



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

Référence / 2022

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

BOUCHAMEKH Siham

Le: jeudi 30 juin 2022

Caractérisation phénotypique de *Rhizobium* nodulant la tribu des *Genisteae* (*Genista microcephala*, *Argyrolobium uniflorum* et *Genista Saharae*)

Jury

Mr	Benbelaid Fethi	MCA	Mohamed Khider - Biskra	Président
Mme.	DJOUAMAA Manel	MAA	Mohamed Khider - Biskra	Rapporteur
Mme.	Absi Rima	MAA	Mohamed Khider - Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

*Avant tout je remercie DIEU (Allah) tout puissant de m'avoir
Donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.*

*Ensuite j'adresse mes remerciements à mon enseignante Mme
DJOUAMA Manel d'avoir bien voulu diriger ce travail et pour tous
Ses conseils fructueux et ses encouragements.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury qui ont
Accepté d'évaluer ce modeste travail.
En fin, un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de
Loin à la réalisation de ce modeste travail.*

Nos remerciements s'adressent aussi à tous les amis.

Dédicace

*A la lumière de mes jours, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que
J'adore.*

*A mon cher père pour lequel je souhaite une longue et heureuse vie pleine de bonheur, pour
Leurs sacrifices sans limites, leur amour et leur encouragement.*

♥ *A mes chères sœurs Imane, Kfiaoula et Ibtissam*

♥ *A mes frères Mouslem, Yassine, Ayoub et Abdou*

♥ *A ma sœur et ma chérie HADIL*

♥ *Pour mon très cher binôme : WARDA*

♥ *Chez les quels j'avais trouvé aide, conseils*

Et réconfort.

♥ *Toutes et tous qu'ils trouvent en ce mémoire, ma
Profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.*

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des Abréviations	III
Introduction	1

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1.1.Cycle de l'azote	3
1.1.1. Fixation biologique de l'azote	3
1.1.2. Ammonification	4
1.1.3. Nitrification	4
1.1.4. Dénitrification	4
1.2.Les légumineuses	5
1.2.1. Généralités	5
1.2.2. Classification et taxonomie de la légumineuse	5
1.2.3. La nodulation chez les légumineuses	6
1.2.4. Intérêts scientifiques des légumineuses	6
1.3.Taxonomie et caractéristiques du genre <i>Genista</i>	6
1.3.1. Espèce <i>Genista saharae</i> , <i>Genista Microcephala</i> et <i>Argyrolobuim unifloruim</i>	7
1.3.1.1.Espèce <i>Genista saharae</i>	7
1.3.1.2.Les différentes espèces nodulant la légumineuse <i>Genista saharae</i>	8
1.3.1.3.Espèce <i>Genista Microcephala</i>	9
1.3.1.4.Espèce <i>Argyrolobuim unifloruim</i>	10
1.4.Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)	11
1.4.1. Le <i>rhizobia</i>	11
1.4.2. Caractères généraux	12
1.4.3. La symbiose <i>rhizobium-légumineuse</i>	12

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

.2.1Présentation de la région d'étude	14
2.2.Mode opératoire	14

2.2.1.	Collecte des nodules	14
2.2.2.	Conservation des nodules	15
2.2.3.	Isolement des bactéries à partir des nodules.....	15
2.2.3.1.	Stérilisation de nodules	15
2.2.3.2.	Ecrasement des nodules	16
2.2.3.3.	Isolement des bactéries	16
2.3.	Caractères culturaux	17
2.3.1.	Principaux milieux de culture utilisés	17
2.3.2.	Purification des isolats.....	18
2.3.3.	Examens microscopiques	18
2.3.4.	Conservation des souches.....	18
2.4.	Caractérisation symbiotique	19
2.4.1.	Test de nodulation	19
2.4.2.	Préparation des jarres de Léonard	19
2.4.3.	Préparation du mélange : Sable –Vermiculite	20
2.4.4.	La récolte des graines	20
2.4.5.	Stérilisation des graines	20
2.4.6.	Germination des graines	21
2.4.7.	Inoculation des jarres.....	21
2.5.	Caractérisation phénotypique	21
2.5.1.	Caractérisation physiologiques.....	21
2.5.1.1.	Effet de la température.	21
2.5.1.2.	Effet de pH.	22
2.5.1.3.	Tolérance au NaCl	22
2.5.2.	Caractérisation nutritionnelle	22
2.5.2.1.	Source de Carbone	22
2.5.2.2.	Source d’azote	23
2.5.3.	Sensibilités et Résistances aux antibiotiques.....	23
Chapitre 3 : Résultats ET Discussions		
3.1.	Caractères culturaux	25
3.2.	Etude microscopique	26
3.3.	Test de nodulation	26

3.1.1.	Le résultat de Mahdhi <i>el al.</i> (2007)	26
3.1.2.	Les résultats de Chaich (2017)	29
3.1.3.	Les résultats d'Ahnia (2019).....	30
3.1.4.	Les résultats de Dekak (2010)	31
3.4.	Caractérisation phénotypique.....	33
3.4.1.	Caractérisation physiologiques et nutritionnelles.....	33
3.4.1.1.	Résultats de Mahdhi (2007).....	33
3.4.2.	Sensibilités et Résistances aux antibiotiques.....	33
3.4.1.2.	Le résultat Dekak et al.(2018) (<i>Genista microcephala</i> et <i>Argyrolobium uniflorum</i> 2018).....	36
3.4.3.	Sensibilités et Résistances aux antibiotiques.....	40
	Conclusion.....	43
	Références bibliographiques	44

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

TABLEAU 1: TAXONOMIE DES LEGUMINEUSES.....	5
TABLEAU 2: TAXONOMIE DE <i>GENISTA</i>	7
TABLEAU 3: LES DIFFERENTES ESPECES NODULANT LA LEGUMINEUSE <i>GENISTA SAHARA</i>	9
TABLEAU 4: CLASSIFICATION D' <i>ARGYROLOBIUM UNIFLORUM</i>	11
TABLEAU 5: DEFERENTES ETAPES DE L'ETABLISSEMENT DE LA <i>SYMBIOSE RHIZOBIA</i> - LEGUMINEUSE	13
TABLEAU 6: LA DIFFERENCE DE POURCENTAGE DE TEMPERATURE UTILISEE	21
TABLEAU 7: LA DIFFERENCE DE PH UTILISES	22
TABLEAU 8: LA DIFFERENCE DE CONCENTRATIONS DE NACL.....	22
TABLEAU 9: LA DIFFERENCE D'UTILISATION DES SUCRES	22
TABLEAU 10: LA DIFFERENCE D'UTILISATION DES ACIDES AMINES	23
TABLEAU 11: LES SOLVANTS DES ANTIBIOTIQUES UTILISES.....	24
TABLEAU 12: LA NODULATION DE <i>GENISTA SAHARAE</i> PAR DIFFERENTES SOUCHES	26
TABLEAU 13: LA NODULATION DE <i>GENISTA SAHARAE</i> INOCULEE PAR LES SOUCHES REPRESENTATIVE ET LA SOUCHE TYPE DE REFERENCE <i>E.GARAMANTICUS</i>	29
TABLEAU 14: RESULTATS DU TEST DE NODULATION POUR LES DEUX ESPECES <i>ARGYROLOBIUM UNIFLORUM</i> ET <i>GENISTA MICROCEPHALA</i>	31
TABLEAU 15: ISOLATS ET SOUCHES DE REFERENCE UTILISES DANS CETTE ETUDE ET LEURS CARACTERISTIQUES PERTINENTES.....	34
TABLEAU 16: CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES ISOLATS DE <i>RHIZOBIA</i> . +, CROISSANCE OU REACTION POSITIVE ; -, AUCUNE CROISSANCE OU REACTION NEGATIVE	38
TABLEAU 17: SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS DE <i>RHIZOBIA</i> . (SPECT : SPECTYNO MYCINE ; GENT : GENTAMICINE ; 1 KAN : KANAMYCINE ; KAN : KANAMYCINE;2 CHL : CHLORAMPHENICOL ; STREP : STREPTOMYCINE ; RIF : RIFAMPICINE ; ERY : ERYTHROMYCINE).....	41

Liste des figures

FIGURE 1: CYCLE DE L'AZOTE SIMPLIFIE POUR LES ECOSYSTEMES TERRESTRES	4
FIGURE 2: PHOTO DE <i>GENISTA SAHARAE</i> COSS& DUR	8
FIGURE 3: <i>GENISTA MICROCEPHALA</i>	10
FIGURE 4: <i>ARGYROLOBIUM UNIFLORUM</i>	11
FIGURE 5: CONSERVATION DES NODULES SOUS CaCl ₂	15
FIGURE 6: ENSEMENCEMENT PAR LA TECHNIQUE DES QUATRE CADRANS	17
FIGURE 7: JARRES DE LEONARD	19
FIGURE 8: L'EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CELLULES BACTERIENNES DONNE DES BACTERIES DE FORME DE BACILLE GRAM NEGATIF ET DE DIFFERENTES TAILLES.....	25
FIGURE 9: L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES CELLULES BACTERIENNES DONNE DES BACTERIES.....	26
FIGURE 10: TESTE DE NODULATION AVEC DIFFERENTES PLANTES LEGUMINEUSES	31

Liste des Abréviations

BNL	Bactéries nodulant les légumineuses
Coss et Dur	Cosson et Durieux
N₂	Azote moléculaire
YMA	Yeast-Mannitol-Agar
YMB	Yeast-Mannitol-Broth
TYA	Trypton- Yeast-Agar
CaCl₂	Chlorure de calcium
Nod	Nodulation de plante
Ph	Potentiel d'hydrogène
V/V	Volume /Volume
RC	Rouge Congou
spp	plusieurs espèces
GN	Gélose nutritive

Introduction

Introduction

Les légumineuses fournissent un nombre important de produits et améliorent la fertilité des sols. Ces produits principaux sources de protéines et l'huile végétale, au fourrage et bois combustible. Elles améliorent aussi la fertilité des sols grâce à leur capacité de fixer l'azote.

De plus les légumineuses jouent un rôle important de point de vie économique et dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines, elles sont aussi très importantes écologiquement vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables. La réduction de l'azote est réalisée généralement au niveau des racines des plantes dans des organes spécialisés appelées nodosités. Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. En retour, les bactéries tirent profit de l'interaction symbiotique en obtenant des hydrates de carbone produits par la plante pendant la photosynthèse (Dekak A. , 2010).

Le genre *Genista* fait partie des légumineuses, Il possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées. Ce genre se distingue également par ses effectifs élevés d'espèces sous espèces et ces variétés endémiques et rares (LOGRADA, 2010).

La symbiose Légumineuse-*rhizobia* constitue un procédé précieux permettant d'introduire de l'azote combiné dans des sols, pour les enrichir en azote et améliorer leurs fertilités, réduisant ainsi l'utilisation des engrais chimiques et autres intrants agricoles responsable de la dégradation des sols et de l'environnement.

Les facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, le pH, et la salinité du sol peuvent avoir un effet négatif ou positif sur la symbiose Légumineuse- *rhizobia*.

Dans ce contexte notre contributions à travers une synthèse bibliographique des articles scientifique publiée par (Mahdhi et *al.*, 2007 ; Dekak et *al.*, 2018) aura pour objectifs d'étudier la caractérisation phénotypique de *Rhizobium* nodulant la tribu des *Genisteeae* (*Genista microcephala* , *Argyrolobium uniflorum* et *Genista Saharae*).

Ce travail est réalisé en deux parties, une première partie consiste à une synthèse bibliographique : Chapitre 1 : Généralités sur la fixation biologique de l'azote, les légumineuses et les *rhizobia*. Et une deuxième partie construite par deux chapitres ; un

chapitre décrit matériels et méthodes utilisées pour la caractérisation phénotypiques et symbiotiques des bactéries nodulant légumineuses Étudiées. Le deuxième chapitre concerne les résultats et discussions.

Enfin, la conclusion tirées de ce travail et les perspectives pour les prochaines études.

**Première partie : Partie
bibliographique**

Chapitre 01 :
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1.1. Cycle de l'azote

L'azote est un élément présent en grande quantité chez les êtres vivants. La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de diazote (N₂) atmosphérique (Perte, 2007), 78% en volume, est un gaz incolore et inodore.

L'azote totales généralement réparti dans trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote, (Hopkins, 2003).

Les trois principales étapes de ce cycle sont : l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (Raven. E. , 2007).

1.1. Fixation biologique de l'azote

Les plantes supérieures ne fixent pas l'azote atmosphérique (GuignardJ.L, 2000), Les organismes qui fixent l'azote atmosphérique sont tous des micro-organismes telluriques, Bactéries Cyanobactéries et quelques Mycètes lévuriformes. Ce rôle des micro-organismes est connu depuis le XIXe siècle (Tourte Y., 2005).

On appelle fixation de l'azote le processus par le quel ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (Tortora G.J., 2003).

Dans un système biologique fixateur d'azote, les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250 à 1000 atm de N₂ et température de 450°C (Benjamine, 2007).

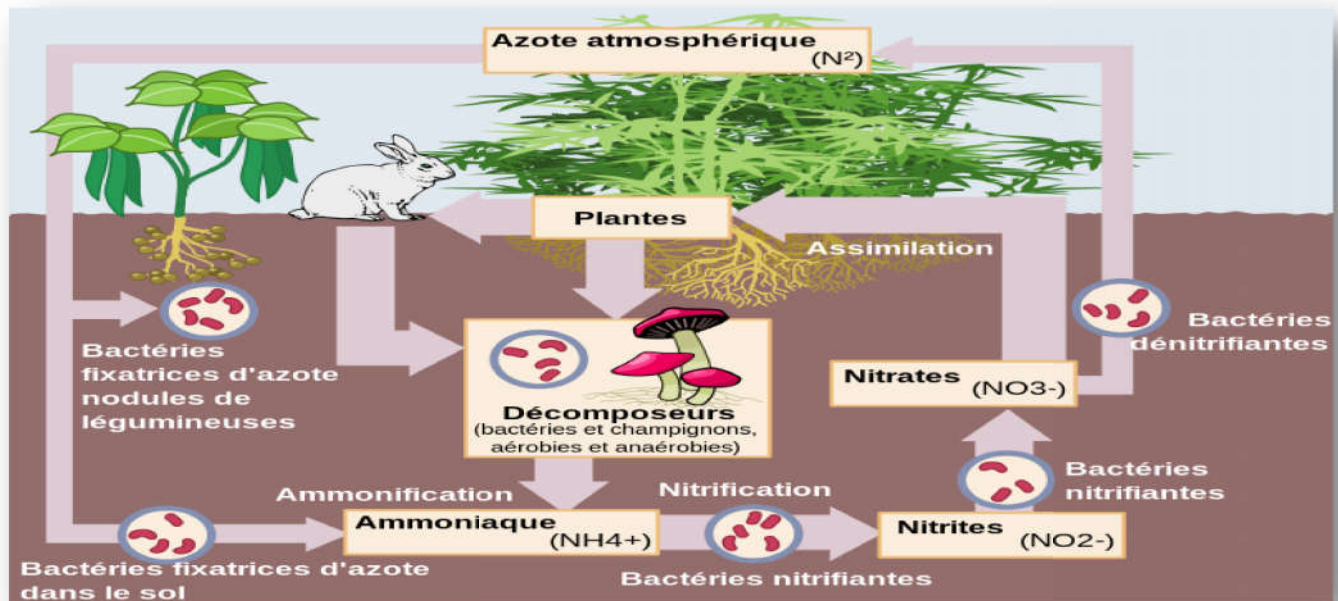


Figure 1: Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic P., 2009).

1.2. Ammonification

Un très grand nombre de bactéries et de champignons sont capable de transformer l'azote de la matière organique, aussi bien en conditions aérobies qu'en anaérobies. Lors de la décomposition de la matière organique, les protéines sont hydrolysées en acides aminés. Ces derniers perdent leurs groupements amines (NH_2) qui sont convertis en ammoniac (NH_3) au cours d'un processus de désamination (Raven. E. E., 2007).

1.3. Nitrification

C'est la production de nitrites (NO_2) et de nitrates (NO_3) par oxydation des ions ammonium (NH_4). Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des microorganismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates (Raven. E. E., 2007).

1.4. Dénitrification

Lorsque la teneur en oxygène de l'atmosphère de sol devient insuffisante pour qu'il puisse remplir son rôle d'accepteur d'électrons, les nitrates peuvent être réduits en nitrites par un nombre relativement élevés de microorganismes. Ces nitrites peuvent être par la suite convertis en ammoniac mais si le potentiel d'oxydoréduction continue à baisser, certaines bactéries réduisent les nitrites en oxyde nitreux et en azote moléculaire qui s'échappent vers l'atmosphère extérieure (Raven. E. , 2007).

1.2. Les légumineuses

1.2.1. Généralités

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les *rhizobia* appartiennent toutes à la superfamille des *fabacées*, La superfamille des *fabacées* contient environ 20 000 espèces, la plaçant en seconde position après les *Poaceae* en matière de diversité. Les *fabacées* présentent une grande diversité (SELAMI, 2015).

De nombreux taxons de la famille des légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique tel que la famille des *Bradyrhizobiaceae*. La proportion de ces taxons varie d'une sous-famille à l'autre, elle est de 90% pour les *Mimosoideae*, 20% pour les *Caesalpinoideae* et 97% pour les *Papilionoideae* (Oubraham s. , 2015).

1.2.2. Classification et taxonomie de la légumineuse

Les *fabacées* représentent une large famille chez les *angiospermes*, comprenant plus de 650 genres et 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae* en matière de diversité. Les *Fabacées* sont divisées en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinoideae* et les *Papilionoïdées* (Dekak a. , 2010).

Tableau 1: Taxonomie des légumineuses (Baba Arbi, 2016).

Règne	Plantae
Sous règne	<i>Trachéobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsidia</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	- <i>Papilionoideae</i> - <i>Mimosoideae</i> - <i>Caesalpinoideae</i>

1.2.3. La nodulation chez les légumineuses

Toutes les espèces appartenant aux Légumineuse ne sont pas nodulées. Environ 20% des *Papilionoideae* (soit 3400 espèces) ont été testées pour leur aptitude à noduler. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante :

Papilionoideae (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Caesalpinoideae* (23%) (Duhoux et al., 2004).

1.2.4. Intérêts scientifiques des légumineuses

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie.

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Baudoin, 2001).

1.3. Taxonomie et caractéristiques du genre *Genista*

La tribu des *Genisteeae* est essentiellement méditerranéenne. Elle possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées et de dominer de nombreuses communautés végétales (Chaich, 2018).

En Algérie où il en existe une vingtaine d'espèces. Il pousse dans les régions Nord et Sud et au grand Sahara (Oubraham S. , 2015). On les rencontre généralement dans les broussailles ; en forêt, ils occupent surtout les clairières et les vides. Se multipliant quand les arbres disparaissent, ils favorisent la reconstitution du boisement (Dekak A. , 2010).

Deux espèces spontanées vivaces (permanentes) jouent un rôle clé dans la fixation des dunes et la préservation de l'écosystème saharien appartenant à deux genres (*Retama* et *Genista*) de cette tribu (Chaich, 2018).

Les *Genêts* (*Genista*) sont des arbrisseaux ou sous-arbrisseaux très répandus, originaires des régions méditerranéennes, comprennent 76 espèces de petits arbustes, très florifères.

Arbuste fréquemment épineux, le plus souvent persistant, dont les tiges sont très ramifiées, couchées ou dressées, portent des feuilles étroitement lancéolées, entières ou à trois folioles, et des grappes ou petits bouquets de fleurs papilionacées jaunes qui donnent des gousses gonflées, vert pâle, puis brunes (Tourene, 2018).

Tableau 2: Taxonomie de *Genista* (Tourene, 2018).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétal
Sous règne	<i>Trachéobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Phylum (Division)	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Dicotyledones (Magnoliopsida)</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Super famille	<i>Légumineuses</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	<i>Fabiodeae</i>
Tribu	<i>Genisteeae</i>
Genre	<i>Genista</i>

1.3.1. Espèce *Genista saharae*, *Genista Microcephala* et *Argyrolobuim unifloruim*

1.3.1.1. Espèce *Genista saharae*

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des légumineuses (*fabales*), sous-famille des *papilionacées (fabacées)* et à la tribu des *génistées*. Quezel et Santa en 1963 comptent pour ce genre 16 espèces en Algérie dont 11 endémiques (BOUMAZA, 2006). *Genista* est un arbuste spontané qui joue un rôle écologique important pour la préservation et la fertilité des sols pauvres et érodés (Mahdhi, 2017). Arbuste de 1 à 2 m, longs rameaux ; feuilles unifoliées, étroites, très caduques ; fleurs jaunes espacées le long des rameaux ; gousses longues pendantes à parois parcheminées

(Chehema, 2006). Les ramules florifères sont alternes, très nombreux formant des grappes lâches préconisées dans les désordres digestifs (Chaich K., 2017). Des racines puissantes profondément liées à plus de 5 m de profondeur, peuvent être supérieures à 100 m (Mariane D., 2012).



Figure 2: Photo de *Genista saharae* Coss & Dur (Kherraze M., 2010)

1.3.1.2. Les différentes espèces nodulantes de la légumineuse *Genista saharae*

Il y a plusieurs espèces bactériennes capables de former des nodules sur les racines de la légumineuse *Genista saharae* Coss et Dur dans différentes régions, comme il est illustré dans le tableau 03 (Sayade, 2018):

Tableau 3: Les différentes espèces nodulant la légumineuse *Genista sahara*

Plate hôte	Espèces bactérienne	Région d'étude	Référence
<i>Genista saharae</i>	1- <i>Ensifer</i>(75%): <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ensifermeliloti</i> • <i>Ensifersp</i> 2- <i>Rhizobium</i> (10%): <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhizobium sp</i> 3- <i>Phyllobacterium</i>(15%): <ul style="list-style-type: none"> • <i>Phyllobacterium Leguminum</i> 	Infra-arid region of Tunisia	(Mahdhi M., 2007)
	1- <i>Sinorhizobium</i>: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ensifermeliloti</i>(81%) 2- <i>Neorhizobium</i>(17%) avec 03 espèces différent : <ul style="list-style-type: none"> • <i>Neorhizobiumgalegae</i> • <i>Neorhizobiumhuautlense</i> • <i>Neorhizobiumalkalisoli</i> 3- <i>Mesorhizobium</i>(1.75%): <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mesorhizobium camelthorni</i> 	Algerian Sahara	(Chaïch, 2016)

1.3.1.3. Espèce *Genista Microcephala*

C'est un arbrisseau éphédroïde, de 20 à 50 cm de hauteur, très rameux dès la base. Les rameaux verts sont pubescents-soyeux par des poils simples, peu feuillés. Les feuilles sont toutes unifoliolées, alternes, ou sub-opposées à la base des ramilles jeunes ; elles sont subsessiles sur un coussinet peu saillant ; les folioles sont, de 3-8 mm de long, obovales oblongues ou oblongue-linéaires, entières, atténuées à la base, densément poilues en dessous.

Les stipules sont très petites spinescentes aciculaires persistantes de 1 mm au plus (LOGRADA, 2010).



Figure 3: *Génista Microcephala* (Dekak A. , 2010).

1.3.1.4. Espèce *Argyrolobium uniflorum*

L'Argyrolobium comprend environ 91 espèces qui sont distribuées de la province du Cap à la Méditerranée et à l'ouest jusqu'aux hauts plateaux de l'Inde.

Province du Cap à la Méditerranée et à l'ouest jusqu'aux hauts plateaux de l'Inde. Le concept générique concept générique a été conçu par Eclon et Zeyher en 1836 et comprend des faciès d'autres genres *papilionoïdes*. D'autres genres *papilionoïdes*. Cela a conduit au contraire de Bentham (1865) selon lequel *Argyrolobium* est "facilement connu parmi les *Genisteeae* par le calice d'un *Dichilus*". (*Crotalarieae*) dont la corolle est proche de celle du *Crotalaria* (*Crotalarieae*) et une gousse qui n'est pas sans rappeler certains *Tephrosiae*'. La fusion complète de la gaine staminale complique encore ce mélange de caractères (Edwards).



Figure 4: *Argyrolobium uniflorum* (Spach, 1894)

Tableau 4: Classification d'*Argyrolobium uniflorum* (MARK W.C, 2009)

Règne	Plantae
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Sous-famille	Faboideae
Tribu	Genisteae
Genre	<i>Argyrolobium</i>
Espèce	<i>Argyrolobium uniflorum</i>

1.4. Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)

1.4.1. Le rhizobia

Les *Rhizobiums* sont des bactéries du sol capables d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur de ces organes (Menadi O., 2016).

Ces bactéries ont la particularité de posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase/hydrogénase qui permet cette fixation d'azote (SakrouhiI, 2017).

1.4.2. Caractères généraux

Les *rhizobiums* sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur et non sporulant. Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'Alpha-*Proteobacteria*. Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péri triches (Aouadj R., 2015).

Les *rhizobiums* vivant dans les régions arides et semi-arides, ont la capacité de résister aux différentes conditions de stress existantes dans ces régions. Afin de tolérer des hautes températures, des hautes concentrations de sel, le manque d'eau, ces *rhizobiums* ont développé des stratégies qui font d'eux des bons candidats pour être utilisés en symbiose avec les acacias ou avec d'autres plantes capables de résister à ces conditions extrêmes afin de rétablir le couvert végétal et lutter contre la désertification dans ces régions (SakrouhiI, 2017)

1.4.3. La symbiose *rhizobium*-légumineuse

La symbiose typique entre *rhizobiums* et légumineuses résulte d'un dialogue moléculaire complexe impliquant des composés dérivés de la plante et de la bactérie qui conduit au développement de structures racinaires spécialisées appelées nodules. Dans ces nouveaux organes, les bactéries convertissent l'azote atmosphérique en ammonium qui peut ensuite être absorbé par la plante qui, à son tour, fournit à la bactérie des hydrates de carbone issus de la photosynthèse et un environnement protecteur (Ahnia, 2018).

Diégane, (1995) évoque dans ces travaux relatifs au métabolisme azoté chez les légumineuses, deux types de métabolismes différents de l'azote : la voie amides (asparagine, glutamine) et la voie uréides (allantoïne). Les deux catégories de composés, les uréides d'une part et les amides d'autre part, peuvent coexister dans la sève et les organes des légumineuses mais dans des proportions qui varient avec l'espèce, le stade végétatif et la symbiose (DekakA, 2009)

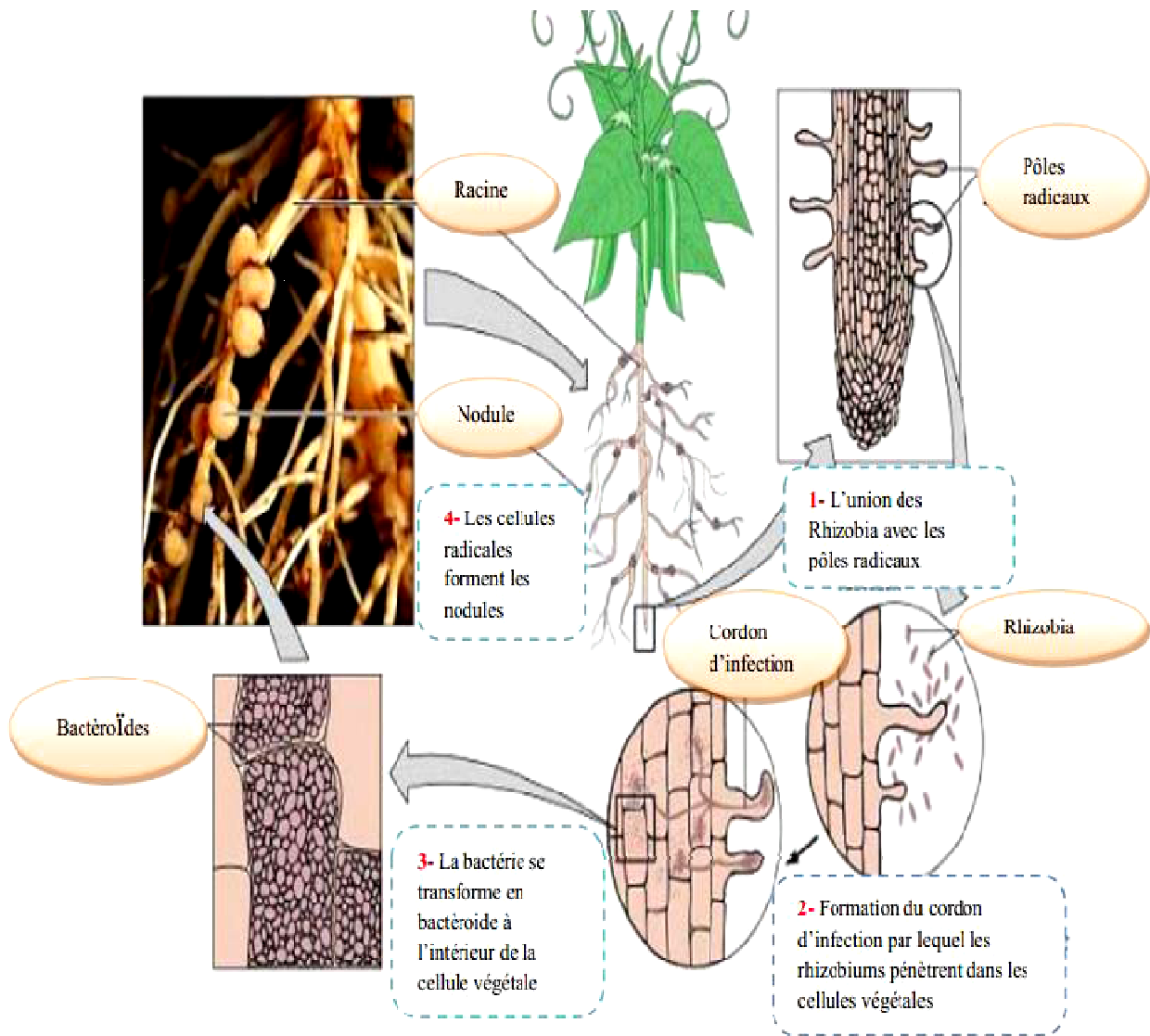


Tableau 5: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose *rhizobia*-légumineuse (AouadjR, 2015).

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 02 : Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1. Présentation de la région d'étude

Les nodules ont été obtenus à partir du genre végétal appartenant à la tribu des *Genisteeae* qui poussent spontanément dans deux régions différentes sur les conditions climatique et pédologique.

Deux espèces de plantes ont été collectées à partir de nord-est de l'Algérie au niveau de deux régions Tébessa et Batna, qui sont respectivement *Argyrolobium uniflorum* (Bir Elater, Negrine) et *Genista microcephala* (Montagne de Metlili) (A.Dekak R. ., 2018).

Et la plante *G. Saharae* a été collectée à partir de nodules racinaires naturels de sud-ouest de la Tunisie (Nafta) (M.Mahdhi, 2007).

2.2. Mode opératoire

2.2.1. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre est sèche, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la légghémoglobine et la fixation active de l'azote (Chabbi, 2010).

La collecte a été réalisée selon la méthode de (Vincent, 1970).

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm jusqu'à 50 cm de profondeur.
- Soulever lentement le bloc sol et racines.
- Enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour ne pas endommager les racines et les racines secondaires (Sites de nodulations).
- Placer délicatement toute la plante dans un sachet en plastique.
- Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante.
- Pour les nodules à stocker, les racines doivent être coupées 1 à 2 mm de site d'attachement de nodule, ce qui assure une bonne conservation des nodules et l'obtention de cultures viables et propres de bactéries lors de l'isolement.

- Sécher les nodules avec du papier filtre avant le stockage. (Vincent, 1970).

2.2.2. Conservation des nodules

Les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat, pour une longue période de stockage la dessiccation des nodules est recommandée. La dessiccation est réalisée dans des flacons contenant un déshydratant tel que le CaCl₂ anhydre et une couche de coton sur laquelle reposent les nodules (A.Dekak R. ,., 2018).

Chaque flacon doit être étiqueté par les informations suivantes :

- Nom de la plante hôte.
- Date de conservation.
- Date et lieu de prélèvement

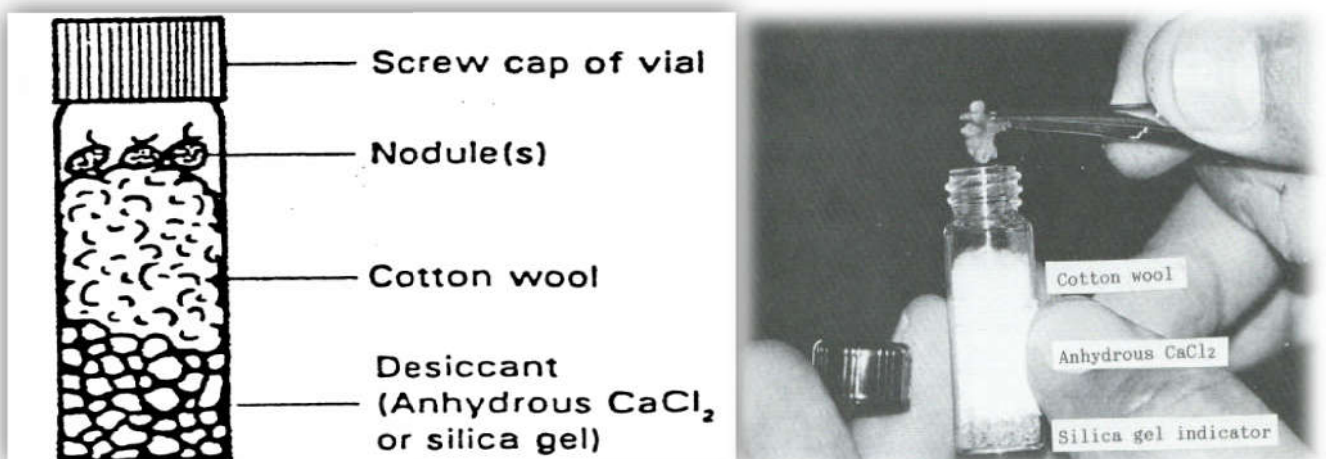


Figure 5: Conservation des nodules sous CaCl₂ (Vincent, 1970).

2.2.3. Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de (Vincent, 1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés dans l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C puis une heure à la température ambiante (A.Dekak R. ,., 2018).

2.2.3.1. Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergée dans l'éthanol 95°pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans le Chlorure de mercure acidifié

0.1% (1g HgCl₂ +5ml HCl +1L d'eau distillée) pendant 3minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10^{em} rinçage (A.Dekak R. ,, 2018).

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules (Chabbi, 2010).

2.2.3.2. Ecrasement des nodules

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile, puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules son Écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au Bec Bunsen (Chabbi, 2010) ; (A.Dekak R. ,, 2018).

2.2.3.3. Isolement des bactéries

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrons (Vincent, 1970). (Figure 6) sur gélose coulé en boîte (YMA+RC et GPA), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures (A.Dekak R. ,, 2018).

✓ Avant l'écrasement et pour confirmer la stérilité des nodules on va étaler le nodule tel quel immédiatement sur des boites.

✓ Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlé, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous une hotte à flux laminaire. (Chabbi, 2010).

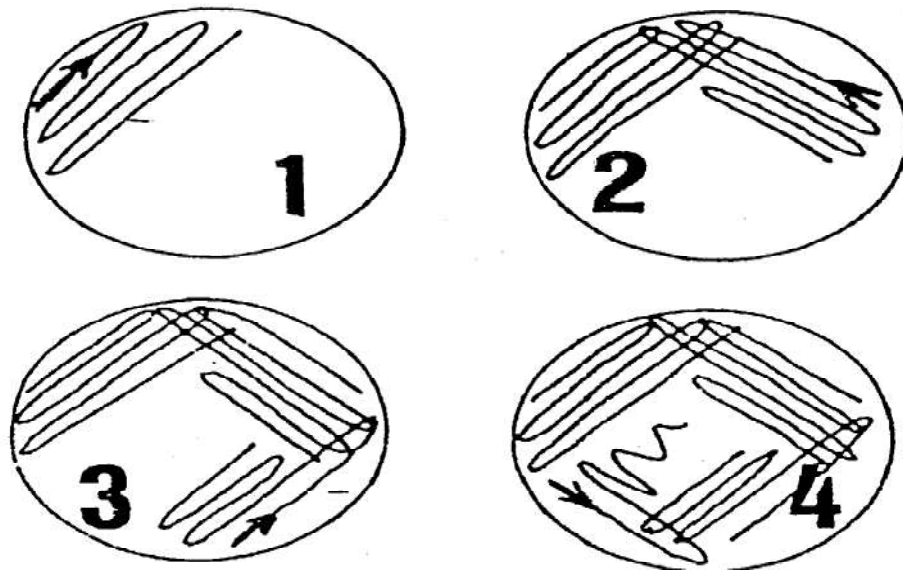


Figure 6: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

2.3. Caractères cultureux

2.3.1. Principaux milieux de culture utilisés

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants :

- Milieu liquide: YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieu solides: YMA (Yeast Manitol Agar)
- YMA + RC (Yeast Manitol Agar +Rouge Congaux)
- L'autoclavage de milieu se fait à 120°C pendant 20 minutes (A.Dekak R. ., 2018).

La morphologie des colonies des isolats a été examinée sur (YMA). Après une

Incubation de 3 à 7 jours à 28°C, les colonies individuelles ont été caractérisées en fonction de leur taille, la couleur, la forme, la mucosité, la transparence, les bords, l'élévation et la réaction à la coloration de Gram (Vincent, 1970).

Les bactéries de nodulation des légumineuses, en particulier les *rhizobiums*, présentent Deux types de croissance : bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*) et bactéries à Croissance rapide (*Rhizobium*, *Meso-Rhizobium*, *Sinorhizobium*...).

2.3.2. Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur milieu YMA (Vincent, 1970) et Somasegaran et Hoben (1994) ; des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification (Vincent, 1970).

L'ensemencement se fait sur le milieu YMA selon la technique des quatre quadrants de manière à avoir des colonies bien isolées. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures.

2.3.3. Examens microscopiques

A. Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.

Les classer en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram – (Chabbi, 2010).

B. Examen de la mobilité

Par une anse de platine contient une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incubé pendant 24h et observé (Chabbi, 2010).

2.3.4. Conservation des souches

Avant de conserver les souches elles sont ensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h dans un bain-marie avec agitation à une température de 30°C.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Dans notre travail, deux méthodes sont

Utilisées :

La première est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle.

Les souches sont incubées à 30°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C.

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

La deuxième méthode est la conservation des isolats dans des tubes Eppendorf contenant 500 µl de glycérol 60% additionnée de 500 µl de suspension bactérienne en phase exponentielle. Le mélange est homogénéisé et conservé à -20°C (Vincent, 1970).

2.4. Caractérisation symbiotique

2.4.1. Test de nodulation

Le but de ce test est d'identifier les souches et évaluer leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970); Beck *et al.* 1993). Ce test consiste en l'inoculation des graines germées du plant hôte avec les différents isolats obtenus. Il est réalisé dans des jarres de Léonard (Vincent, 1970) (Figure 7).

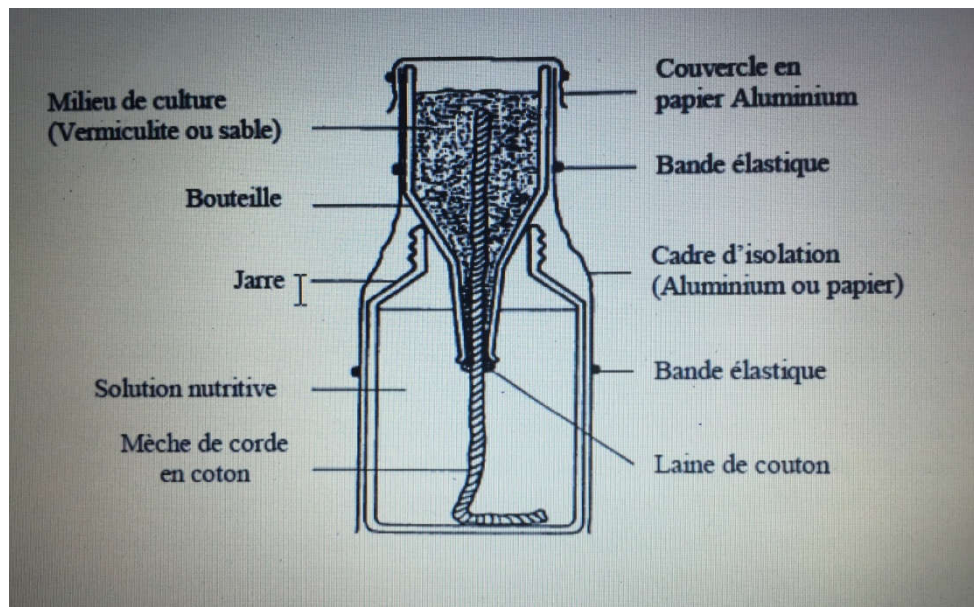


Figure 7: jarres de Léonard (Vincent, 1970)

Pour réaliser ce test nous avons utilisé la technique des jarres de Léonard (Vincent, 1970).

Cette technique est réalisée selon les étapes suivantes :

2.4.2. Préparation des jarres de Léonard

Des bouteilles d'eau minérales en plastique sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont lavées avec un détergent courant, puis désinfectées sous la hotte à flux laminaire par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis dans

L'éthanol 95°.

Les bouchons ont été percés au milieu à l'aide d'une pince. Les deux parties de la bouteille sont reliées par un cordon de compresse.

Les bouchons et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (Chabbi, 2010) et (A.Dekak R. ., 2018).

2.4.3. Préparation du mélange : Sable –Vermiculite

Un sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée. D'autre part la vermiculite est lavée au moins 10 fois puis séchée à l'air libre et enfin moulue dans un mixeur de cuisine, le sable est mélangé avec la vermiculite au 1/3, puis humidifier le mélange avec la solution nutritive de Fahraeus (**Annexe1**) ; stériliser le tout à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

La partie supérieure des jarres est remplir par le mélange alors que la partie inférieure contient la solution nutritive de Fahraeus.

Donc le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange avec la solution nutritive (A.Dekak R. ., 2018), (Chabbi, 2010) et (M.Mahdhi, 2007).

2.4.4. La récolte des graines

La récolte des graines est faite pendant le mois de juillet sur le même site de la collecte des nodules suivis d'un décorticage (Chabbi, 2010).

2.4.5. Stérilisation des graines

Avant de procéder à la stérilisation des graines, il faut tout d'abord les sélectionner, ils doivent être non endommagés, propre et de taille identique.

La stérilisation se fait selon la méthode de (Vincent, 1970) et Somasegaran et Hoben (1994) comme suite :

- Dans un flacon stérile, mettre les graines avec de l'éthanol 95% pendant 5 à 10 second.
- Transférer les graines immédiatement dans l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes.
- Rincer les graines 10 fois à l'eau distillée stérile, et après le dernier rinçage, on les laisse gonfler pendant 1 heure. (M.Mahdhi, 2007) , (A.Dekak R. ., 2018) et (Chabbi, 2010).

2.4.6. Germination des graines

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur boîtes de TYA (Beringer, 1974) à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des radicelles. (Chabbi, 2010) ; (A.Dekak R. ,, 2018) .

2.4.7. Inoculation des jarres

Après une bonne germination des graines, on sème 2 à 3 graines par jarre, les semis sont prélevés grâce à l'anse de platine immergée dans l'éthanol puis flambée et refroidie et les plantée dans le mélange sable –vermiculite.

Les jarres sont ensuite inoculés avec 2ml de la suspension bactérienne cultivée sur bouillon YMB de 24 heures à 30°C. La partie supérieure des jarres est couverte avec du plastique noir pour éviter toute exposition des racines à la lumière.

Enfin, les jarres sont placés dans une chambre de culture. L'irrigation des jarres s'effectue aseptiquement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminuée.

Après environs 8 à10 semaines, les plantes sont récoltées, les racines sont rincées afin d'observer le résultat de la nodulation. (Chabbi, 2010), (A.Dekak R. ,, 2018) et (M.Mahdhi, 2007)

2.5. Caractérisation phénotypique

2.5.1. Caractérisation physiologiques

2.5.1.1. Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures.

Tableau 5: La différence de pourcentage de température utilisée (A.Dekak R. ,, 2018) et (M.Mahdhi, 2007)

	Selon (A.Dekak R. ,, 2018)	selon (M.Mahdhi, 2007)
Températures	4 °C, 20°C, 28 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C	15°C, 28°C, 35°C, 40°C, 45°C

2.5.1.2. Effet de pH

Les souches sont cultivées sur le milieu solide YMA aux différents pH.

Tableau 6: La différence de pH utilisés (A.Dekak R. ., 2018) et (M.Mahdhi, 2007)

	selon (A.Dekak R. ., 2018)	selon (M.Mahdhi, 2007)
pH	3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10.	4, 6, 7, 9,12

2.5.1.3. Tolérance au NaCl

Pour étudier la capacité des isolats à l'osmotolérance, les souches sont cultivées sur milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl.

Tableau 7: La différence de concentrations de NaCl (A.Dekak R. ., 2018) et (M.Mahdhi, 2007)

	Selon (A.Dekak R. ., 2018)	selon (M.Mahdhi, 2007)
NaCl	0.5%(85.5mM), 1%(171mM), 2%(342mM), 3%(513mM), 5%(855mM), 10%(1710mM).	1%(171mM), 2%(342mM), 3%(513mM),4%(684Mm), 5%(855mM).

2.5.2. Caractérisation nutritionnelle

2.5.2.1. Source de Carbone

Tableau 8: La différence d'utilisation des sucres (A.Dekak R. ., 2018) et (M.Mahdhi, 2007)

	Source de Carbone
2018 Selon (A.Dekak R. ., 2018)	<p>-Les souches sont cultivées sur le milieu YMB dont l'extrait de levure a été remplacé par du NH₄Cl à 0,1% et le mannitol.</p> <p>-est remplacé par l'un des sucres suivants : Glucose, Maltose, Raffinose, Xylose, Arabinose, Fructose, Lactose, Sorbitol et Sucrose.</p> <p>- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.</p> <p>- Mesurer la DO à 600nm.</p>

Selon (M.Mahdhi, 2007)	<p>-Les souches sont cultivées sur le milieu YMA.</p> <p>-a été utilisé pour analyser la capacité des isolats à utiliser les glucides (1% w/v : glucose, galactose, fructose et sucrose) comme seule source de carbone.</p>
------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.5.2.2. Source d'azote

Tableau 9: La différence d'utilisation des acides aminés (A.Dekak R. ,, 2018)et (M.Mahdhi, 2007)

	Source d'azote
2018 Selon (A.Dekak R. ,, 2018)	<p>Les souches sont cultivées sur milieu YMB (Vincent, 1970) (annexe 01) où le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acide aminés suivants : valine, tyrosine, leucine, proline, thréonine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, glycine, sérine, histidine, arginine, méthionine, alanine, asparagine, cystéine et glutamine.</p> <p>- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.</p> <p>- Mesurer la DO à 600nm.</p>
2007 Selon (M.Mahdhi, 2007)	<p>Le milieu YMA modifié a été utilisé (L'extrait de levure est remplacée par l'un des aminoacides) pour analyser la capacité des isolats à utiliser des acides aminés (l -arginine, l-proline, l-leucine et l-tyrosine) en tant que sources uniques d'azote.</p>

2.5.3. Sensibilités et Résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des *Rhizobium*, comme un moyen d'identification (Beck & Afandi, 1993).

D'après Dekak et al. (2018) : La méthode de dilution en gélose sur TYA a été utilisée pour déterminer la résistance intrinsèque aux antibiotiques des isolats bactériens (A.Dekak R. ,, 2018).

Les antibiotiques utilisés sont : spectinomycine, érythromycine, rifampicine, gentamycine, streptomycine, Kanamycine, chloramphénicol ont été utilisés à différentes concentrations allant de 0,5 à 5000 µg/mL.

Ensuite, 10 μL des suspensions bactériennes (2×10^8 c.f.u./mL) ont été inoculés sur la surface de chaque plaque et incubées à 30°C jusqu'à 7 jours. Les isolats ont été considérés comme

Résistants lorsque la croissance est visible (A.Dekak R. ,, 2018).

Tableau 10: Les solvants des antibiotiques utilisés (Somasegaran et Hoben ,1994) (Dekak A. , 2010)

Antibiotiques	Solvants
Spectynomycine	Eau distillée
Erythromycine	Ethanol 95%
Rifampicine	Ethanol 95%
Gentamycine	Eau distillée
Streptomycine	Eau distillée
Kanamycine	Eau distillée
Chloramphénicol	Ethanol 95%

D'après Mahdhi *et al.* (2007) Les antibiotiques utilisées sont : (ampicilline, 60 et 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; streptomycine, 60 et 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; kanamycine, 60 et 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ et acide nalidixique, 20, 50 et 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). (M.Mahdhi, 2007).

Chapitre 03 : Résultats et discussions

Chapitre 3 : Résultats ET Discussions

3.1. Caractères culturels

La vitesse de croissance sur le milieu de culture YMA : les *Rhizobiums* sont classés en deux groupes distincts. Un premier groupe de souches à croissance Rapide, dont les colonies apparaissent après 48 -72 h de culture, et un second groupe des souches à croissance lente pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 7 jours de culture. (Sy, et al. 2001) Dans cette étude tous les isolats sont à croissance rapide (M.Mahdhi, 2007).

La croissance sur YMA-rouge Congo: les colonies montrent des différences dans leurs absorbances du rouge Congo on trouve celles qui ne l'absorbent pas et garde leur couleur blanchâtre, ou l'absorbent faiblement. Ceci qui corrobore avec les résultats obtenus sur les souches *Gamma-proteobacteria* (Y.Benhizia, 2004).

Les souches isolées à partir des nodules de *Genista saharae* absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA+RC et prennent une couleur rosâtre .Ceci est observé chez la majorité des *Rhizobiums* (Vincent, 1970).

Les colonies apparaissent sur milieu YMA au bout de 24 à 72 heures et se distingue par une production de poly β -hydroxybutyrate (PHB). Elles ont une couleur blanche ou crème, forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide. La vitesse de croissance des isolats est en accord avec celles démontrés par Ndiaye, 2002 en étudiant les souches de *Rhizobium* nodulant l'espèce *Acacia raddiana*. (A. Dekak, 2018).

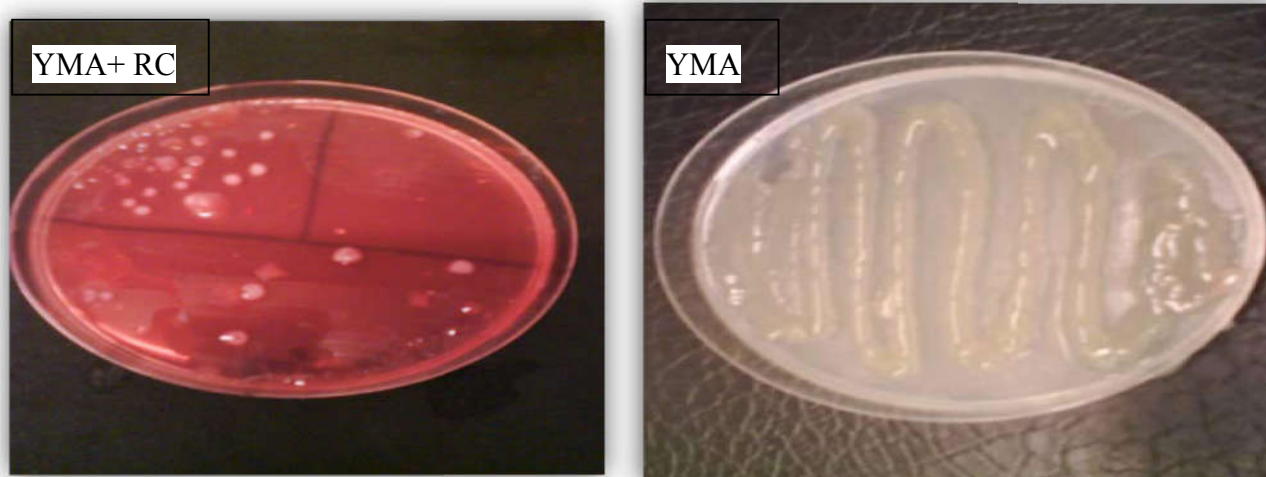


Figure 8: L'examen macroscopique des cellules bactériennes donne des bactéries de Forme de bacille Gram négatif et de différentes tailles (A.Dekak, 2010)

3.2. Etude microscopique

D'après (Somasegaran et Hoben 1994) L'observation microscopique des isolats après la coloration de Gram, montre que les colonies sont des petits bâtonnets roses qui indiquent que les isolats sont Gram négatif cela prouve que les isolats appartient au genre *Rhizobium*.

Un total de treize isolats de *rhizobium* ont été sélectionné comme BNL(les plantes) de sont des bâtonnets, Gram négatif, non sporulées et à croissance rapide (croissance visible en 2 jours) (A.Dekak R. ,, 2018)

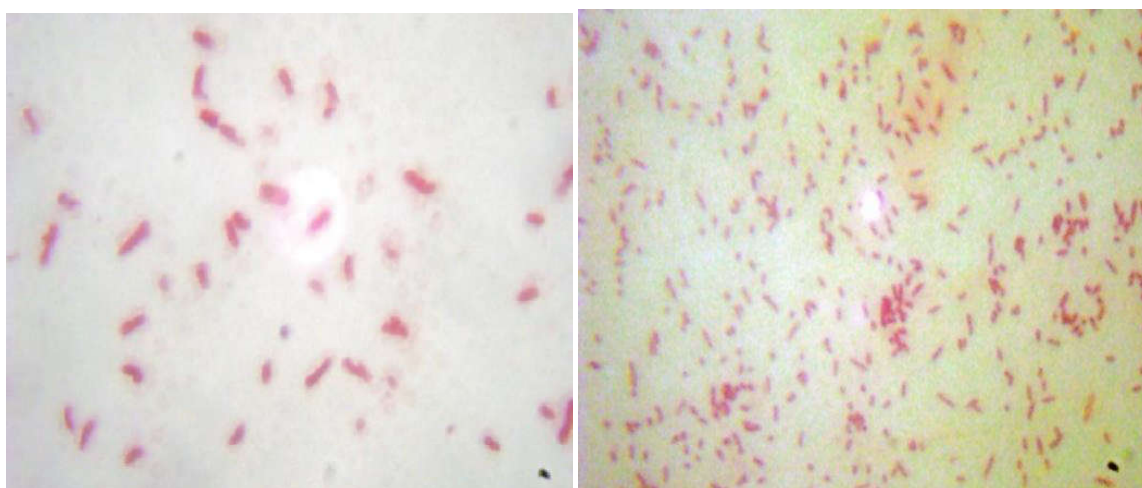


Figure 9: L'examen microscopique des cellules bactériennes donne des bactéries (A.Dekak, 2010).

3.3. Test de nodulation

3.3.1. Le résultat de Mahdhi *et al.* (2007)

Tableau 6: La nodulation de *Genista saharae* par différentes souches (M.Mahdhi, 2007)

		Teste de nodulation	
Souches	Code	Nod	Nbr de nodule
1	GN34	+	6
2	GN27	+	5
3	GN2	+	4
4	GN56	+	3

5	GN51	+	3
6	GN68	+	3
7	GN54	+	4
8	GN5	+	5
9	GN7	+	4
10	GN22	+	3
11	GN76	+	3
12	GN49	+	3
13	GN10	+	3
14	GN64	+	3
15	GN59	+	4
16	GN46	+	5
17	GN26	-	0
18	GN33	-	0
19	GN25	-	0
20	GN44	+	5
21	GN36	+	4
22	GN9	+	4
23	GN55	+	3
24	GN38	+	3
25	GN15	-	0

26	GN50	+	5
27	GN24	+	3
28	GN29	+	6

Selon les études de (M.Mahdhi, 2007), Sur les 28 isolats, seuls quatre isolats, n'ont pas réussi à noduler leur plante hôte d'origine. Les autres isolats ont formé trois à six nodules par plantule après 3 semaines (Tableau 11).

Les résultats de (M.Mahdhi, 2007) montre que les souches *Ensifer* et *Rhizobium* nodulant Tunisian *Genista spp.* Pas de souches de *Bradyrhizobium* observé. Ce résultat confirme ceux obtenus par Mahdhi et Mars (2006) avec *Retama raetam* à Tunisia. (Zakhia, 2004), mentionné qu'environ 69 isolats à partir des légumes sauvages qui pousse spontanément a la zone aride de la Tunisie, deux souches uniquement de *Bradyrhizobium* qui ait établissent une relation symbiotique efficace. Cependant, d'autre étude (G.Fernando, 1998) ; (M.Kalita, 2004) démontrait que la plante *Genista* poussé au Poland et l'Espagne est nodulé uniquement par *Bradyrhizobium spp.* Cette biodiversité de *rhizobia* nodulant *Genista* species à (Poland, l'Espagne et Tunisie) peut être liée à la condition climatique et édaphique.

Mahdhi et al. (2007), ont rapporté que les arbustes de *G. saharae* dans la région infra aride de la Tunisie est associée à plusieurs espèces *rhizobiennes* du genre *Ensifer* (75%), *Rhizobium* (10%) et *Phyllobacterium* (15%).

Enfin les résultats obtenus par (M.Mahdhi, 2007), démontrait que quelque isolats put représenter une nouvelle souche nodulant *G. saharae* nécessite une caractérisation phylogénétique (e.g. Hybridation DNA– DNA, séquençage de gène 16S rRNA) pour établir leur taxonomie.

3.3.2. Les résultats de Chaich (2017)

Tableau 7: La nodulation de *Genista saharae* inoculée par les souches représentative et la souche type de référence *E.garamanticus* (K.Chaich, 2018)

		Teste de nodulation	
Souches	Code	Nod	Nbr de nodule* (Par plante)
1	Gs111 ^E	+	4.8±1.60
2	Gs656 ^E	+	7.2±2.71
3	Gs659 ^E	+	3.6±2.04
4	Gs6514 ^N	+	8.2±2.48
5	Gs6515 ^E	+	11.8±0.75
6	Gs6516 ^E	+	10.8±2.79
7	Gs6522 ^E	+	8±1.90
8	Gs663 ^M	+	7.4±2.25
9	Gs661 ^E	+	2.2±0.75
10	Gs666 ^N	+	5±1.26
11	Gs6620 ^E	+	4.2±2.14
12	Gs675 ^N	+	6.4±0.8
13	Gs6713 ^E	+	5.8±2.79
14	Gs6716 ^E	+	4.2±0.40
15	Gs6718 ^E	+	9.2±1.60

16	Gs6719 ^E	+	2.6±0.49
17	Gs6720 ^E	+	4.6±0.49
18	Gs6722 ^E	+	4.6±0.80
E. garamanticus ORS1400T		+	7.2±1.47

* Moyenne du nombre nodules par plant.

E : Genus *Ensifer* ; N : Genus *Neorhizobium*; M: Genus *Mesorhizobium*.

Selon les études de Chaich *et al.* (2017), Des nodules ont été collectés à partir du *G.sahara* provenant de sites géographiquement éloignés dans la zone aride de l'Algérie. Trois à quatre nodules ont été obtenus par plante. Les nodules étaient associés aux racines primaires et secondaires et leur couleur rouge-brun suggérait que les isolats étaient efficaces pour la fixation du N₂. Leur forme était globulaire, parfois allongée ou multilobée avec des surfaces lisses. A partir de ces nodules de *G. saharae*, un total de 57 isolats *rhizobiens* ont été obtenus (la liste des isolats est donnée dans le tableau 12. Cinq isolats étaient muqueux, entraînant une croissance confluyente, tandis que d'autres isolats ne l'étaient pas).

3.3.3. Les résultats d'Ahnia (2019)

Selon les résultats de Ahnia (2019) L'apparition de nodules sur la plante hôte *Retama sphaerocarpa* appartient à la tribu de *Genistae* a été obtenue après deux mois d'inoculation. Leur nombre varie de 10 à 22, leur taille est de 1 à 3mm, de couleur brune et de forme allongée multilobée. Ce résultat confirme ceux obtenus par Boulila en (2009) et considéré comme témoin positif pour le test de nodulation croisé.

La figure 10 nous montre l'apparition de nodules bruns, indiquant la fixation d'azote sur les plantes suivantes : *Lupinus micranthus*, *Genista numidica*, *Retama reatam*, *Lupinus albus*.

L'apparition de nodules a été observée également sur *Vigna unguiculata* dites à large spectre

d'hôte (de Lajudie *et al.*, 1998) mais ces nodules étaient de couleur blanche. Cependant, aucun nodule n'est apparu avec les deux plantes : *Lupinus angustifolius* et *Glycine .max* (Tableau 8).

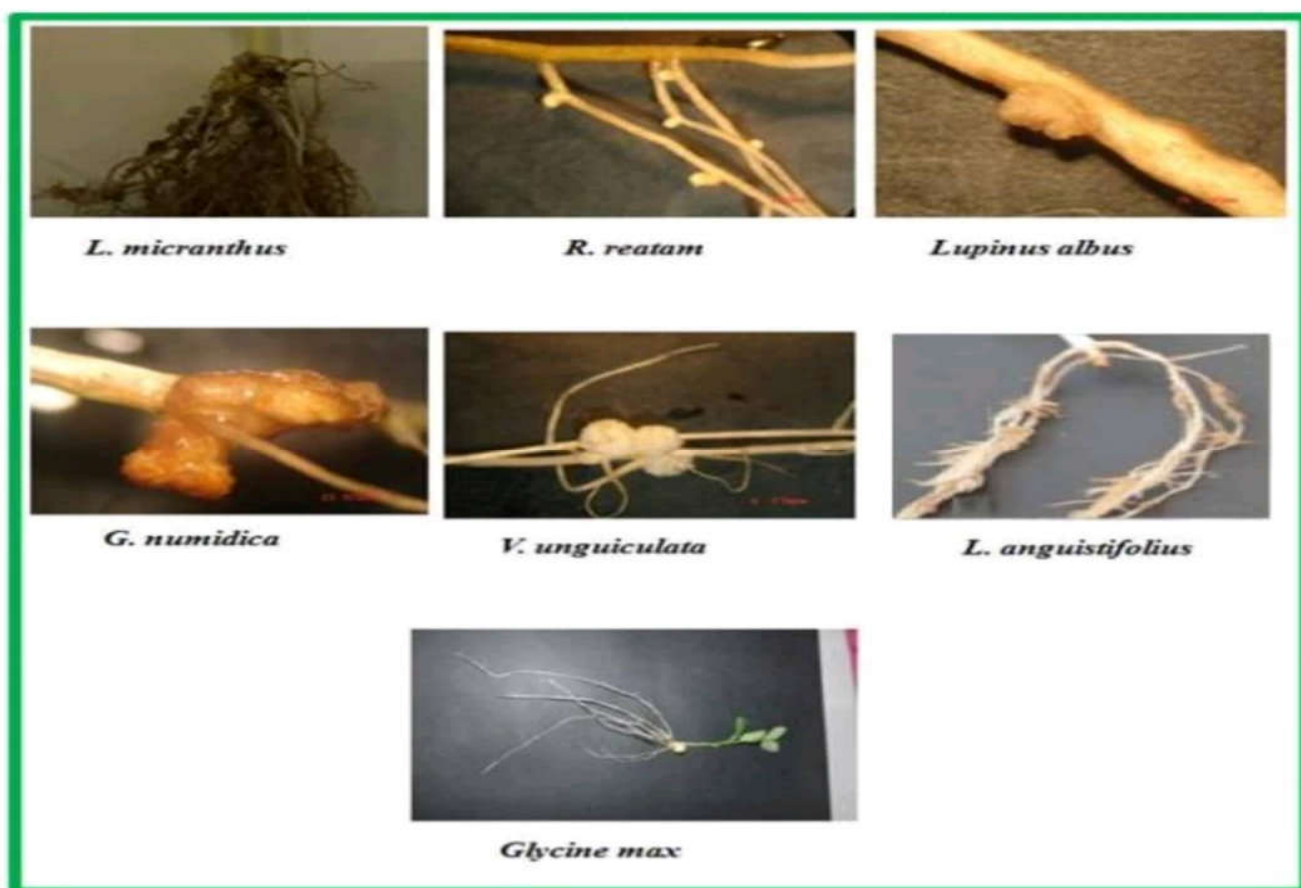


Figure 10: Teste de nodulation avec différentes plantes légumineuses (H.Ahnia, 2019)

3.3.4. Les résultats de Dekak (2010)

Tableau 8: Résultats du test de nodulation pour les deux espèces *Argyrolobium uniflorum* et *Genista microcephala*. (Dekak.A, 2010)

Plante hôte	Isolats	Nombre de nodules par pied		
		1er Pied	2ieme Pied	3ieme Pied
<i>Argyrolobium uniflorum</i>	N1	01	04	01
		03	05	02
	N2	03	03	02
		02	01	01
	YN12	03	04	01
		02	03	01

	AN11'	05	03	01	
		06	02	01	
	AN123'	01	03	02	
		03	03	02	
	B3	02	04	01	
		05	02	01	
	AB2'	02	03	02	
		02	02	01	
	<i>Genista microcephala</i>	D	03	01	02
			01	02	02
		E	01	00	00
			01	00	01
K		01	02	03	
		02	04	01	
F		01	02	01	
		01	01	01	
A		01	01	01	
		00	01	01	
M		03	03	02	
		03	03	01	

Dans l'étude de (Dekak.A, 2010) ils ont utilisés le système des jarres de Léonard pour évaluer la capacité des isolats à former des nodules sur les racines de leur plante hôte (infectivité), sous des conditions bactériologiques contrôlé en respectant des conditions d'asepsie totale lors de l'inoculation. Tant disque le pouvoir efficient des isolats est repéré par l'état de développement de la partie aérienne de chaque pied et aussi le nombre des pieds qui ont poussé dans chaque jarre.

Le pouvoir infectieux des isolats est relativement faible vu le nombre réduit des nodules obtenus (Tableau 13), ainsi que leur taille qui ne dépasse pas 1mm (Planche 08). Par ailleurs leur pouvoir effectif est prouvé par le bon développement de la partie aérienne de l'ensemble des pieds au niveau des jarres, ainsi que leur nombre et la couleur verte des feuilles.

3.4. Caractérisation phénotypique

3.4.1. Caractérisation physiologiques et nutritionnelles

3.4.1.1. Résultats de Mahdhi (2007)

A. Effet de la température

La majorité des isolats sont capables de se développer à des températures comprises entre 28 et 40C°, mais pas à 45C°. Quatre isolats (GN2, GN27, GN34 etGN50) sont capables de se développer à 15C°.

B. Effet de pH, Source de Carbone et Source d'azote

Tous les isolats ont une croissance rapide, produisent de l'acide et sont capables d'utiliser une large gamme de carbone producteurs d'acide et sont capables d'utiliser un large éventail de carbone et d'azote (tableau 14). La majorité des isolats sont capables de se développer à des pH compris entre 6,0 et12, mais aucun ne peut se développer à un pH de 4,0.

C. Tolérance au NaCl

La plupart des isolats testés tolèrent des concentrations de NaCl de 1 à3%. Un isolat (STM4031) est capable de se développer en présence de 4% de NaCl.

3.4.2. Sensibilités et Résistances aux antibiotiques

La plupart des isolats sont résistants à 100 ug/ ml) 1 d'ampicilline et à la streptomycine, mais pas à la kanamycine (100 ug/ ml) sauf sept isolats. La majorité des isolats (21 isolats) étaient résistants à 100 ug/ ml d'acide nalidixique.

Tableau 14: Isolats et souches de référence utilisés dans cette étude et leurs caractéristiques pertinentes (M.Mahdhi, 2007).

Isolats et Référence Souches	Croissance à 40 °C	Le NaCl tolérance (3%)	Résistance aux antibiotiques				l'utilisation des acides aminés				Utilisation des glucide			
			Am (100 µg ml ⁻¹)	Str (100 µg ml ⁻¹)	Ka (100 µg ml ⁻¹)	Na (100 µg ml ⁻¹)	L-leucine	L-arginine	L-tyrosine	L-proline	Glucose	Galactose	Fructose	Sacharose
GN34=STM4025	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
GN27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN56	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN51	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN68	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN54=STM4030	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN7	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN22=STM4020	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN76=STM4033	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
GN49	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN10=STM4016	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN64=STM4032	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN59	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN46	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN26=STM4022	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
GN33=STM4024	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
GN25=STM4021	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GN44=STM4028	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN36=STM4026	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN9=STM4015	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN55=STM3031	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
GN38=STM4027	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GN15=STM4018	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN50=STM4029	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
GN24	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GN29=STM4023	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B.japonicum N2P5549^T=LMG1 38^T	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
R.mongolense STM246^T=LMG1 944^T	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R.etli CFN42^T=USDA90 32	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

R.galegae HMBI540^T=LMG 6214^T	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
R. tropici IIB CIAT899^T=HAM BI1163^T	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M.loti ORS664=LMG61 25^T	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
M. mediterranem ORS2739^T=LMG 17148^T	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.melloti ORS665^T=LMG6 133^T	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Am, ampicilline ; Str, streptomycine ; Ka, kanarryvine ; Na, acide nalidixique.

3.4.1.2. Le résultat Dekak et al.,(2018) (*Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum* 2018)

A. Effet de la température

Une variabilité de la thermotolérance a été notée parmi les isolats de *rhizobia*, qui étaient capables de se développer jusqu'à 45° C. Le stress thermique et l'adaptation à la température chez les *rhizobiums* ont été largement étudiés (J.Naamala, 2016), montrant que les bactéries des nodules racinaires sont mésophiles, et peuvent se développer à des températures allant de 28°C à 37°C (Zahran, 1999).

B. Effet de pH

Toutes les bactéries testées présentaient un large spectre de tolérance au pH, car elles étaient capables de se développer dans valeurs de pH acides et alcalins allant de pH 3,5 à pH 10.

C. Source de Carbone

Les mesures de la densité optique ont indiqué de nettes différences dans l'assimilation des hydrates de carbone des isolats selon leur partenaire symbiotique.

Les isolats d'*A. uniflorum* ont montré un maximum de croissance maximale dans des milieux contenant du glucose, du maltose, de l'arabinose, du fructose et du sucrose. Inversement, les isolats de *G. microcephala* ont présenté des taux de croissance faibles en utilisant les hydrates de carbone comme seule source de carbone. Aucune ou une faible croissance a été enregistrée sur le maltose, le raffinose, l'arabinose et le saccharose. De même, les isolats à croissance rapide ont été trouvés principalement dans les bactéries des nodules racinaires associés aux légumineuses indigènes dans l'Est de l'Algérie (Y.Benhizia, Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus Hedysarum, 2004) ; (P. Struffi, 1998). Howieson et McInnes (Howieson JG, 2001) ont signalé que la plupart des légumineuses de la région méditerranéenne semblent être nodulées par des bactéries à croissance rapide (Howieson JG, 2001). Les *rhizobiums* à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (Castro S, 2000) ; (Safronova VI, 2004), tandis que les *rhizobiums* à croissance lente sont plus limités dans leur capacité à utiliser divers types de bactéries.

Par conséquent, les isolats à croissance rapide peuvent être attribués aux types de sol dans les régions de collecte respectives, ainsi qu'à la variation dans la flore indigène de légumineuses. Cependant, l'incapacité des isolats de *G. microcephala* de se développer sur le saccharose ou le lactose peut indiquer l'absence d'un système d'absorption des disaccharides (Marsudi NDS, 1999).

D. Tolérance au NaCl et fixation de nitrogène

Toutes les bactéries sélectionnées, sauf deux isolats (D et E), étaient plus tolérantes au sel de jusqu'à 5% NaCl (p/v) (Tableau15). Il a été signalé que la salinité inhibe la fixation de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodules, ce qui entraîne une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Igual L, 2001), (Zahran, 1999). De même, la tolérance à la salinité jusqu'à 800 mM NaCl a été notée parmi les *rhizobia* isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* collectés dans la Sebkhha de Misserghine (Nord-Ouest de l'Algérie) (Merabet C, 2006).

Tableau 9: Caractéristiques phénotypiques des isolats de *rhizobia*. +, croissance ou réaction positive ; -, aucune croissance ou réaction négative (A.Dekak R. ,, 2018).

Caractéristiques	<i>A. uniforum</i>							<i>G. microcephala</i>							Souches de référence			
	AB2'	B3	AN11'	AN123'	N2	N1	YN12	D	E	K	F	A	M	A6	HS1	HnA	Hca1	HP7
Température	-4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	28 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
pH	3.5 -10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Source de carbone	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Raffinose	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
	Lactose	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Sorbitol	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

	Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
NaCl%	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
source de carbone	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Raffinose	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
	Lactose	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Sorbitole	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
-Acides aminés	Valine	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tyrosine		+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+		+	+	+	+	+
	Leucine	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Proline		+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+

			+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Threonine																		
Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Glycine	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Serine	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Arginine	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methionine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Alanine	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Asparagine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Cysteine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Glutamine	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

3.4.3. Sensibilités et Résistances aux antibiotiques

L'utilisation de *rhizobiums* efficaces et de haute qualité en agriculture a contribué de manière substantielle à l'économie des systèmes agricoles par la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère. L'économie des systèmes agricoles grâce à la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère. Cependant, la rhizosphère comprend d'importantes populations de micro-organismes producteurs d'antibiotiques, qui affectent les rhizobiums sensibles (Lira

MD, 2005). Ainsi, la résistance aux antibiotiques est un marqueur de sélection positif et extrêmement précieux pour sélectionner les *rhizobiums* symbiotiques. Marqueur de sélection positif extrêmement précieux pour sélectionner les bactéries symbiotiques efficaces. Les profils de sensibilité aux antibiotiques des isolats sélectionnés sont présentés dans le tableau 16. Les résultats montrent que tous les isolats étaient résistants à la spectinomycine, l'érythromycine et la gentamicine.

Cependant, ils étaient plus sensibles à la kanamycine, au chloramphénicol, à la streptomycine et à la rifampicine. Plusieurs chercheurs ont rapporté des interactions antibiotiques/*rhizobia* il a été noté que les bactéries à croissance rapide sont les plus sensibles aux antibiotiques que les *rhizobia* à croissance lente (Maatallah J, 2002) ; (Margesin R, 2011).

Tableau 10: Sensibilité aux antibiotiques des isolats de *rhizobia*. (Spect : spectinomycine ; Gent : gentamicine ; 1 Kan : kanamycine ; Kan : kanamycine;2 CHL : chloramphénicol ; Strep : streptomycine ; Rif : rifampicine ; Ery : érythromycine) (A.Dekak R. ,, 2018).

Origine	Souches	MIC (µg/ml)						
		Spec	Gent	Kan	CHL	Strep	Rif	Ery
Référence souches	Hs1	>5000	300	20	100	500	200	>5000
	Hp7	>5000	300	300	100	600	50	>5000
	Hca1	>5000	400	20	100	400	100	>5000
	A6	>5000	1250	600	500	1250	200	>5000
	HnA	>5000	100	20	300	400	50	>5000
Uniflorum Argyrobium	N1	>5000	800	300	400	600	150	>5000
	N2	>5000	800	300	400	600	50	>5000
	YN12	>5000	1000	300	400	600	150	>5000
	AN123'	>5000	1000	600	400	600	150	>5000
	AN11'	>5000	1200	600	400	600	50	>5000

	AB2'	>5000	1250	300	400	600	150	>5000
	B3	>5000	800	600	400	1000	50	>5000
Genista microcephala	D	>5000	1250	600	400	600	200	>5000
	E	>5000	800	600	400	1000	200	>5000
	K	>5000	700	300	400	600	200	>5000
	F	>5000	300	300	300	600	150	>5000
	A	>5000	1200	600	400	600	150	>5000
	M	>5000	800	600	400	600	150	>5000

Conclusion

Conclusion

En général, les études phénotypiques ont montré une grande diversité physiologique et biochimique des isolats sélectionnés, présentant les caractéristiques de base des *rhizobiums* et des niveaux élevés de similarité avec les *Gamma-proteobacteria* (Dekak et al., 2018). En outre, les isolats ont montré une tolérance variable à différents facteurs de stress (température, PH, salinité et antibiotiques), ce qui a permis de sélectionner des isolats pour des recherches futures. En effet, Ce sont des bactéries polyvalentes avec des caractéristiques très intéressantes, ce qui offre à ces légumineuses des avantages écologiques importants et qui peuvent améliorer les caractéristiques symbiotiques pour d'autres. Une caractérisation moléculaire plus poussée des isolats bactériens de *G.microcephala* ; *G.saharae* et d'*A.uniflorum* à l'aide de méthodes conventionnelles devrait être effectuée pour un examen plus approfondi de la diversité.

Un total de 28 souches bactériennes isolées des nodules racinaires de *G. saharae* cultivé dans le sol tunisien ont été caractérisées en utilisant des caractéristiques phénotypiques et symbiotiques. Il a été constaté que les nouveaux isolats sont divers et affiliés à *Ensifer* (75%), *Rhizobium* (10%) et *Phyllobacterium* (15%) Dans les études effectuées par (Mahdhi, et al. 2007), *Genista saharae* a formé des nodules avec divers *rhizobia* dans les sols tunisiens. De plus, leurs résultats soutiennent à présence de souches commensales non-nodulantes (*Phyllobacterium*) dans les nodules de légumineuses.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

1. **A. Dekak, R. C. (2018, juin 1).** Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala*.
2. **A.Dekak. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Tébessa.
3. **A.Dekak. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. In *Mémoire de Magister, Biotechnologie végétale* (pp. 14-90). Université de Tébessa.
4. **A.Dekak, R. ., (2018, June 1).** Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista*. pp. 4-18.
5. **A.Dekak, R. ., (2018, juin 1).** Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala*. p. 18.
6. **Ahnia, H. (2018).** Etude polyphasique et génomique des bactéries isolées de nodules racinaires de *Retama* sp. In *Thèse*. Université de Béjaia.
7. **Aouadj R., S. S. (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum* Desf poussant dans la région de Djebel Boutaleb (Setif). In *Mémoire de Master, Ecologie Microbienne* (pp. 6,16). Université des Frères Mentouri Constantine.
8. **AouadjR, S. (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans la région de Djebel Boutaleb (Setif). In *Mémoire Master Ecologie Microbienne* (p. 15). Université des Frères Mentouri Constantine.
9. **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). In *Thèse de Doctorat* (pp. p. 13, 33). Université Badji Mokhtar Annaba: Microbiologie Appliquée.
10. **Baudoin, J. (2001).** Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

11. **Beck, D. P., & Afandi, F. (1993).** *Practical Rhizobium-legume technology manual*. Technical Manual - International Center for Agricultural Research in the Dry Areas 1993.
12. **Benjamine, P. (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical casuarina glaucat. France: Thèse doctorat de l'université Mont pellier 1.
13. **BOUMAZA, O. (2006).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae). In t. d. doctorat.
14. **C.merabet, A. N. (2006).** Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria.
15. **chabbi, R. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. Constantine.
16. **Chabbi, R. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. Constantine.
17. **Chaich K., B. A.-M. (2017).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis* (2017) 71. ISSN 0334-5114.
18. **Chaich, K. (2018).** Diversité des associations *Rhizobium*-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional. In *Thèse de Doctorat, Sciences Agronomiques* (pp. 114-17, 70). Université Kasdi Merbah Ouargla.
19. **Chaïch, K. e. (2016).** «Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara.». In *Springer Science+Business Media Dordrecht* (p. 10).
20. **Chehma, A. (2006).** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. In L. d. semi-aride». Université Kasdi Merbah Ouargla.
21. **Dakora2, J. N. (2016).** Antibiotics Resistance in *Rhizobium*: Type, Process, Mechanism. new york.
22. **Dekak, a. (2010).** «Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*.» mémoire de magister. Biotechnologie végétale.

- 23. Dekak, A. (2009).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. In *diplôme de Magister* (p. 16). Université de Tébessa.
- 24. Dekak, A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. p. 51.
- 25. Dekak.A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Tébessa.
- 26. DekakA. (2009).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. In *Diplôme de Magister* (p. 16). Université de Tébessa.
- 27. Edwards, T. J. A REVISION OF ARGYROLOBIUM (CROTALARIEAE, FABACEAE) IN SOUTH AFRICA.**
- 28. G.Fernando, M. (1998, aug 14).** Biodiversity of rhizobia nodulating *Genista monspessulana* and *Genista linifolia* in Spain. pp. 585-594.
- 29. GuignardJ.L. (2000).** *Biochimie Végétale 2ème Edition*. Paris: Edition Dunod.
- 30. H.Ahnia. (2019).** Etude polyphasique et génomique des bactéries isolées. Bejaia.
- 31. Hopkins, W. (2003).** Physiologie Végétale Université des Sciences et Technologie de Lille. In W. Hopkins, *Physiologie Végétale Université des Sciences et Technologie de Lille* (pp. 99-119).
- 32. Igual L, V. A.-B. (2001, September 5).** Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different. pp. 35-39.
- 33. J.Naamala, S. J. (2016, January 7).** Antibiotics resistance in *Rhizobium*: type,.
- 34. K.Chaich. (2018).** Diversité des associations *Rhizobium*-Légumineuses de Ouargla.
- 35. Kherraze M., L. K. (2010).** Atlas floristique de la vallée de l'oued Righ par écosystème.
- 36. Lira MD, L. A. (2005, February).** Effect of root temperature on nodule. pp. 235–239.

37. **LOGRADA, T. (2010).** Etude Caryologique et Phytochimique de Six Espèces Endémiques du genre *Genista* L. en Algérie. In *Thèse de doctorat* (p. 24).
38. **M.Kalita, W. (2004, December 15).** Phenotypic and Genomic Characteristics of Rhizobia Isolated From *Genista tinctoria* Root Nodules. pp. 707-715.
39. **M.Mahdhi, A. N. (2007, july 13).** Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae*. pp. 604-608.
40. **Mahdhi M., G. F. (2007).** Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia. *Letters in Applied Microbiology ISSN* , 266,8254.
41. **Mahdhi, M. e. (2017).** Diversité phénotypique et génotypique de *Genista saharae* microsymbiontes de la région infra-aride de Tunisie.
42. **Mariane D., K. M. (2012).** Ecology, Biology and Biometry of an Endemic Fabaceae:*Genista saharae* Cosson and Durieu. *Journal of Life Sciences* 6 , 501,504.
43. **MARK W.C, J. L. (2009, 10 19).** A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III . p. 123.
44. **Menadi O., B. A. (2016).** Analyse du micro-symbiote isolé à partir des racines de la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. In *Mémoire de Master, Ecologie Microbienne* (p. 7). Université de Constantine.
45. **Merabet C, B. A. (2006, September 2).** Distribution of *Medicago* species and their. pp. 1-13.
46. **Oubraham, s. (2015).** Caractérisation phénotypique et étude de l'effet des antibiotiques et des antibiotiques et des métaux lourds sur la croissance des bactéries nodulant *Genista numidica*. In *Mémoire de Master, Environnement et Santé Publique* (p. p. 3). Université de Béjaia.
47. **Oubraham, S. (2015).** Caractérisation phénotypique et étude de l'effet des antibiotiques et des métaux lourds sur la croissance des bactéries nodulant *Genista numidica*. In *Mémoire de Master, Environnement et Santé Publique* (p. 3). Université de Béjaia.
48. **Perte, B. (2007).** Transport de l'auscine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical casuarinag lauca. France: Thèse de l'université Montpellier 2.

49. **Pujic P., N. P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes. Biofature 298.
50. **Raven. al, M. e. (2007).** Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae*. tunisia.
51. **Raven., E. (2007).** *Biologie Végétale*. Paris France: 2eme Edition.
52. **Raven., E. E. (2007).** Biologie végétale. Paris - France: 2ieme édition. Edition de boeck.
53. **SakrouhiI. (2017).** Caractérisation Physiologique et Taxonomique du rhizobium Nodulant *Acacia* Isolés des Dunes de Merzouga et Etude Transcriptomique d'une Souche Modèle de la Collection. In *Thèse de Doctorat, Microbiologie et Biologie Moléculaire* (pp. 15-16). Université Mohamed V Rabat.
54. **Sayade, S. (2018).** Caractérisation symbiotique des bactéries nodulant la légumineuse du *Genista saharae* Goss et Dur (Cas d'étude : la région de Bouchagron, wilaya de Biskra). In *Mémoire Master , Microbiologie Fondamentale et Appliquée* (p. 15). Université Mohamed Khider de Biskra.
55. **SELAMI, n. (2015).** «Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* : Approches. In Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale,Caractérisation Moléculaire des Isolats.»Biotechnologie Végétale (p. 150).
56. **Spach, J. (1894).** *Genista uniflora* (Decne.) Briq.
57. **Tortora G.J., F. B. (2003).** Introduction à la micrpbologie .Edition de Renouveau Pédarogique Inc. 826-830.
58. **Tourene, M. (2018).** Identification de bactéries associées au genre *Genista*. In *Mémoire de Master, Ecologie Microbienne* (pp. 9,11). Université A. MIRA – Bejaia.
59. **Tourte Y., B. M. (2005).** Le monde des végétaux organistio, physiologie et génomique.Edition DUNOD. Paris: France.
60. **Vincent, J. M. (1970).** *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. IBP Handbk 15 Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.
61. **Waligora Cecile., T. T. (2008).** Legumineuses il est urgent de les réhabiliter. Juin/Juillet/Août: Edition Techniques culturelles simplifiées. N° 48.

- 62. Y.Benhizia, H. ., (2004).** Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus Hedysarum. science Direct.
- 63. ZAHNAN, H. H. (1999).** *Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under*. American Society for Microbiology.
- 64. Zahn, H. (1999).** Rhizobium Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever. Microbiol Mol BiolRev.
- 65. Zakhia, F. H.-M. (2004).** Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. pp. 380–395.

Annexes

Annexes

Les milieux de culture Milieu :

✓ Yeast Mannitol Broth (YMB) (Somasegaran et Hoben 1994)

Mannitol	10.0g
K₂HPO₄	4 0.5g
MgSO₄ 7H₂O	0.2g
NaCl	0.1g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20 minutes

✓ Milieu: Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent 1970)

YMB	1000ml
Agar	15 g
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

✓ **Milieu: YMA+rouge Congo (Vincent 1970)**

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	15g
PH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20minutes

Après ajustement du pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

✓ **Milieu de conservation : (YMA+ CaCO₃) (Vincent 1970)**

YMA	1.0 l
CaCO₃	3g/l

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

✓ **Solution nutritive en g/l (Fâhraeus, 1957)**

CaCl₂	0.10
MgSO₄7H₂O	0.12
KH₂PO₄	0.10
Na₂HPO₄ 2H₂O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro éléments	1ml

الملخص

نظرا لما شهدته بداية سنة 2022 من انتشار لفيروس كورونا (كوفيد-19)، لم يخلونا من إجراء العمل التطبيقي على أرض الواقع، فلجأنا إلى دراسات علمية سابقة لدكاترة مختصين في المجال وقد ركزنا على دراسة مهدي مصباح 2007 الذي تناول موضوع خاص بالـ *Genista Saharae* في منطقة نافته بتونس مع دراسة دكاك أحمد 2018 الذي تناول موضوع خاص بالـ *Genista microcephala* و *Argyrobium uniflorum* في منطقة شرق الجزائر. كان هدفنا هو التركيز على هذه الأخيرة في دراسة الخصائص الظاهرية وخصائص التعايش البيئية لهذه العزلات البكتيرية (BNL).

الكلمات المفتاحية: *Genista Saharae*, *Genista microcephala*, *Argyrobium uniflorum*, BNL.

Résumé

En raison de l'épidémie du virus Corona (Covid-19) dont le début de l'année 2022 a été témoin, qui ne nous a pas permis d'effectuer des travaux pratiques sur le terrain, nous avons eu recours à des études scientifiques préalables par des chercheurs spécialisés dans le domaine. Avec l'étude de Dakkak 2018, qui traitait d'un sujet sur *G. microcephala* et *A. uniflorum* dans la région orientale de l'Algérie et l'étude de Mahdhi 2007 sur *G. saharae*. Notre objectif était de nous concentrer sur ces derniers en étudiant les caractères phénotypiques et symbiotiques de ces isolats bactériens (BNL). Un total de 28 souches bactériennes isolées des nodules racinaires de *G. saharae* cultivé dans le sol tunisien. Il a été constaté que les nouveaux isolats sont divers et affiliés à *Ensifer* (75%), *Rhizobium* (10%) et *Phyllobacterium* (15%) Dans les études effectuées par (Mahdhi, et al. 2007), *Genista saharae* a formé des nodules avec divers *rhizobia* dans les sols tunisiens.

Mots clés : *Genista saharae*, *Genista microcephala*, *Argyrobium uniflorum*, BNL.

Abstract

Due to the outbreak of Corona virus (Covid-19) witnessed in early 2022, which did not allow us to conduct practical fieldwork, we resorted to prior scientific studies by researchers specializing in the field. With the study of Dakak 2018, which dealt with a subject on *G. microcephala* and *A. uniflorum* in the eastern region of Algeria and the study of Mahdhi 2007 on *G. saharae*. Our objective was to focus on the latter by studying the phenotypic and symbiotic characters of these bacterial isolates (BNL). A total of 28 bacterial strains isolated from root nodules of *G. saharae* grown in Tunisian soil. It was found that the new isolates are diverse and affiliated with *Ensifer* (75%), *Rhizobium* (10%) and *Phyllobacterium* (15%). In studies carried out by (Mahdhi, et al. 2007), *Genista saharae* formed nodules with various *rhizobia* in Tunisian soil.

Key words: *Genista saharae*, *Genista microcephala*, *Argyrobium uniflorum*, BNL.