse de métal cela peut provoquer des réactions faussement positives.

Frotter doucement la colonie isolée sur le disque et observer l'apparition d'une coloration rose ou violette dans un délai de 30 secondes.

3.6.1.3. Recherche de la citrate perméase

On ensemence en strie centrale sur le milieu Citrate de Simmons chaque isolat, et après incubation à 28°C pendant 72 h, on remarque un virage de couleur du milieu en bleu si la bactérie possède une citrate perméase et utilise le citrate comme une seule source de carbone ; Sinon pas de changement de couleur.

3.6.1.4. Hydrolyse de l'urée

L'activité uréase des souches a été testée, les résultats sont évalués après incubation dans le milieu urée indole à 28°C pendant 24 h. Une coloration rouge (pouvant aller jusqu'au rose fuchsia) indique l'hydrolyse de l'urée (alcalinisation du milieu) alors que la couleur orange indique une réaction négative.

3.6.1.5. Production d'Indole

L'addition de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs au milieu Urée Indole et une agitation légère permette à la formation d'un anneau rouge en présence d'Indole.

3.6.2. Résistance aux antibiotiques

C'est un test qui permet de mesurer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il consiste en l'ensemencement des cultures diluées sur le milieu Muller-Hinton (voir annexe 1). Ensuite l'application des disques chargés d'antibiotiques à la surface du milieu. Après 5 jours d'incubation à 28°C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de certains disques. La lecture des résultats consiste à mesurer, à l'aide d'un pied à coulisse, le diamètre des zones d'inhibition pour chaque antibiotique.

3.7. Etude physiologique

3.7.1. Tolérance à la salinité (NaCl)

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance à la salinité par la détermination de la croissance sur milieu YMA additionné de NaCl à des concentrations : 0.6M, 0.8M, 1M, 1.5M. (Incubation à 28°C, lecture après 2 ou 3 jours).

3.7.2. Effet du PH

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMA ajusté à différents PH : 4, 5, 9 et 11. Deux répétitions sont réalisées pour chaque PH.

L'évaluation de la croissance est effectuée par l'observation à l'œil nue après incubation à 28 °C pendant 2 ou 3 jours.

3.7.3. Effet de la température

Les souches sont mises en culture sur le milieu YMA et incubées à différentes températures : 5°C, 10°C, 15°C, 35°C, 40°C et 45°C. Deux répétitions sont effectuées pour chaque température. La croissance est observée après 72 h.

3.8. Test nutritionnels

3.8.1. Assimilation des sucres

L'utilisation des sucres comme source de carbone par les bactéries est effectuée dans des tubes à essai contenant le milieu YEM+ Pbc (voir annexe 1) sur lequel on ajoute des solutions des glucides préparées (voir annexe 1). Les sucres utilisés sont les suivants : Glucose, Lactose, Fructose, Inositol, Galactose, Amidon, Saccharose, Mannitol. Les tubes sont incubés pendant 03 jours à 28°C. L'assimilation de sucres par des souches est évaluée par le virage du couleur de milieu vers le jaune.

Chapitre 4.

Résultats et discussions

4.1. Test de nodulation

Le but de ce test est l'évaluation de l'existence des bactéries capable de former des nodules sur les racines de la légumineuse *Phaseolus vulgaris* L. dans ces sols. Ainsi, l'isolement des BNL parmi les autres micro-organismes de sol.

Tableau 3. Résultats du test de nodulation

Code d'échantillon de sol	Nodulation	Nombre de pot(s)	Nombre de nodule	Remarques		
				Couleur	Forme	Taille
ES1	+	2/3	++++	Bien rose	Rond	Moyenne
ES2	+	1/3	+	/	En amas	Petite
ES3	+	1/3	Très limité (+)	Légèrement rose	Rond	Moyenne
ES4	+	2/3	++	Blanchâtre	Indéterminé	Grand
ES5	+	1/3	+	/	/	Petite
ES6	+	1/3	++	Légèrement rose	Rond	Moyenne
ES7	-					
ES9	-					
ES10	-					
ES11	-					
ES12	-					

4.1.1. Absence ou apparition des nodules

Selon les résultats du tableau 3, la nodulation est observée pour six échantillons de sol. L'absence de la nodulation dans les six autres échantillons, ne permet pas de tirer la conclusion sur l'absence des BNL dans ces sols.

Ceci, pourrait être dû à la spécificité de nodulation de ces bactéries pour la plante hôte. Aussi sa disponibilité qui peut changer en raison de l'histoire de l'utilisation des terres (Wedhastri, 2013).

4.1.2. Nombre de pots

La nodulation a été négativement affectée dans trois examinés (ES2, ES3, ES5, ES6), et dans un sol seulement pour le reste.

La symbiose était efficace dans les deux tiers de sols pour ES4 et ES1, et inefficace dans les deux tiers qui restent.

4.1.3. Nombre des nodules

Le nombre des nodules diffère d'un échantillon à un autre. L'infectivité est facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées. Nous pouvons dire que les microorganismes qui résident dans les échantillons testés du sol de Ain Defla (ES1) sont les plus infectives. Par contre, la très faible infectivité est observée dans les sols de N'Gaous (ES3) (Dommergue, 1983).

4.1.4. Couleur des nodules

À partir des observations, il faut signaler que les nodules ont pris une couleur rose due à la présence de la légémo-globine qui signifie l'infection de la Phv.L par des BNL fixatrices d'azote c'est-à-dire qui sont efficaces d'après Dommergue (1983). L'échantillon ES1 est le plus efficace. Les échantillons infectives mais non efficaces.

Les nodules blancs sont des jeunes nodules ou des nodules qui vont devenir actifs ou inactifs.

*Quel que soit la plante hôte, la présence d'un nombre moyen ou plus de moyen des nodules dont la plupart sont de couleur rosâtre, on peut supposer que la fixation d'azote par les bactéries se comporte bien.

4.1.5. Forme des nodules

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués.

Les plantes du genre *Phaseolus* ont généralement une forme de nodule déterminée, c'est-à-dire peut prendre la forme sphérique ou ronde comme il était observé avec ES1, ES3, ES6.

4.2. Caractérisation phénotypique des rhizobiums

Des études ont été réalisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobiums. Une caractérisation phénotypique se base sur les critères morphologiques de la bactérie d'une part et de la colonie bactérienne d'une autre part ; les critères biochimiques (présence de différents enzymes) et la résistance aux antibiotiques ; ainsi que les critères physiologiques tel que la croissance à des températures différentes (Graham *et al.*, 1991).

4.2.1. Caractérisation morphologique des isolats et des bactéries

4.2.1.1. Aspect morphologique des isolats sur les milieux YMA, YMA+RC

Selon Vincent (1970), le critère phénotypique le plus important dans la caractérisation des *Rhizobiums* est la croissance dans le milieu YMA.

Tableau 4. Test de confirmation pour les isolats

Isolats bactériens	Croissance sur YMA+RC	Absorption de RC	Durée de croissance
Phv2	++	+/-	24 h
Phv4	++	-	7 j
Phv9	++	-	24 h
Phv10	++	++	24 h
Phv11	++	-	24 h
Phv20	+	-	7 j

Croissance : ++ : Bonne croissance, + : croissance faible, - : pas de croissance

Absorption : ++ : Absorption forte, + : +/- : Absorption très faible, - : pas d'absorption

La croissance sur milieu YMA ainsi que YMA+RC est détectable après quelques temps d'incubation à l'obscurité à 28°C.

Cinq isolats bactériens obtenus n'absorbent pas le rouge de Congo ou l'absorbent faiblement, ceci est observé chez la plus part des *Rhizobia* (Jordan, 1984 et Vincent, 1970) ; et ont maintenu leur couleur blanche une fois développés dans YMA+RC (Fig1a). Tandis que, l'isolat Phv10 considéré comme un contaminant parce qu'il est fortement coloré et peut être une espèce d'agrobactérie (Jordan, 1984).

Les isolats présentent un aspect des colonies circulaire, de diamètre variable, lisse et brillant, translucide et opaque, de couleur blanchâtre à crème, avec une texture mucilagineuse, (Tab.5 ; Fig.9, b). Ces résultats ont été enregistrés par Rai et Sen (2015).

Tableau 5. Caractérisation morphologique des isolats de *Rhizobiums*

Isolat	Phv20	Phv11	Phv9	Phv4	Phv2
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Taille	Petite	Moyenne	Moyenne	Petite	Moyenne
Couleur	Blanche	Crème	Blanche	Blanche	Crème
Surface	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse
Bord	Régulier	Régulier	Régulier	Régulier	Régulier
Élévation	Semi bombé	Bombé	Semi bombé	Semi bombé	Bombé
Opacité	Opaque	Translucide	Semi translucide	Opaque	Translucide
Texture	Mucilagineuse	Mucilagineuse	Mucilagineuse	Mucilagineuse	Mucilagineuse
EPS	+	++	++++	+++	+
D.C	7 j	24 h	24 h	7 j	24 h
Caractère morphologique de la colonie					

D.C : Durée de croissance ; EPS : Exopolysaccharide

Les colonies du Phv4, Phv20 ne sont visibles qu'après 7 jours, ceci indique que les bactéries ont un rythme de croissance lent.

On peut diviser nos isolats en deux groupes, le premier à croissance rapide dont lequel les colonies sont blanches, circulaires, translucides. Le dernier à croissance lente, ce groupe inclus des bactéries aussi circulaire, opaque, dont le diamètre ne dépasse pas 1 mm après incubation prolongés, les colonies typiques sont abondantes et sont caractéristiques des *Rhizobia*.

Après plusieurs repiquages, la pureté des isolats a été vérifiée par l'observation de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

4.2.1.2. Caractérisation microscopique

L'examen microscopique des isolats après coloration de Gram montre qu'ils sont de couleur rose indiquant un Gram négative (Tab.6) en forme de coccobacilles ; elle présente donc les caractéristiques morphologiques des souches de *Rhizobia* comme décrit par Vincent(1970) et Jordan(1984). Cet examen confirme leur pureté de la culture.

Tableau 6. Résultats de la caractérisation microscopiques des bactéries isolées

Isolat	Observation microscopique		
	Forme	Couleur	Résultat de CG
Phv2	Coccobacille	Rose	-ve
Phv4	Coccobacille	Rose	-ve
Phv9	Coccobacille	Rose	-ve
Phv11	Coccobacille	Rose	-ve
Phv20	Coccobacille	Rose	-ve

CG : Coloration de gram ; -ve : négative

4.2.1.3. Détermination des rapidités de croissance

A l'exception des souches Phv20 et Phv4 qui provoque l'alcalinisation du milieu YMA au BTB, c'est la souche à croissance lente d'après Jordan(1985), la plupart des isolats provoquent son acidification c'est à dire changement de la coloration vers le jaune, cette

propriété nous permet de les considérées en tant que des bactéries à croissance rapide (Tab.7 ; Fig.10).

Tableau 7. Résultat du test au bleu de bromothymol

Isolat	Test de BTB	
	Couleur du milieu	Résultat
Phv2	Jaune	Acidification
Phv4	Bleue	Alcalinisation
Phv9	Jaune	Acidification
Phv11	Jaune	Acidification
Phv20	Bleue	Alcalinisation

Tous ces résultats approuvent l'observation faite par de divers travailleurs (Saoudi , 2017 ; Rai et Sen, 2015 et Nirmala Kumari et *al* .,2016).

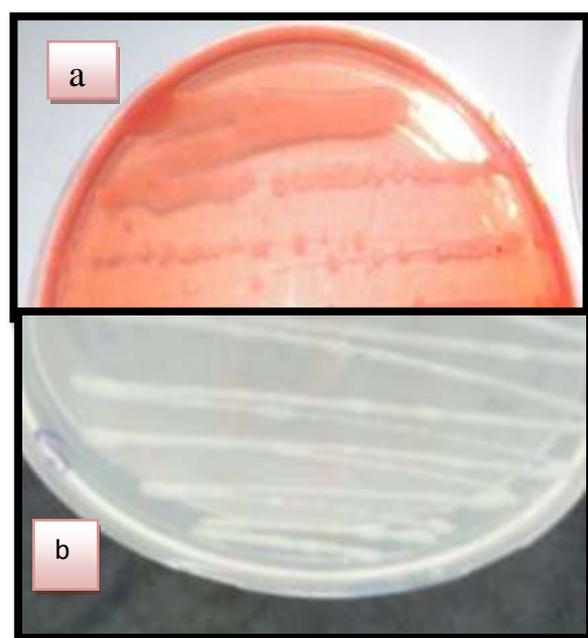


Figure 9. Aspect des isolats sur:

a) YMA+RC: b) YMA

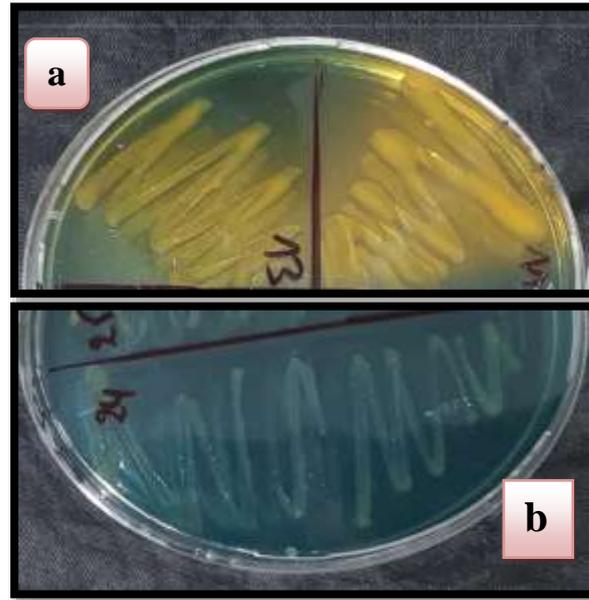


Figure 10. Isolat sur milieu YMB+BTB

(a) à croissance rapide (b) à croissance lente

4.3. Caractérisation biochimique

4.3.1. Recherche d'enzymes spécifiques

Les résultats du (Tab.10) révèlent que toutes les souches sont catalase et oxydase positif sauf la souche Phv9.

La présence de la catalase et d'une oxydase est l'une des caractéristiques principale des souches de *Rhizobium* (Vincent, 1981).

A l'exception de la souche Phv4, toutes les souches possèdent un citrate perméase permettent d'utiliser le citrate comme une seule source de carbone. Cette l'exception est observé aussi avec (Nirmala Kumari et *al.*, 2017).

L'activité enzymatique uréase est retrouvée dans la majorité des souches (Nirmala Kumari et *al.*, 2017) tandis qu'elle est absente chez la souche Phv4.

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

Pour connaître la capacité des isolats à produire l'indole acide acétique (IAA), Il devrait être au milieu contenant la L-tryptophane comme précurseur de synthèse (le milieu UI). La

révélation de ce dernier est observée après l'ajout du réactif de Kovacs qui réagit avec l'indole par formation d'un composé rouge.

La synthèse de cette phytohormone est observée chez l'isolat Phv9 seulement, ce qui indique sa capacité de le produire à partir de tryptophane par la voie de l'indole-3-acétamide (Spaepen, 2007). Cette dernière était l'une des voies utilisées par certaines espèces de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* (*Rhizobium spp*) qui étaient distinguées par leur potentiel à entrer en symbiose avec la *Phaseolus vulgaris* Küçük et Cevheri (2016). Ce résultat était observé par Chinnannan Karthik et al, 2016.

Des isolats obtenus à partir de la *Phaseolus vulgaris L* par des chercheurs (Nurmala Kumari et al., 2017) montre qu'ils sont indole négatifs ; Ceci est cohérent avec les résultats que nous avons obtenus qui signifie l'absence de ces deux enzymes le tryptophane-2-monooxygénase (IaaM) et la indole-3-acétamide hydrolase (IaaH) dans nos souches (Cheriet, 2006).

La capacité de la synthèse IAA a été détectée dans beaucoup de bactéries rhizosphériques parmi lesquelles certaines *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Il est possible que les échantillons soient capables de produire l'indole par une autre voie.

Tableau8. Résultats du test biochimiques

Test biochimique	Isolats				
	Phv2	Phv4	Phv9	Phv11	Phv20
Catalase	+	+	-	+	+
Oxydase	+	+	-	+	+
Citrate perméase	+	-	+	+	-
Uréase	+	-	+	+	+
Indole	-	-	+	-	-

+ : Résultat positive ; - : Résultat négative



Figure 11. Résultats de test d'oxydase

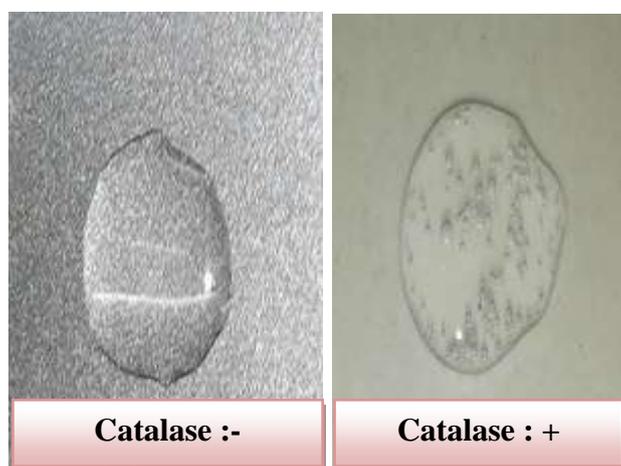


Figure 12. Résultats de test de catalase

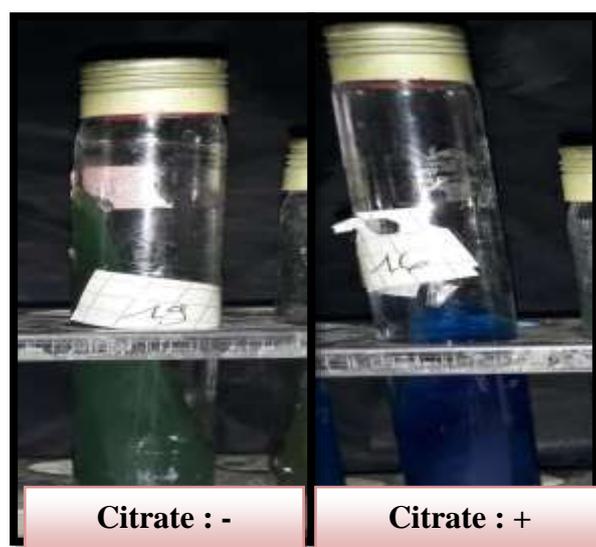


Figure 13. Résultats de test de citrate

4.3.2. Résistance aux antibiotiques

Nous avons recherché l'antibiorésistance chez les souches étudiées vis-à-vis de six antibiotiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 9. Résultats de test de la résistance aux antibiotiques

Isolat	Antibiotiques					
	DCX	CTX	AX	MUP	C	CL
Phv2	R	SI	R	R	SI	R
Phv4	S	R	R	R	R	R
Phv9	R	R	SI	R	R	R
Phv11	R	R	R	R	R	S
Phv20	R	SI	SI	R	SI	S

R : Résistante ; S : Sensible ; SI : Sensibilité intermédiaire.

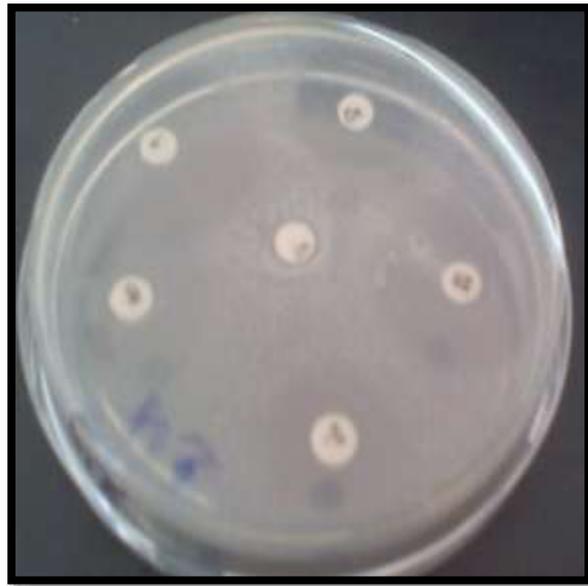


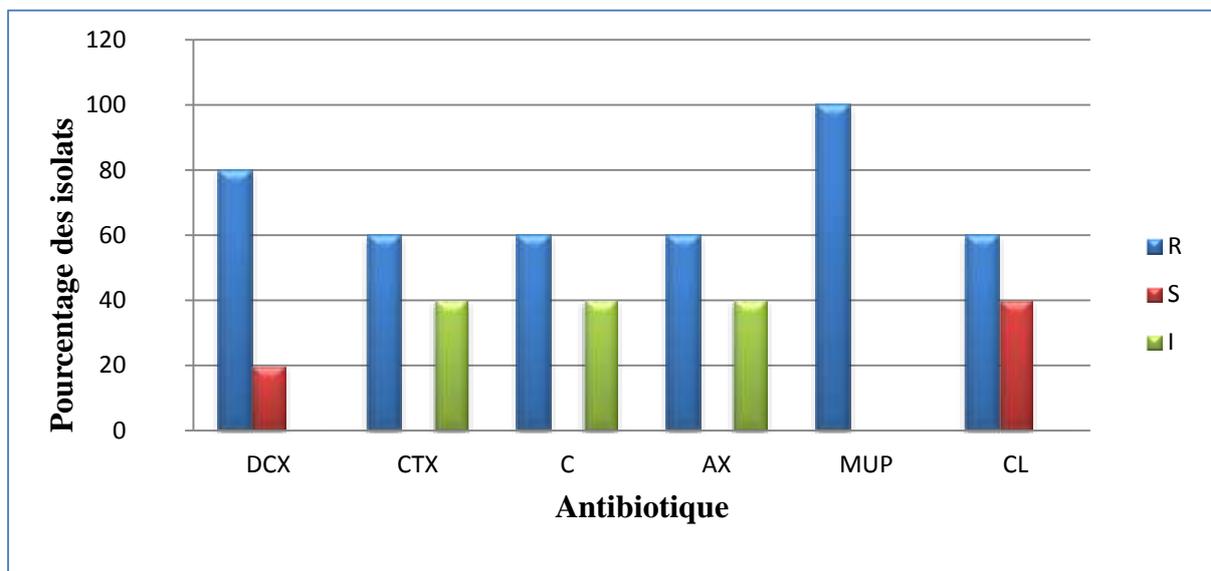
Figure 14. Résultats de l'antibiogramme

Une variabilité de la résistance des souches vis-à-vis aux antibiotiques testés a été observée. Nos souches se sont révélées résistantes à la Mupirocine.

Certaines souches sont résistantes à l'Amoxicilline (Phv2 ; Phv4, Phv11), à la Céfalexine (Phv9) et à aux Céfotaxime et au Chloramphénicol (Phv11). Et au Céfotaxime, Amoxicilline et Chloramphénicol pour les isolats à croissance lente (Phv4, Phv20).

La sensibilité intermédiaire était détectée avec Phv9 à l'Amoxicilline et Phv2 au Chloromphénicol. Ainsi une sensibilité à la Dicloxacilline (Phv9), à la Céphalexine (Phv11, Phv20).

La résistance des souches pour 06 antibiotiques, dépasse les 60%, ce qui est très remarquable avec la Mupirocine .



R : Résistant ;S :Sensible ;I : Sensibilité intermédiaire

Figure 15. Effet des différents antibiotiques sur la croissance des isolats

Ces isolats pourraient avoir développé une résistance aux antibiotiques à cause de la coexistence avec les organismes produisant des antibiotiques ou plasmides porteurs, qui portent des gènes pour la résistance des antibiotiques (Diriba, 2007).

4.4. Caractérisation physiologique

4.4.1. Effet du chlorure de sodium

La croissance de toutes les espèces *Rhizobial* a été affectée par l'effort de sel, mais elle montre une variation significative dans la capacité de tolérance au sel (Dong et al., 2017).

Les résultats obtenus, rapportés dans le tableau 10 montrent que la croissance des isolats est optimale pour toutes les concentrations d'NaCl testées (0.3, 0.4, 0.6 M).

La souche Phv4 reste tolérante aux concentrations d'NaCl allant jusqu'à 1 M.

Les résultats d'Abdelmoumen (1999) indiquent que l'espèce USDA2671 isolé de l'haricot commun, peut se développer au-dessous de 0.8 M de NaCl, mais est empêchée par

traitement avec 1 M de NaCl c'est la même chose pour l'espèce Phv2 qui a été complètement empêchée par 1 M et 1.5 M.

Généralement, les espèces de *Bradyrhizobia* sont considérées en tant que espèces sensible au sel comparé aux autres espèces *Rhizobial* (Elsheikh, 1998). Ce résultat ne reflète que l'échantillon Phv20. Et contredit complètement le résultat de l'échantillon Phv4.

Parmi les espèces de *Bradyrhizobia* isolés des nodules de la *Phaseolus vulgaris L*, Phv4 es plus tolérante au sel. Tandis que l'espèce Phv2 est la plus sensible par rapport aux autres.

croissance rapide et celle à croissance lente même celle observé par Hatimi et al (2001).

La tolérance à la salinité est plus spécifique à l'espèce (Amarger et al .,1997).

L'accumulation des composés osmoprotective dans les *Rhizobia* est considérée une stratégie efficace d'adaptation pour l'effort salé en protégeant les cellules contre la dessiccation. (Reina-Bueno et al, 2012).

Tableau 10. Résultats de croissance sur différente concentration de NaCl

Isolat	Concentration d'NaCl (M)						Gamme d'NaCl (M)
	0.3 M	0.4 M	0.6 M	0.8 M	1 M	1.5 M	
Phv2	++	++	+	+	-	-	0.3-0.8
Phv4	++	++	+++	+++	+++	+	0.3-1.5
Phv9	++	++	+++	++	++	+	0.3-1.5
Phv11	++	++	+++	++	++	+	0.3-1.5
Phv20	++	++	++	++	++	+	0.3-1.5

+++ : Très bonne croissance ++ : croissance moyenne + : faible croissance

4.4.2. Effet du PH

D'après les résultats enregistrés (Tab.13), on remarque que tous les isolats poussent dans une gamme de pH entre 4 et 9.

Même lorsque l'optimum de pH pour la croissance des rhizobiums est entre 6 et 7 (Jordan, 1984), quelques espèces peuvent survivre à un Ph égale ou inférieur à 5

(Iruthayathas *et al.*, 1985), parmi ces espèces on a rapporté *R.tropici*, *Bradyrhizobium sp* (Brokwell *et al.*, 1995 ;Ademer *et al.*, 2012).

Ils ont toujours une tolérance identique à l'alcalinité, mais ils se comportent différemment à l'acidité (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Beck *et al.*, 1993).

D'après Brokwell *et al.*, (1991), les *Brayrhizobium* sont plus tolérante à l'acidité que les *Rhizobium*.

Tableau 11. Représentation des résultats de l'effet du PH sur les souches bactériennes

Isolat	pH				Gamme de PH
	4	5	9	11	
Phv2	+	++++	+	-	4-9
Phv4	++	++++	+	-	4-9
Phv9	+	++	+	-	4-9
Phv11	+	++	+	-	4-9
Phv20	++	+++	+	-	4-9

++++: Très bonne croissance, +++: Bonne croissance, ++ : Croissance moyenne, +: Faible croissance,- : Absence de croissance

4.4.3. Effet de la température

Les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 5°C jusqu'à 40°C (Tab.14).

La température optimale de croissance pour la plupart de *Rhizobia* est le °C 25-30 d'après Zhang *et al.*, (1995), alors on peut considérer que nos isolats sont tolérants à la température.

Graham (1992) 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 souches est 28°C.

Un certain *Rhizobia* d'isolement dans des environnements avec les températures extrêmes en Afrique a montré un pour cent élevé de survie à 40°C (Karanja NK et Wood M., 1988).

Tableau 12. Représentation de l'effet de la température sur les isolats bactériens

Isolat	Température						
	5	10	15	35	40	45	Gamme de température
Phv2	+	+	+	++++	+	-	5-40
Phv4	+	+	+	++++	+	-	5-40
Phv9	+	+	+	++++	++	-	5-40
Phv11	-	+	+	++++	++	-	10-40
Phv20	-	-	+	++++	-	-	15-35

++++: Très bonne croissance, ++: Bonne croissance, +: Faible croissance, - : Absence de croissance

4.5. Test nutritionnelle

4.5.1. Utilisation des sucres comme source de carbone

D'après les résultats obtenues pour ce test (Tab.10), les souches présentent peut de variabilité sur leurs profils de dégradation des sucres.

Les résultats de cette étude montrent que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété des hydrates de carbone comme source de carbone, ce qui est confirmé par Vincent (1970), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994).

La majorité des souches sont capables de dégrader le mannitol, glucose, galactose, fructose, saccharose, xylose.

Wei et al (2008) ont rapporté que certaines souches nodulant *Astragalus*, *Lespedeza* et *Hedysarum* ne peuvent utiliser le Lactose comme seule source de carbone. Les mêmes résultats sont trouvés par Nirmala Kumari et al., (2017).

Tableau 13. Résultats d'assimilation des sucres

Isolat	Sucre								
	Glu	Gal	Lac	Fru	Sac	Xyl	Ino	Ami	Man
Phv2	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Phv4	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Phv9	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Phv11	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Phv20	-	+	-	+	+	+	-	-	+

Glu : Glucose, Gal : Galactose, Lac: Lactose, Sac : Saccharose, Xyl : Xylose, Ino: Inositol, Ami: Amidon, Man: Mannitol ; +: Utilisation de sucre; -:Pas d'utilisation.

Conclusion générale

Conclusion

Dans cette étude, nous avons procédé à une caractérisation des bactéries nodulantes la légumineuse *Phaseolus vulgaris* L. cultivé dans des sols provenant des différentes régions algériennes. : Médéa, Skikda, Ain Defla, N'Gaous, Mascara, Ghadaia, Oran, El hadjeb, Bordj Bou Ariridj, Adrar, Rhilizane. Les prestations symbiotiques ont montré toute une hétérogénéité dans la taille, la forme et la couleur des nodules ainsi induits.

Notre étude nous a permis de disposer d'une collection de 6 souches isolées de nodules racinaires des plantes. Selon les techniques usuelles propres aux *Rhizobia* selon Vincent (1970) ; Somasegaran et Hoben (1994) et Jordan (1984).L'ensemble des résultats obtenus concernant l'étude morphologique et culturale, ainsi que l'examen microscopique, ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères comparables au genre *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*.

En effet l'aspect, la couleur et la forme des colonies sur le milieu YMA, YMA+ rouge Congo et la croissance rapide sur YMA+BTB peuvent nous orienter vers le genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970 et Jordan, 1984). Ces mêmes souches possèdent les enzymes nécessaires pour infecter la plante et induire le processus de nodulation.

L'étude de variation du pH montre la capacité des souches à pousser sur une gamme de pH variant de 4 à 9. La plupart des souches isolées sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 40°C. Comme elles tolèrent les basses et les hautes températures, l'analyse des souches vis-à-vis aux antibiotiques montre une sensibilité différente d'une souche à une autre vers tous les antibiotique testés.

Les tests nutritionnels montrent la capacité des souches examinées d'utiliser une large gamme des carbohydrates comme source de carbone.

Les légumes secs revêtent une importance stratégique pour l'alimentation surtout humaine, l'Algérie souffre toujours d'une production agricole insuffisante, raison pour laquelle, l'Algérie devrait promouvoir les recherches visant le développement et l'amélioration du rendement agricole des légumineuses.

Les travaux présentés dans cette étude s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration du rendement agricole du *Phaseolus* en Algérie par le biais d'une

fixation biologique de l'azote atmosphérique tout en établissant une symbiose *Rhizobium*-légumineuse qui présente un intérêt économique et agronomique considérable.

Bibliographie

- Abdelmoumen H., Filali-Maltouf A., Neyra M., Belabed A., El Idrissi M.M. . 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol* 86: 889–898
- Ademar A F., Aparecida C., Lima B, Souza FM.2012. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World J Microb Biot* 28: 19-47
- Allen O.N., Allen E. K. 1950. Biochemical and Symbiotic Properties of the rhizobia. *Bacterial.Rev* 14(4): 273-330
- Amarger N., Macheret V., Laguerre G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47:996–1006
- Baba Arbi S.2016. Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus*(L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de doctorat, université Badji Mokhtar, Annaba, 141 p.
- Beck D. P., Materon L. A., Afandi F.1993. *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*. ICARDA. Syria.
- Bohloul B B, Ladha J K, Garrity D P.,George T .1992 Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil* 141, 1–11.
- Bordeleau L. M., Prevost D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161:115-124.
- Brockwell J, Bottomley P. J., Thies J. E .1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174:143–180
- Broughton W.J., Hernandez G. , Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J.2003.Beans(*Phaseolus* sp).Model food legumes. *Plant and Soil* 252, 55-128
- Chebbi H. D., Lachaal L. 2004. L’agriculture et la sécurité alimentaire : une étude comparative des pays des Maghreb. *New Medit* (3) 4-19

- Cherriet D. 2016. Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'azote. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 117 p.
- Cohen M F, Sakihama Y, Yamasaki H .2001.Roles of Plant Flavonoïdes in Interactions with Microbes: from protection against pathoges to the mediation of mutualism. Recent Res. Devel. Plant Physiol, 2: 157-173.
- Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylonenetics and phylogenomics. Current Opinion in plant biology 9: 99-103
- Dénarié J.2000. Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000
- Diriba T. 2007: Nodulation Pattern and Biodiversity of Endosymbionts of Some Woody Legumes of Ethiopia. Thèse de Master en science de biologie de l'université d'Addis Abab
- nDong R.,Zhang J,,Huan H,,Bai C,Chen Z.,Liu G. 2017. High Salt Tolerance of a *Bradyrhizobium* Strain and Its Promotion of the Growth of *Stylosanthes guianensis*. Int. J. Mol. Sci 18, 1625:1-17.
- Elsheikh E.A.E. 1998. Effects of salt on *Rhizobia* and *Bradyrhizobia*: A review. Ann. Appl. Biol 132:507-524.
- Faghire M. 2012. Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse, université Cadi Ayyad, Marrakech, 94 p
- FAO, 2009. *Preliminary 2009 data now available for selected countries and products*.
- Franche C, Lindström K. and Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil, 321: 35–59
- Graham P. H.1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil-conditions. Can J Microbiol 38:475–484

- Graham P.H., Vance C . P.2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131 : 872-877.
- Hannane F. Z.2017. Sélection et caractérisation des souches de rhizobia isolées de *Retama monosperma* (L.) Boiss. à haute capacité de nodulation. Thèse de doctorat, université Mohammed Boudiaf, Oran, 126 p.
- Hatimi A . Bani-Aameure F., Oihabie A.2001. Caractérisation de souches de Rhizobiums autochtones des dunes :effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta Bot. Gallica* 148 (3): 191-199.
- Hirsch A. M. Fujishige N. A.2012. Molecular signals and receptors: communication between nitrogen-fixing bacteria and their plant hosts, in *Biocommunication of Plants*, eds G. Witzany and F. Baluška (Berlin: Springer Berlin Heidelberg), 255–280
- Hirsch A. M. 2001. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) legume nodulation. *Biotic interaction* 19: 320-326
- Hirsch A. M., Fujishige N. A.2012. Molecular signals and receptors: communication between nitrogen-fixing bacteria and their plant hosts, in *Biocommunication of Plants*, eds G. Witzany and F. Baluška (Berlin: Springer Berlin Heidelberg), 255–280
- Iruthayathas E.E ., Vlassak K .1985.The Effect of Soil pH on Nodulation and N₂-Fixation of Winged Bean *Psophocarpus tetragonolobus* (L) D.C. *Rhizobium Strains*. *J Plant Nutr Soil Sc* 148: 544–550.
- Jordan D. C., 1984. Family III. Rhizobiaceae. In: Krieg N. R., Holt J. G., (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. p 234 - 242.
- Joyeux C. 2015. Améliorer et renforcer la sécurité alimentaire et nutritionnelle es populations u sud face au défi du développement durable : les solutions de l'agroécologie. Thèse de doctorat d'état, université De Lorraine, France, 280 p.

Jordan D.C.1984 .Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In: N.R. Kreig et J.H. Holt (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wlikins Co. Baltimore.

Karanja NK., Wood M.1988. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. Plant Soil 112 :15–22.

Küçük Ç., Cevheri C.2016. Indole Acetic Acid Production by *Rhizobium* sp. Isolated from Pea (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense*) Bezelye (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense*)'den İzole Edilen *Rhizobium* sp. Tarafından İndol Asetik Asit Üretimi.Turkish Journal of Life Sciences L 1/1:043-045

Latati M. 2015. Modélisation de la dynamique du carbone et de l'azote dans le système d'association légumineuses-céréales: Rôle fonctionnel de la symbiose rhizobienne dans le contrôle de la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère.Thèse doctorat, ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE El-Harrach, ALGER, 126 p.

Latati M. 2012. Adaptation e la symbiose légumineuse haricot-rhizobium à la déficience en phosphore. Thèse de Magistère, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach Alger, 103 p.

Lazreg-Ben Friha F. 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de doctorat, université Toulouse III - Paul Sabatier, 215 p.

(Lazreg-Ben Friha, 2008)

Lebidda F. 2009. Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières. Thèse de doctorat, NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE El-Harrach, ALGER, 101 p.

Long, S. R. 1996Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell **8**, 1885-1898.

- Reina-Bueno M., Argandoña M., Nieto J.J., Hidalgo-García, A., Iglesias-Guerra F., Delgado M.J., Vargas C.2012.Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbial* 12, 207
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Fems Microbiol Rev* 31: 425–448.
- Nirmala Kumari N B., Nagaraju B., Mallikarjuna K. 2017. Biochemical characterization and protein profile by SDS-Page Of French Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Associated Rhizobia. *Innovat International Journal Of Medical & Pharmaceutical Sciences* 2(2) 8-13
- Nirmala Kumari N B., Nagaraju B., Rkv Tirupati Y R. 2016. Isolation and purification of *Rhizobium* from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root nodules. *J. Biol. Today's World* 5 (2): 30-34.
- Zahir Z.A., Shah M.K., Naveed M., Akhter, M.J. 2010. Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol* 20: 1288–1294
- Zhang F., Lynch DH., Smith DL.1995. Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max* (L) Merr] on nodulation and nitrogen fixation. *Environ Exp Bot* 35: 279–285.

Site web

- [1] <http://jardinonssolvivant.fr/les-legumineuses-par-chloe-paul-victor-partie-12/>
Consulté le 17-05-2018.
- [2] https://24timezones.com/mapa_fr/algiers.php
- [3] <http://fr.db-city.com/>

Annexes

Annexe1.Solutions et milieu de cultures utilisées**A) Composition du milieu YMB**

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

Ajuster le pH à 6.8 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

B) Composition du milieu YMA

Mannitol.....	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.2g
Extrait de levure.....	0.4g
NaCl.....	0.1g
Agar.....	18g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 6.8 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

C) Composition du milieu YMA+RC (Vincent 1970)

Mannitol.....	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.2g
Extrait de levure.....	0.4g
NaCl.....	0.1g
Rouge de Congo 1%.....	10ml
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 6.8 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

D) Composition du milieu TY (Tryptone Yeast Extract)

Tryptone.....	5g
Extrait de levure.....	0.4g
CaCl ₂ (H ₂ O).....	0.87
Eau distillée.....	1000ml

F) Composition du milieu citrate de simmons

Citrate de sodium.....	1,0 g
Bleu de bromothymol.....	0,08 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Sulfate de magnésium.....	0,2 g
Hydrogénophosphate de potassium....	1,0 g
Dihydrogénophosphate d'ammonium...	1,0 g
Agar-agar.....	15,0 g

PH..... 6,9

G) Milieu urée indole (UI)

L-Tryptophane.....	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl.....	5 g
Urée.....	20 g
Alcool à 95.....	0.01 ml
Rouge de phénol à 1 pourcent.....	0.025 g
Eau distillé.....	1 L

ph=6.8+/-0.2

H) Milieu Muller Hinton

Infusion de viande de boeuf.....	300 cm ³ .
Peptone de caséine.....	17,5g.
Amidon du maïs.....	1,5g.
Agar.....	7g.
Eau distillée.....	100 ml.

Ajuster le pH à 7,4 avant autoclavage à 120 °C pendant 15 minutes.

I) YEM +Pbc

K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.2g
Extrait de levure.....	0.4g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée	1000 ml
Pourpre de bromocrésole.....	2%

Ph= 6.8

J) Solution glucidique

Glucide	Concentration	Mode de stérilisation
Glucose	30%	Tyndallisation
Galactose	30%	Tyndallisation
Lactose	25%	Tyndallisation
Fructose	30%	Tyndallisation
Saccharose	30%	Tyndallisation
Xylose	30%	Tyndallisation
Inositol	20%	Tyndallisation
Amidon	5%	115°C, 10 min.
Mannitol	20%	110°C, 10 min.

Annexe02

K) Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques

Isolat	Diamètres (cm)					
	DCX	CTX	AX	MUP	C	CL
Phv2	-	2.5	1.4	0.75	1.95	-
Phv4	2	0.85	0.85	0.85	0.85	-
Phv9	-	2	1.95	0.85	2	1.15
Phv11	0.85	-	-	1.4	-	1.85
Phv20	-	2.55	2.15	1.45	2.55	2.25

- : pas de zone d'inhibition

L) Les valeurs limites du comité de l'antibiogramme de la société française de

Microbiologie (Bonnet et *al.*, 2012)

Antibiotique	Sigle	Charge du disque	Diamètre critique (mm)	
			S	R
Dicloxacilline	DCX	1 µg	>18	<17
Céfotaxime	CTX	30 µg	>26	<23
Amoxicilline	AX	25 µg	>23	<16
Muporocine	MUP	5 µg	>19	-
Chloromphénicole	C	30 µg	>23	<19
Céfalexine	CL	30 µg	>18	<12

ملخص

هذا العمل يهدف الى دراسة التنوع البيولوجي المظهري لل BNL المعزولة من العقد الجذرية للبقولية *Phaseolus vulgaris* L المزروعة في تربة متحصل عليها من مناطق مختلفة من الجزائر بعد الزراعة وجدنا 6 من اصل 11 نبتة تشكلت فيها عقد جذرية . بعد الدراسة المورفولوجية للعزلات ال6 المتحصل عليها ، وجدت أن 5 منها تمتلك خصائص كل من جنس الريزوبيوم وبرادير ايزوبيوم . تحتوي العزلات على إنزيمات الكاتالاز ، أوكسيديز ، يوريز ، وسينترات بارمياز . معظم العزلات سلبية الأندول . تظهر نتائج الاختبارات الفزيولوجية أن غالبية عزلاتنا يمكن أن تتحمل درجة حرارة تصل إلى 40 درجة مئوية ، ودرجة الحموضة ، كما هو الحال بالنسبة لمقاومة كلوريد الصوديوم ، يمكن أن تصل إلى 1.5 M . يظهر الاختبار التغذي ونتائج المضاد الحيوي أن العزلات تستخدم مجموعة واسعة من الكربوهيدرات وهي مقاومة للمضادات الحيوية بشكل مختلف .

الكلمات المفتاحية: *Phaseolus vulgaris* L; الريزوبيوم; برادير ايزوبيوم; التحمل; المقاومة; BNL.

Résumé

Cette étude a pour objectif la révélation de la biodiversité phénotypique des BNL isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Phaseolus vulgaris* L. cultivé dans différents sols de l'Algérie. Après culture, 6 plante parmi 11 qui ont nodulé.

Après une étude morphologique de ces six isolats obtenus, il se trouve que seulement 5 isolats qui possèdent des propriétés des deux genres : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*

Les isolats possèdent une enzyme catalase, oxydase, uréase et une citrate perméase. La plupart des isolats sont indole négative. Les résultats des tests physiologiques montrent que la majorité de nos isolats peuvent tolérer une température allant jusqu'à 40°C, et un pH acide, quant à la résistance à l'NaCl, elle peut aller jusqu'à 1.5 M.

Le test nutritionnel et les résultats de l'antibiogramme montrent que les isolats utilisent une large gamme des hydrates de carbone et résistent différemment aux antibiotiques.

Mots clés : *Phaseolus vulgaris* L ; *Rhizobium* ; *Bradyrhizobium* ; Tolérance ; Résistance ; BNL.

Abstract

This study aims to reveal the phenotypic biodiversity of BNL isolated from the root nodules of the legume *Phaseolus vulgaris* L. grown in different soils of..After cultivation, 6 of 11 plants nodulated.

After a cultural study, morphological six isolates obtained, they are found to possess properties of both genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.

The isolates have a catalase enzyme, oxidase, urease and a citrate permease. Most isolates are indole negative. The results of the physiological tests show that the majority of our isolates can tolerate a temperature up to 40 ° C, and an acidic Ph, as for the resistance to NaCl; it can go up to 1.5 M. The nutritional test and the results of the antibiogram show that the isolates use a wide range of carbohydrates and are resistant to antibiotics differently.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L; *Rhizobium*; *Bradyrhizobium*; Tolerance ; Resistance; BNL