



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

Référence / 2023

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Djermoune Warda

Le: dimanche 25 juin 2023

Caractérisation physiologique de bactérie fixatrice de l'azote

Jury :

| | | | | |
|-----|------------------------|-----|-------------------------|------------|
| Mme | NEFOUCI Fatima | MAA | Mohamed Khider - Biskra | Président |
| Mme | DJOUAMAA Manel | MAA | Mohamed Khider - Biskra | Rapporteur |
| Mme | REDOUANE-SALAH Sara | MCB | Mohamed Khider - Biskra | Examineur |

Année universitaire :2022_2023



Remerciements



Nous avons des tenons à remercier tout

D'abord Dieu Allah le tout puissant de nous avoir

Donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail.

*Epremier lieu, j'adresse mes sincères remerciements à **Mm Djouamaa Manel**,
mon promoteur, enseignant à l'université de Biskra, pour m'avoir si bien
encadré, si généreusement, si efficacement conseillé et pour sa permanente
disponibilité.*

*Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont l'amabilité de bien
vouloir évaluer ce modeste travail.*

*Je tiens également à remercier mon laboratoire d'accueil **CRSTRA** et toutes
les personnes qui m'ont soutenue moralement et expérimentalement durant ces
années.*

*Je remercie le superviseur du laboratoire de microbiologie **CRSTRA** : **Mm**
Suaad et Hanna.*

*Mes remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux personnes qui m'ont
épaulé et aidé dans la réalisation de mon travail au laboratoire et en dehors
du laboratoire, je vous porte une éternelle reconnaissance.*



Dédicace



*Je dédie ce modeste travail
à mes très chers parents, prunelles de mes yeux,
j'espère leur inspirer joie et fierté.*

♥ *A mon très cher petit frère Idris, que Dieu me le garde*

♥ *A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, A la source de la tendresse,
à ma mère (Tabitourt Houria).*

♥ *A la personne qu'il me pousse vers l'avant et qu'il me donne l'espoir à vous mon
père (Djermoune Laiche).*

♥ *Ames sœurs : ma chère sœur Radia, Randa et Amira.*

♥ *A mon cher frère : Ziad.*

♥ *Chaque membre de la famille : Djermoune.*

♥ *Tous de vieux amis fidèles à travers mes stations d'âge.*

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



Table des matières

| | |
|------------------------------|-----|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Table des matières | |
| Liste des tableaux | I |
| Liste des figures | II |
| Liste des Abréviations | III |
| Introduction | 1 |

Première partie :Partie bibliographique

Chapitre 01 :Synthèse bibliographique

| | |
|---|---|
| 1. I. Cycle de l'azote | 3 |
| 1. I.1-La fixation de l'azote moléculaire N ₂ | 3 |
| 1. I.2-La nitrification | 3 |
| 1. I.3- La dénitrification | 4 |
| 1. II. Macrosymbionte : partenaire végétal (Légumineuse)..... | 4 |
| 1. II.1-Généralité | 4 |
| 1. II.2-Classification et intérêt | 5 |
| 1.II.3-La <i>tribu</i> des <i>Genistées</i> | 6 |
| 1. II.3-1-genre <i>Genista</i> | 6 |
| 1.II.4-Le niébé <i>Vigna unguiculata</i> | 7 |
| 1.II.4-1-Généralité ,groupes, et intérêt | 7 |
| 1.II.4-2-Systématique | 8 |
| 1.III.Microsymbionte : partenaire bactérien(<i>rhizobium</i>) | 8 |
| 1.III.1-Généralités sur les <i>rhizobia</i> | 8 |
| 1.III.2-Caractères généraux des <i>rhizobia</i> | 9 |
| 1.IV.1-La symbiose fixatrice d'azote <i>rhizobium</i> -légumineuse..... | 9 |

| | |
|---|----|
| 1.IV.2-Les différentes étapes de la formation du nodosité | 9 |
| 1.V.L'effet de métaux lourds sur <i>rhizobia</i> | 10 |
| 1. V.1-Définition des métaux lourds..... | 10 |
| 1.V.2-Effet toxique des métaux lourds sur les microorganismes et le mécanisme d'adaptation..... | 10 |
| 1.V.3-Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/ <i>rhizobia</i> | 11 |

Deuxième partie :Partie expérimentale

Chapitre2 : Matériels et Méthodes

| | |
|---|----|
| 2.1. Description des sites d'échantillonnage | 13 |
| 2.2. Mode opératoire..... | 13 |
| 2.2. 1-Caractérisation physiologique des isolats..... | 13 |
| 2.2.1.1-Étude de la tolérance des souches aux métaux lourds | 13 |
| 2.2.1.2-Résistance aux antibiotiques | 14 |
| 2.2.1.3-Test de nodulation..... | 15 |
| 2.2.1.3.1-Préparation des jarres | 16 |
| 2.2.1.3.2-Préparation du sable | 16 |
| 2.2.1.3.3-Sélection des graines..... | 17 |
| 2.2.1.3.4-Stérilisation des graines | 18 |
| 2.2.1.3.5-Germination des graines | 18 |
| 2.2.1.3.6-Inoculation des jarres | 18 |

Chapitre 3 : Résultats et discussions

| | |
|--|----|
| 3.1. Caractères culturaux | 20 |
| 3.1.1-Examen macroscopique..... | 20 |
| 3.1.2-Examen microscopique..... | 20 |
| 3.2. Caractérisation phénotypique des isolats..... | 21 |
| 3.2.1-La tolérance des souches aux métaux lourds..... | 21 |
| 3.2.2-La résistance des souches aux antibiotiques..... | 25 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3.2.3–Test de nodulation..... | 28 |
| Conclusion..... | 31 |
| Références bibliographiques | 32 |
| Annexes..... | |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Taxonomie des légumineuses. | 6 |
| Tableau 2: Taxonomie de <i>Genista</i> | 7 |
| Tableau 3 : <i>V. unguiculata</i> appartient à la systématique suivante | 8 |
| Tableau 4. Les concentrations des métaux lourds utilisées..... | 14 |
| Tableau 5. Caractère de l'antibiotique utilisable selon les recommandations du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie française 2013. | 14 |
| Tableau 6. En raison de l'effet des métaux lourds (Hg) et (Zn) sur la croissance des souches bactériennes étudiées..... | 22 |
| Tableau 7. En raison de l'effet des métaux lourds (Pb) et (Cu) sur la croissance des souches bactériennes étudiées..... | 23 |
| Tableau 8. Valeurs approximatives de la CMI..... | 25 |
| Tableau 9. Résultat de test antibiogramme. | 26 |
| Tableau 10. Résultat de test de nodulation pour les quatre souches étudiées. | 29 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres | 4 |
| Figure 2. Représentation schématique de la mise en place de la nodosité | 10 |
| Figure 3. La méthode utilisée pour la culture d'antibiotique sur YMA. | 15 |
| Figure 4. Les bouteilles d'eau minérales et les bouchons stérilisée. | 16 |
| Figure 5. -A-jarres de Léonard, -B-Jarres utilisé dans notre étude (Originale)..... | 17 |
| Figure 6. Présentation des graines (GS: <i>Genista saharae</i> et VU: <i>Vigna unguiculata</i>) | 18 |
| Figure 7. Germination des graines sur milieu GN(Originale)..... | 18 |
| Figure 8. Jarres placées dans la serre en plastique agriculture (Originale). | 19 |
| Figure 9. Croissance des souches sur YMA. | 20 |
| Figure 10. Aspect microscopique de la souche après coloration de Gram (Grossissement X100)..... | 21 |
| Figure 11. Quelque résultat de la souche testée par métaux lourds sur YMA | 22 |
| Figure 12. Lecture de la zone inhibitrice avec règle électronique..... | 25 |
| Figure 13. Effet des antibiotiques sur la croissance des souches (le pourcentage de sensibilité en fonction de la concentration desc ATB). | 28 |
| Figure 14. Aspect des plantes inoculées..... | 30 |
| Figure 15. Aspect de la partie racinaire d'une plante inoculée. | 30 |

Liste des Abréviations

| | |
|---|---|
| AMP | Ampicilline. |
| BNL | Bactérie nodulant la légumineuse. |
| CASFAM | Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie française. |
| CuSO₄ | Sulfate de cuivre. |
| GMN | Gentamicine. |
| H₂SO₄ | Acide sulfurique. |
| Ha /an | Hectares par ans. |
| HgCl₂ | Chlorure de mercure. |
| K | Kanamycine. |
| Kg | Kilogramme. |
| ml | millilitre. |
| mm | millimètre. |
| Pb (OOCCH₃)₂ | Acétate de plomb. |
| TE | Tétracycline. |
| YMA | Yeast Mannitol Agar. |
| YMB | Yeast Mannitol Broth. |
| ZnSO₄ | Sulfate de zinc. |
| μL | microlitre. |

Introduction

Introduction

Depuis des siècles, les légumineuses sont utilisées dans la rotation des cultures pour intégrer l'azote dans le système agricole et éviter le recours aux engrais azotés (Geddes *et al.*, 2015). Cela est dû à l'action symbiotique d'une bactérie mésotrophe du sol appelée *rhizobium*, ce processus biologique peut satisfaire tout ou partie des besoins en azotes des légumineuses, en fonction des espèces et des conditions environnementales, et peut fournir au sol jusqu'à plusieurs centaines de kg d'azote par Ha/an (Calvet, 2003), ce cela équivaut à environ 40 millions de tonnes d'azotes dans les systèmes agricoles de manière naturelle et durable, et les coûts énergétiques de la fixation biologique de l'azote sont inférieurs à ceux d'une production équivalente d'engrais synthétique (Azib, 2020).

Le bon fonctionnement des *rhizobiums* symbiose – légumineuses nécessite une coordination entre deux partenaires : la plante hôte (légumineuse ou macro-symbionte) et la bactérie (*rhizobium* ou micro-symbionte) (Azib, 2020).

L'utilisation excessive des engrais chimiques pour l'amélioration de la croissance des plantes présente des effets négatifs de point de vue nutritionnels, cela nous a poussés à réfléchir la recherche d'une solution permet de remplacer l'engrais chimiques par des engrais biologiques naturels se forme des bactéries fixatrices d'azote qui présentent des caractères physiologiques plus résistantes aux conditions extrêmes de l'environnement tel que les stress biotiques de nature variée (Patricia, 2006) (les métaux lourds et les antibiotiques comme exemples).

L'objectif de mon étude est l'identification de quelques paramètres physiologiques des vingt-quatre souches symbiotiques d'une plante légumineuse *Genista saharea* qui poussent spontanément dans une région aride.

Un premier chapitre fera tout d'abord le point sur une analyse bibliographique des connaissances acquises sur l'importance de la symbiose légumineuses *rhizobia*, ainsi que des généralités sur la légumineuse *Genista saharea* et les *rhizobiums*.

Aussi le processus de fixation symbiotique de l'azote, on présentera par la suite l'effet des métaux lourds sur les microorganismes fixateurs de l'azote.

Puis le deuxième chapitre nous parle de matériels et méthodes utilisées pour la caractérisation phénotypique et symbiotique des bactéries nodulantes légumineuse étudiée, avec l'effet des métaux lourds, antibiotiques et l'application de tests des nodulations pour les souches apparaissent probablement des Gram+ nodulantes légumineuses. Le dernier chapitre (3) nous

avons résumé les résultats obtenus grâce à notre étude et discuté des résultats similaires et différents.

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

Première partie :
Partie bibliographique

Chapitre 01 :

Synthèse bibliographique

1. I. Cycle de l'azote

L'azote (N), après l'eau, est l'élément nutritif dont les plantes ont le plus besoin (White et Brown, 2010). Il représente 1,5 à 2% de la matière sèche des plantes et environ 16% de la fraction totale des protéines végétales (Frink *et al.*, 1999).

Représente 78% de l'atmosphère terrestre, ce fait de lui l'élément le plus abondant. Malgré son abondance, il s'y trouve que sous sa forme moléculaire normale diatomique N₂, un gaz relativement inerte et donc peu réactif. Chez les organismes vivants, il est essentiel à la synthèse des acides nucléiques et des protéines, les deux polymères les plus importants de la vie. Or, la plupart ne peuvent pas l'utiliser sous sa forme N₂. L'azote fixée inorganique, souvent sous forme d'ammoniac NH₃ ou d'ions nitrates NO₃⁻, est la seule forme qu'ils peuvent utiliser. Par conséquent, l'azote représente donc un élément très limitant pour la productivité primaire dans les écosystèmes terrestres et marins. La biogéochimie de l'azote dépend presque entièrement des réactions de réduction-oxydation principalement médiées par les micro-organismes et, dans une moindre mesure, du recyclage à long terme dans la géosphère (Canfield *et al.*, 2010). Le cycle de l'azote dans la (**Figure1**) décrit les processus biochimiques ou chimiques impliquant.

En raison du grand nombre de transformations de l'azote dans l'environnement et de la difficulté pour les êtres vivants à l'incorporer, ce cycle est très complexe. Il se compose principalement de trois processus de base :

1. I.1-La fixation de l'azote moléculaire N₂

Correspond à la conversion de l'azote atmosphérique en azote utilisable par les plantes et les animaux. Le processus majoritaire est la fixation biologique du diazote. Les *rhizobiums* sont les plus puissants fixateurs pouvant fixer jusqu'à 200 kg N/ha/an (Smil, 1999). L'azote ainsi fixé dans les nodules est transféré à la plante avec 20%, qui fournit en échange des glucides aux bactéries, et 80 % est émis dans le sol après la mort et la décomposition des nodules. La réaction chimique type est: $2\text{N}_2 + 3(\text{CH}_2\text{O}) + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 4\text{NH}_4^+ + 3\text{CO}_2$

A son tour, l'ammonium (NH₄⁺) se transforme en ammoniac (NH₃) gazeux, dans les sols où le pH est élevé, selon la réaction suivante : $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \longrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$

1. I.2-La nitrification

Correspond à la transformation des produits de la fixation (NH_3 et NH_4^+) par l'action des bactéries (Costa *et al.*, 2006) nitrosantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*) en nitrites (NO_2^-) selon la réaction suivante :

$$2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+$$

A leurs tours, les nitrites sont transformés en nitrates (NO_3^-) par l'action de bactéries nitrifiantes (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*) selon la réaction suivante :

$$2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_3^-$$

1. I.3- La dénitrification

Il s'agit d'une réaction de réduction des nitrates (NO_3^-), par l'intermédiaire de bactéries anaérobies (*Pseudomonas*) qui transforme la matière organique, en une forme gazeuse N_2 qui retourne dans l'atmosphère et ainsi le cycle recommence. La réaction de dénitrification est la suivante :

$$4\text{NO}_3^- + 5(\text{CH}_2\text{O}) + 4\text{H}_4^+ \longrightarrow 2\text{N}_2 + 5\text{CO}_2 + 7\text{H}_2\text{O}$$

Malgré l'abondance de l'azote dans l'atmosphère et son cycle qui permet son recyclage, l'azote reste un élément très limitant pour la croissance des plantes. Des pertes peuvent avoir lieu. Le cycle de l'azote est alors déterminé par le type d'écosystème, son utilisation, les conditions pédoclimatiques mais surtout par la quantité d'azote apportée par la fixation biologique (Miloud, 2018).

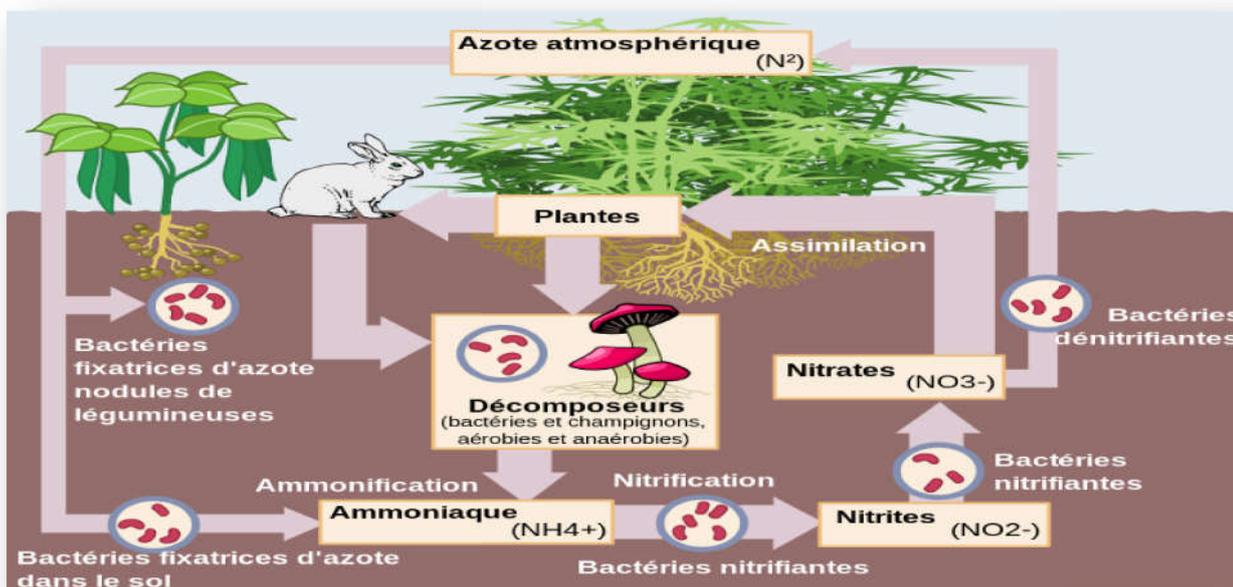


Figure 1. Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Puijic et Normand, 2009).

1. II. Macrosymbionte : partenaire végétal (Légumineuse)

1. II.1-Généralité

Les plantes de la famille des légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *rhizobiums*. Cette association se traduit par une relation symbiotique, au cours de cette association la plante fournit à son symbiote une niche écologique et les éléments nutritifs issus de la photosynthèse, nécessaires à son métabolisme et le micro-organisme fournit l'azote assimilable (NH_3) à partir de l'azote de l'air (N_2) (Hopkins, 2003).

1. II.2-Classification et intérêt

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les *Angiospermes*, *Eudicotylédone* (**Tableau1**). Il s'agit de la troisième plus grande famille des *Angiospermes* en nombre d'espèces (après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*), avec 770 genres et près de 20 000 espèces (Azani *et al.*, 2017). Les légumineuses ou *Leguminosae* se classent au second rang économique, après les *Poaceae*. Depuis le début de l'agriculture les légumineuses, domestiquées parallèlement aux graminées, jouent un rôle clé dans leur développement (Hancock, 2012). Pour une sensibilisation de leur importance au plan nutritionnel, ainsi qu'agro-écologique en faveur d'un maintien d'une agriculture durable et d'une biodiversité face au changement climatique, l'ONU a été désignée par « année internationale des légumineuses » dans 2016 (Domergue, 2017).

Les légumineuses présentent toutes une particularité dans leur système racinaire, une symbiose avec une bactérie du sol les *rhizobia*, qui leur permet de bénéficier de l'azote de l'air pour leur croissance. Cela constitue en outre un apport azoté non négligeable pour la culture (Solomon et Fassil, 2014). Les légumineuses représentent 35% des protéines végétales utilisées au niveau mondial pour l'alimentation humaine et animale. D'un point de vue nutritionnel, la composition en acides aminés des légumineuses est très complémentaire de celle des céréales. En effet, les protéines provenant des céréales sont déficientes en lysine, et les légumineuses à graines sont déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang *et al.*, 2003). Les légumineuses sont également cultivées pour leurs huiles alimentaires (soja, arachide).

Les légumineuses 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 (Baudoin, 2001). 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 (Pinochet *et al.*, 2006).

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounolou , 2001).

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>Coesalpinioideae</i> |

1.II.3-La tribu des *Genistées*

Les *Genistées* se rencontrent fondamentalement au pourtour méditerranéen. Différent processus paleoclimatique et géologiques ont eu un impacte sur l'évolution des communautés des plantes méditerranéennes. Cette tribu représente une grande signification écologiques dans les pays méditerranéens car elles colonisent les forêts dégradées et caractérisent les paysages des régions en déforestation (Lograda *et al.*, 2010). Il existe plusieurs genres appartenant à cette tribu : genre *Lupinus*, genre *Retama*, genre *Genista*, genre *Spartium*, genre *Cytisus* (Mellal, 2019).

1. II.3-1-Genre *Genista*

En Algérie où il en existe une vingtaine d'espèces. Il pousse dans les régions Nord et Sud et au grand Sahara. 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, 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 (Chaïch, 2018).

Les *Genêts* (*Genista*) sont des arbrisseaux ou sous-arbrisseaux très répons, originaires des régions méditerranéennes, comprennent 76 espèces de petits arbustes, très florifères (**Tableaux 2**). 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) (Tourene, 2018).

| Rang taxonomique | Nomenclature |
|--------------------|---------------------------------------|
| Règne | <i>Végétal</i> |
| Sous règne | <i>Trachéobionta</i> |
| Embranchement | <i>Spermaphytes</i> |
| Sous embranchement | <i>Angiospermes</i> |
| Phylum(Division) | <i>Magnoliophyta</i> |
| Classe | <i>Dicotyledones (Magnoliopsidia)</i> |
| Sous classe | <i>Rosidea</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.II.4-Le niébé *Vigna unguiculata*

1.II.4-1-Généralité ,groupes, et intérêt

Le niébé *Vigna unguiculata* est une légumineuse essentielle dans la plupart des communautés africaines où il est cultivé (Ndiaye, 2007). C'est la plante vivrière la plus importante et la plus cultivée dans les régions d'Afrique tropicale (Jackai et Adalla, 1997). Le

niébé est souvent référencé comme la viande des hommes pauvres du fait qu'il contient une importante marge de protéines, des minéraux, et des vitamines (Tharanathan et Mahadevamma, 2003). Pour les ruraux pauvres particulièrement ceux ayant un accès limité aux protéines d'origines animales comme la viande et les poissons (Akpapunam et Sefaddeh, 1997).

V. unguiculata (**Tableaux3**) est appelé communément niébé en Afrique, cowpea en Amérique, dolique en Europe et en Algérie, haricot Kabyle au Nord, Tadelaght au Sud Ouest, Metlili et Tidellaghine à Ouargla.(Skerman, 1982) a subdivisé l'espèce *V. unguiculata* en 3 principaux groupes:

- Variété *sinensis*, niébé commun, cultivé, de longueur moyenne, à gousses pendantes et graines de taille moyenne, arrondies et réniformes.
- Variété *sesquipedalis*, haricot kilomètre, à gousses pendantes de 1m de long et à graines allongées réniformes.
- Variété *cylindrica* ou *catjang* qui a de courtes gousses érigées et de petites graines oblongues ou cylindriques (Cronquist, 1991).

1.II.4-2-Systématique

Tableau 3. Selon (Cronquist, 1981) *V. unguiculata* appartient à la systématique suivante

| | |
|-------------|--------------------------|
| Règne | Plantae |
| Sous règne | Tracheobionta |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Sous classe | Rosidae |
| Ordre | Rosales |
| Famille | Fabaceae |
| Genre | Vigna |
| Espèce | <i>Vigna unguiculata</i> |

1.III.Microsymbionte : partenaire bactérien(*rhizobium*)

1.III.1-Généralités sur les *rhizobia*

Le terme *rhizobia* est donné pour toutes les bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique et former des nodules sur les racines des plantes légumineuses, l'azote

atmosphérique est fixé ou réduit en ammoniac pour être assimilable par les plantes (Asadi Rahmani *et al.*, 2009) .

Les *rhizobia* sont capables également d'interagir avec le système racinaire des plantes non légumineuses et d'améliorer la productivité agricole (Mouffok, 2020).

1.III.2-Caractères généraux des *rhizobia*

Les *rhizobia* constituent 0.1 à 8 % de la flore bactérienne totale du sol (Graham,1992), ils se présentent sous forme de *coccobacilles* ou en *bâtonnets* réguliers de 0.6 à 0.8 µm de large sur 1 à 4 µm de long (Domergue, 2017), aérobies strictes (Pelmont, 1993), Gram négatives et asporulés (Bekki, 1983), généralement très mobiles quand elles sont jeunes grâce à la présence d'un seul flagelle polaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Krieg *et al.*, 1984). Ces bactéries se trouvent soit à l'état libre ou à l'état symbiotique sous forme de *bactéroïdes* avec une taille dix fois plus grande. Ces derniers ont une forme en X, Y et T(Domergue, 2017).

Les *rhizobia* à croissance lente ; avec un temps de génération de 6 à 7 heures, elles exigent 3 à 5 jours pour la production d'une turbidité modérée dans un milieu liquide. Ce groupe de *rhizobia* se développe sur une gamme moins large de sources de carbones et entraîne une production d'alcalis (Bala *et al.*, 2004).

1.IV.1-La symbiose fixatrice d'azote *rhizobium*-légumineuse

La symbiose entre les plantes de la famille des *Fabaceae* et les bactéries de la famille des *Rhizobia* est une des plus efficaces en termes de fixation azotée, et permet ainsi aux *Fabaceae* de coloniser les sols qui contiennent peu ou pas d'azote (Graham et Vance, 2003) . Les légumineuses sont responsables à elles seules de près de 30% de la fixation d'azote annuelle qui comprend la fixation industrielle de N₂ par le procédé de *Haber-Bosh*, la fixation atmosphérique de N₂ par conversion photochimique et la fixation biologique de N₂ par les *procaryotes* (Eetl, 2012). Le mutualisme entre les *Fabaceae* et les *rhizobiums* aboutit à la formation d'un organe particulier sur les racines ou les tiges, appelé nodule ou nodosité. Ces nodosités représentent de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur de cet organe, les microsymbiotes transforment l'azote atmosphérique en ammonium, une forme biologique qu'elles échangent avec la plante contre des photosynthétats (substrats carbonés) (Wang *et al.*, 2018).

1.IV.2-Les différentes étapes de la formation du nodosité

La mise en place de la symbiose Légumineuse-*Rhizobium* se caractérise par 3 étapes principales (**Figure2**) : (1) une étape de reconnaissance entre la plante et la bactérie par l'intermédiaire d'un dialogue moléculaire, (2) l'infection de la racine par la bactérie et le développement du primordium nodulaire, et (3) la formation d'un nouvel organe racinaire, la nodosité au sein duquel se déroule la réduction et la fixation de l'azote atmosphérique (Berger, 2019).

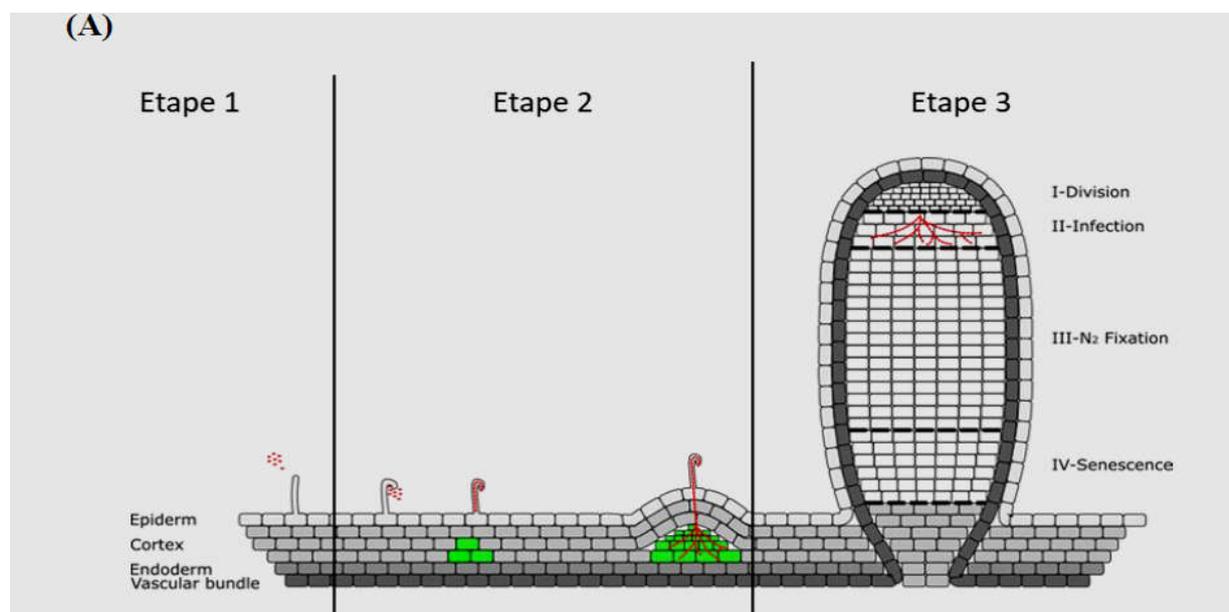


Figure 2. Représentation schématique de la mise en place de la nodosité (Berger, 2019).

1.V.L'effet de métaux lourds sur *rhizobia*

1. V.1-Définition des métaux lourds

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5g/cm^3 . Ces éléments sont présents naturellement dans la croûte terrestre et dans tout organisme vivant, à des concentrations variables suivant les milieux et les organismes (Zorrig, 2011).

D'un point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (Adriano, 2001).

1.V.2-Effet toxique des métaux lourds sur les microorganismes et le mécanisme d'adaptation

De plus, les définitions précises des termes tolérance et résistance portent parfois à confusion dans la littérature. Une publication de (Gadd, 1992) propose une terminologie plus précise et spécifique.

De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent la biodiversité des microorganismes retrouvés dans ces sols en comparaison avec des sols non pollués (Bélanger, 2009). La sensibilité des microorganismes peut se traduire par une diminution de l'expression protéique alors qu'une augmentation de l'expression protéique signifierait une tentative d'adaptation au nouveau contaminant (expression d'un mécanisme de résistance) (Bélanger, 2009).

Chez les bactéries, les gènes codant pour l'expression des protéines impliquées dans ces mécanismes sont principalement plasmidiques, bien que quelques-uns soient chromosomiques (Bélanger, 2009). L'origine plasmidique de certains gènes peut résulter en une fréquence de transfert plus élevée de ces plasmides en conditions de stress. Un tel exemple a été démontré chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui, en présence de métaux, transférait ses plasmides lui procurant sa résistance (Bélanger, 2009).

Mécanismes d'adaptation des bactéries aux métaux lourds Certaines bactéries arrivent à résister à de fortes concentrations en métaux lourds. Pour avoir un effet toxique, les ions métalliques doivent d'abord entrer dans la cellule bactérienne. Certains métaux lourds sont nécessaires pour les fonctions enzymatiques et la croissance bactérienne ce qui explique la présence de mécanismes d'absorption qui permettent l'entrée des ions métalliques dans la cellule. La résistance aux métaux est le résultat du développement de mécanismes de tolérance permettant à la bactérie de détoxifier les métaux présents en trop grandes quantités dans le milieu (Soussou, 2013). Les ions métalliques essentiels entrent dans la cellule grâce à des transporteurs non spécifiques et d'autres spécifiques. Parmi les deux types de systèmes d'absorption, le premier est exprimé de façon constitutive, rapide et généralement piloté par le gradient chimiosmotique à travers la membrane cytoplasmique des bactéries et donc ne nécessite pas de l'ATP. Ce système résulte d'un afflux d'une plus grande variété des métaux lourds, une situation qualifiée de «porte ouverte» qui permet de comprendre pourquoi les ions métalliques sont toxiques. Le deuxième système est spécifique et il est relativement lent et est entraîné par l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Soussou, 2013).

1.V.3-Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/*rhizobia*

Divers facteurs environnementaux tels que les métaux lourds et les antibiotiques, des déficits en nutriments ont des effets néfastes à tous les stades menant à l'établissement de la symbiose ; depuis l'infection à la fixation de l'azote en passant par la formation des nodosités et la croissance des *rhizobia* et de la plante. Le Zn soit un oligoélément indispensable à la vie, à de trop fortes concentrations il affecte significativement la survie et le nombre de *rhizobia*. Dans le cas de la symbiose *Rhizobium/Acacia auriculaeformis*, la formation des nodosités est inhibée de 50 % par de fortes teneurs en Zn et la fixation d'azote diminue avec l'augmentation de la concentration en Zn (Maynaud, 2012).

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Chapitre 02 :

Matériels et méthodes

Chapitre2 : Matériels et Méthodes

2.1. Description des sites d'échantillonnage

Les 24 souches de (BNL) bactéries nodulant la légumineuse *Genista saharea* Ont été étudiées . Ces souches font partie de la collection du laboratoire de microbiologie (El hajeb-Biskra) et ont isolés des nodules racinaires d'une légumineuse *Genista Saharea* qui pousse spontanément dans les régions arides (Gharbi, 2017).

2.2. Mode opératoire

2.2. 1- Caractérisation physiologique des isolats

2.2.1.1-Étude de la tolérance des souches aux métaux lourds

Dans des flacons contenant 200ml de milieu (YMA : Vincent 1970) on ajoute diverses concentrations d'une solution-stock de chacun des métaux lourds (HgCl_2 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2$, CuSO_4). Les boites sont subdivisées en 4 portions le maximum, chacune estensemencée par une souche ou isolat puis incubée pendant 3 à 5 jours à 28°C. La préparation des solutions stock des métaux lourds s'effectue en dissolvant de différente masse de chaque métal dans 10 ml d'eau distillée. Les solutions sont stérilisées 20mn à 120°C. Les quantités correspondantes aux concentrations choisies sont rajoutées dans les milieux (Abou-Shanab *et al.*, 2006).

Le test est réalisé sur milieu solide YMA. Il permet d'étudier la capacité des souches isolées à croître et à résister aux métaux lourds (Abou-Shanab *et al.*, 2006). Les métaux lourds utilisés ainsi que leurs concentrations sont choisis selon des études faites par (Fatnassi *et al.*, 2014). La concentration utilisable dans mon étude dans le (**Tableau5**) est choisie selon des études faites Par (El-Hilali, 2006) et (Abou-Shanab *et al.*, 2006).

Ces métaux sont utilisés sous formes de sels hydrosolubles. Les concentrations en sels de métaux utilisés pour la préparation des solutions mères sont les suivantes :

Sulfates de cuivre ($\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$): 50 mg/ml.

Acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$): 30 mg/ml.

Chlorure de mercure (HgCl_2): 200mg/ml.

Sulfate de zinc ($\text{Zn SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$): 100mg/ml.

Pour la méthode, calculez la solution mère de chaque métal lourd dans l'**annexe5**.

Tableau 4. Les concentrations des métaux lourds utilisées.

| Métaux lourds | Concentrations en µg/ml de milieu YMA |
|---|---|
| Hg (HgCl ₂) | 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 ; 800. |
| Zn (ZnSO ₄) | 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 800. |
| Pb (Pb (OOCCH ₃) ₂) | 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 500 ; 800. |
| Cu (CuSO ₄) | 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400. |

2.2.1.2-Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des *rhizobia* comme un moyen d'identification (Josey *et al.*, 1979). Elle permet de caractériser et de comparer les souches entre elles. Le principe de l'antibiogramme est de mettre en culture des bactéries, et d'appliquer un disque contenant un antibiotique, de concentration connue, afin de voir quels effets jouent sur la bactérie ciblée. La résistance des isolats à quatre antibiotiques (Ampicilline 10 µg, Gentamicine 10µg, Kanamycine 30µg, Tétracycline 10µg) (**Tableau6**) a été étudiée par l'application de la méthode décrite par (Yattara *et al.*, 2000). La boîte de Petri YMA est inondée avec 300 µl de culture bactérienne. Puis, la suspension est étalée sur toute la surface de la gélose afin d'obtenir la quantité la plus homogène possible de bactéries à la surface et on laisse sécher la suspension pendant 5 minutes. A l'aide d'une pince stérile, on applique les disques d'antibiotiques en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Ainsi, 4 disques sont placés sur une boîte de 10 cm de diamètre, en prenant soin de flamber la pince à chaque nouvel antibiotique. Après application des disques(**Figure3**), les souches sont incubées pendant 72h à 28°C.

Les résultats de chaque test ont été évalués après 03 jours d'incubation. Par comparaison avec les boîtes témoins (culture sans antibiotique). Les souches ont été notées sensibles (pas de croissance) ou résistantes (bonne croissance) (Samasegaran et Hoben, 1985). On a pris les diamètres critiques des ATB utilisée selon les recommandations du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie française : CASFAM, 2013, (Bonnet *et al.* , 2013).

Tableau 5 : Concentrations et diamètres critiques pour les antibiotiques utilisés
(Bonnet *et al.* , 2013).

| Antibiotiques | Cables | Charges | Diamètres critiques | | Familles |
|--------------------------|--|---------|---------------------|------|-----------------------------------|
| | | | (S) | (R) | |
| Ampicilline (AMP) | Paro bacteriome : agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant lapénicilline(PLP). | 10 µg | ≥21 | <16 | <i>Bêtalactamines</i> |
| Gentamicine (GMN) | Sous unité30S du ribosome. Erreur de lecture du code génétique lors de la traduction, des protéines. | 10µg | ≥ 18 | < 16 | <i>Aminoglycoside</i> <i>s</i> |
| Kanamycine (K) | Erreur de lecture du code génétique. | 30UI | ≥17 | <15 | <i>Aminoglycoside</i> <i>s</i> |
| Tétracycline (TE) | Empêche la fixation de l'aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome. | 10UI | ≥ 19 | < 17 | <i>Tétracyclines</i> |



Figure 3. La méthode utilisée pour la culture d'antibiotique sur YMA.

2.2.1.3-Test de nodulation

Ce test est la première méthode pour identifier la souche, il permet évaluer leur capacité à noduler les plantes hôtes dans des conditions bactériologiquement contrôlées.

Il consiste à l'inoculation des graines germées de la plante hôte avec les différents isolats qu'on veut tester.

Le but de ce test dans notre étude est que nous avons détectés quelques souches (B4/Bg19/Bg20) qui apparut Gram+, donc évaluation leur capacité à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées.

Pour réaliser ce test nous avons utilisé la technique des jarres de Léonard (**Figure5(A)**) (Vincent, 1970), cette technique est réalisée selon les étapes suivantes :

2.2.1.3.1-Préparation des jarres

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 (Dekak *et al.*, 2018) (**Figure4**).



Figure 4. Les bouteilles d'eau minérales et les bouchons stérilisée.

2.2.1.3.2-Préparation du sable

Une quantité de sable de l'oued est lavé plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau devienne claire, ensuite rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée, puis humidifié avec la solution nutritive de Fâhraeus (**Annexe2**) et stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes dans des bécards recouverts par du papier aluminium.

Le tout étant préparé, les jarres sont remplies (**Figure5(B)**). La partie inférieure contient la solution nutritive de Fâhraeus alors que la partie supérieure est remplie par le sable stérile. Donc le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le sable avec la solution nutritive.



Figure 5.-A-jarres de Léonard (Vincent, 1970), -B-Jarres utilisé dans notre étude (Originale).

2.2.1.3.3-Sélection des graines

Avant la stérilisation des graines, il faut tout d'abord les sélectionner, elles doivent être non endommagées, propre et de taille identique.

Vu la croissance lente *in vitro* des gaines de notre plante hôte *Génital Sahara* (Plus de deux mois) qui dépasse le temps de notre étude expérimentale, nous les avons remplacés par les grains du niébé (*Vigna unguiculata*) qui sont disponibles durant toute l'année et caractérisés par : une croissance rapide *in vitro* et la capacité de fixer l'azote atmosphérique par une symbiose avec les B.N. L (**Figure6**).



Figure 6. Présentation des graines (GS :*Genista saharae* et VU :*Vigna unguiculata*)

2.2.1.3.4-Stérilisation des graines

La stérilisation se fait selon la méthode de (Vincent, 1970) et (Somasegaran et Hoben, 1994) dans l'annexe3.

2.2.1.3.5-Germination des graines

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur boîtes de Gélose nutritive à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des radicelles (Chabbi, 2010) ; (Dekak *et al.*, 2018) (Figure7).



Figure 7. Germination des graines sur milieu GN(Originale).

2.2.1.3.6-Inoculation des jarres

Après germination, les graines ayant donné des racines droites de 1 à 2cm de longueur, sont plantées dans le sable stérile à 2 cm de profondeur à raison de deux graines par jarre, puis sont inoculées immédiatement avec 2 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance à partir d'une culture sur YMB (Vincent, 1970) 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 couvertes du papier aluminium pendant les premières 24 heures d'inoculation et placées dans une serre en plastique agricole (**Figure 8**) équipée d'un système de lumière. L'irrigation des jarres s'effectue aseptiquement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminué, pour éviter une sécheresse du sable. Une jarre témoin non inoculé a aussi été préparée.

Après environ 6 semaines, les plantes sont récoltées, les racines sont rincées afin d'observer le résultat de la nodulation.



Figure 8. Jarres placées dans la serre en plastique agricole (Originale).

Chapitre 03 :

Résultats et discussions

Chapitre 3 : Résultats et discussions

3.1. Caractères cultureux

3.1.1-Examen macroscopique

Les souches nous enregistré leur croissance après trois jours sur YMA. La plupart des colonies blanchâtre (**Figure9**).

Nos Résultat similaire à (Belabes *et al.*, 2021) obtenus de la caractérisation culturelle des isolats sur milieu YMA (**Annexe1**) nous montrent des colonies de couleur blanche, de forme arrondies, de taille qui variée de 0.5mm à 3mm, opaques ou translucides et d'un aspect lisse ou gluant. Toutes certaines souches étudiées possèdent des exo polysaccharides.

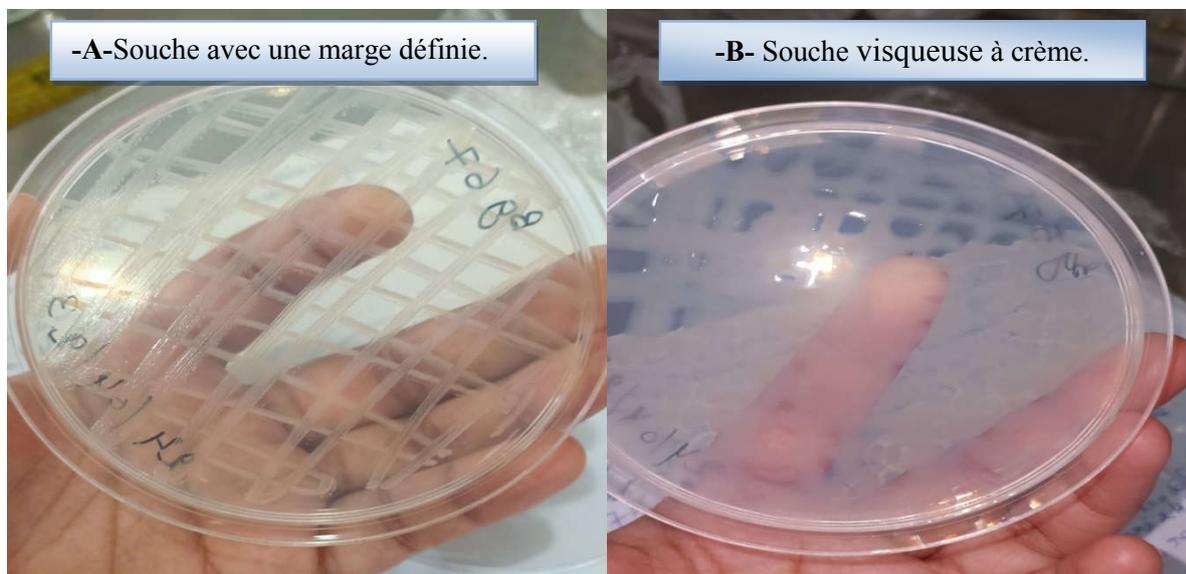


Figure 9. Croissance des souches sur YMA.

3.1.2-Examen microscopique

- **Coloration de Gram :**

Les isolats sont Gram ⁻ négatifs, ils ont la forme coccobacille montrée sur la (**Figure10**). Ces caractères morphologiques observés sont en accord avec ceux d'écrits pour les *rhizobiums* (Ouslim *et al.*, 2019) et ce sont les isolats que nous avons gardés pour la suite de travail (Test de nodulation).

Alors le résultat obtenu pour les trois souches (Bg4, Bg19, Bg20) est Gram + positif, ces souches nécessitent un test de confirmation est ce que se sont des BNL, capable de noduler une légumineuse ou non.

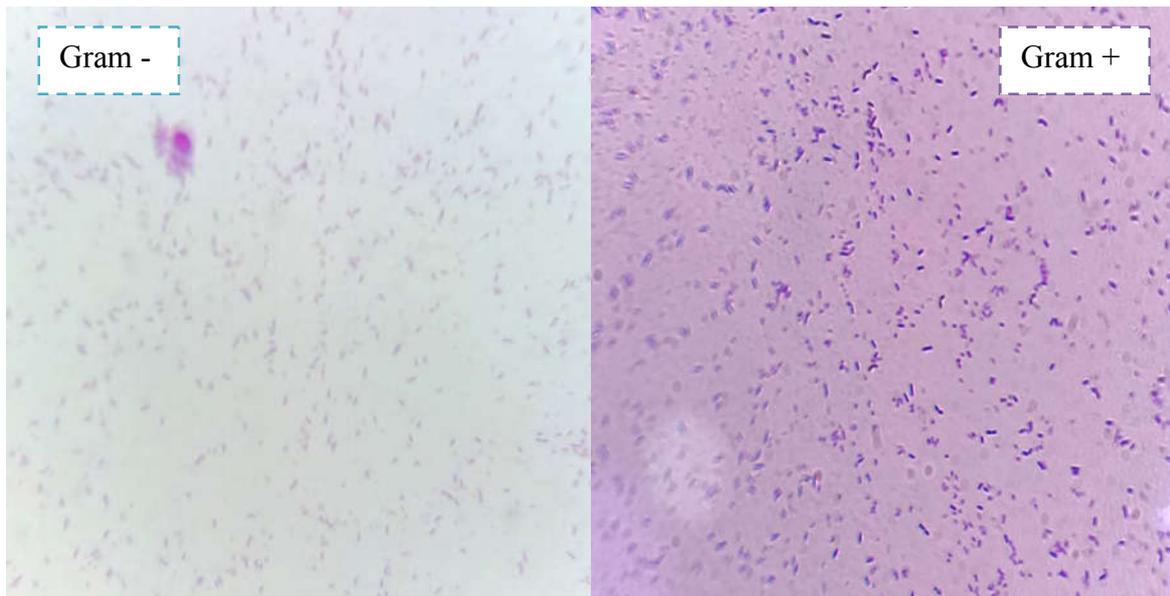


Figure 10. Aspect microscopique de la souche après coloration de Gram (Grossissement X100).

3.2. Caractérisation phénotypique des isolats

3.2.1-La tolérance des souches aux métaux lourds

La plupart des souches ne pouvaient pas tolérer des concentrations supérieures à 400 μ g/ml d'Hg. En ce qui concerne le Zn, une résistance tendue a t observe dans la plupart des souches, car elles continuaient résister jusqu'à 800 μ g/ml, tandis que d'autres s'airent 200 μ g/ml.

Pour Pb, un rapport supérieur à 50% indique une résistance des souches à des concentrations élevées supérieures à 800 μ g/ml.

L'inverse du résultat du Cu, qui a donné des résultats complètement opposés, cars les souches ne pouvaient pas résister à des faibles concentrations de celui-ci, donc l'inhibition totale de la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus sont résumés dans le la (**Figure11**) et (**Tableau 7,8** et **Tableau 9**) donnant la valeur approximative de CMI par les souches avec chaque métal lourd étudié.

D'après les études de (Dekak *et al.*, 2018) les isolats (N1, AN11' et B3) présentaient une tolérance maximale au plomb et au cuivre de 1,7 mg/ml et 1,6 mg/ml respectivement. La résistance au zinc a été (2,1 mg/ml) pour les isolats (N1, AN11', AB2' et M). Le profil de tolérance aux métaux lourds était dans l'ordre Zn>Pb>Cu>Hg. Les concentrations minimales obtenues pour la croissance des isolats et des souches de référence, en présence des

différentes concentrations des métaux lourds lui indiquent la résistance de ces micro symbiontes aux différents métaux lourds utilisés.

(Chabbi, 2010) Obtenus des résultats qui montrent une nette sensibilité au chlorure de mercure (HgCl_2). La résistance du *Rhizobium Sullau* plomb et au Cuivre, alors qu'elle présente une nette sensibilité au mercure.

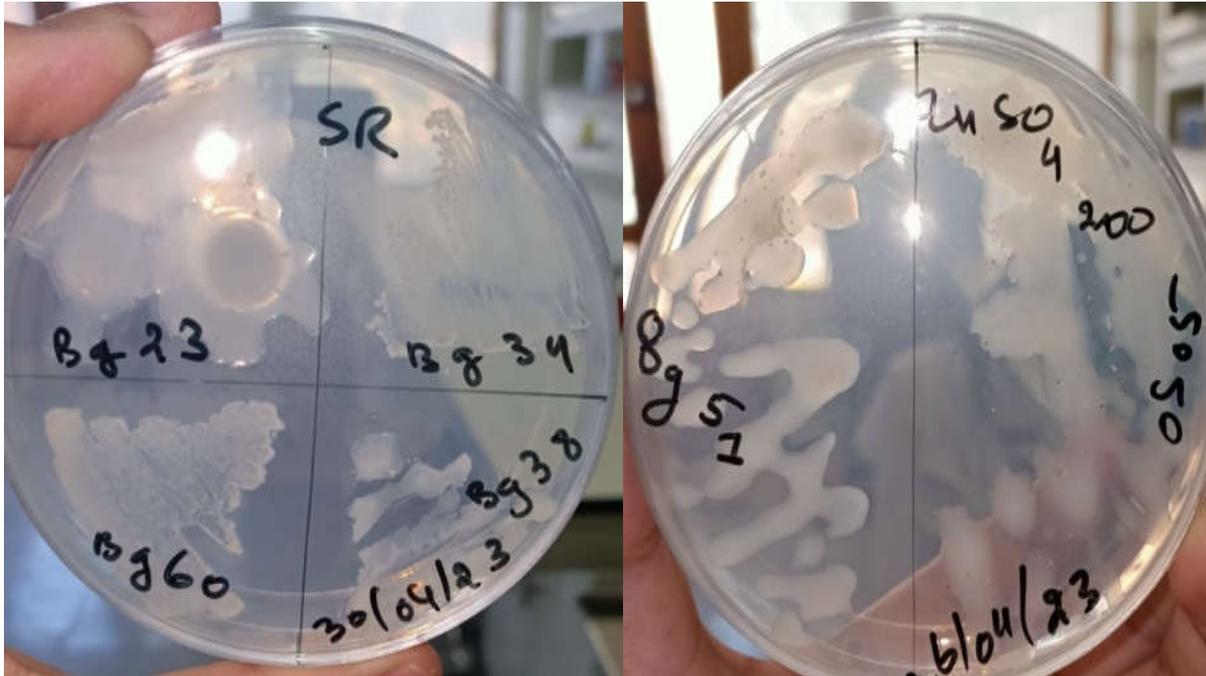


Figure 11. Quelque résultat de la souche testée par métaux lourds sur YMA.

Tableau 6. En raison de l'effet des métaux lourds (Hg) et (Zn) sur la croissance des souches bactériennes étudiées.

| Code des souche | $\text{HgCl}_2(\text{Hg})\mu\text{g/ml}$ | | | | | | | $\text{ZnSo}_4(\text{Zn})\mu\text{g/ml}$ | | | | | |
|-----------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|----|-----|-----|-----|-----|
| | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 800 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| B1 | 3+ | 2+ | + | + | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| B2 | 3+ | 2+ | - | - | - | - | - | 3+ | 2+ | + | - | - | - |
| B3 | 2+ | + | + | + | + | + | + | 2+ | + | + | - | - | - |
| B4 | + | - | - | - | - | - | - | 3+ | 2+ | + | - | - | - |
| B5 | 2+ | + | + | + | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + |
| B6 | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + |
| B7 | 3+ | 3+ | + | + | + | + | - | 3+ | 2+ | 2+ | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|---|---|---|----|----|----|----|----|---|
| B8 | 2+ | - | - | - | - | - | - | 3+ | 2+ | + | - | - | - |
| B9 | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | 3+ | 3+ | 2+ | + | - | - |
| B10 | 2+ | + | - | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + |
| B11 | 3+ | 2+ | - | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + |
| B12 | 3+ | 3+ | + | + | - | - | - | 3+ | 2+ | 2+ | + | + | - |
| B13 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + | - | - | 3+ | 2+ | + | + | - | - |
| B14 | 2+ | + | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + |
| B15 | + | - | - | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 2+ | - | - | - |
| B16 | 3+ | 2+ | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + | + |
| B17 | 3+ | 2+ | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| B18 | 3+ | 2+ | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + |
| B19 | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | - | - | 3+ | 3+ | 2+ | - | - | - |
| B20 | + | - | - | - | - | - | - | 3+ | 2+ | + | + | - | - |
| B21 | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + | - |
| B22 | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + |
| B23 | 2+ | + | - | - | - | - | - | 3+ | 2+ | + | - | - | - |
| B24 | 2+ | + | - | - | - | - | - | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | + |

3+ : Bonne croissance 2+ : Croissance moyenne + : Faible croissance - : Pas de croissance

Tableau 7. En raison de l'effet des métaux lourds (Pb) et (Cu) sur la croissance des souches bactériennes étudiées.

| Code des souches | Pb µg/ml | | | | | | | CuSO ₄ (Cu) µg/ml | | | | |
|------------------------|----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------------|----|-----|-----|-----|
| | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 500 | 800 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| B1 | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - |
| B2 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | - | - | - |
| B3 | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | - | - | + | - | - | - | - |

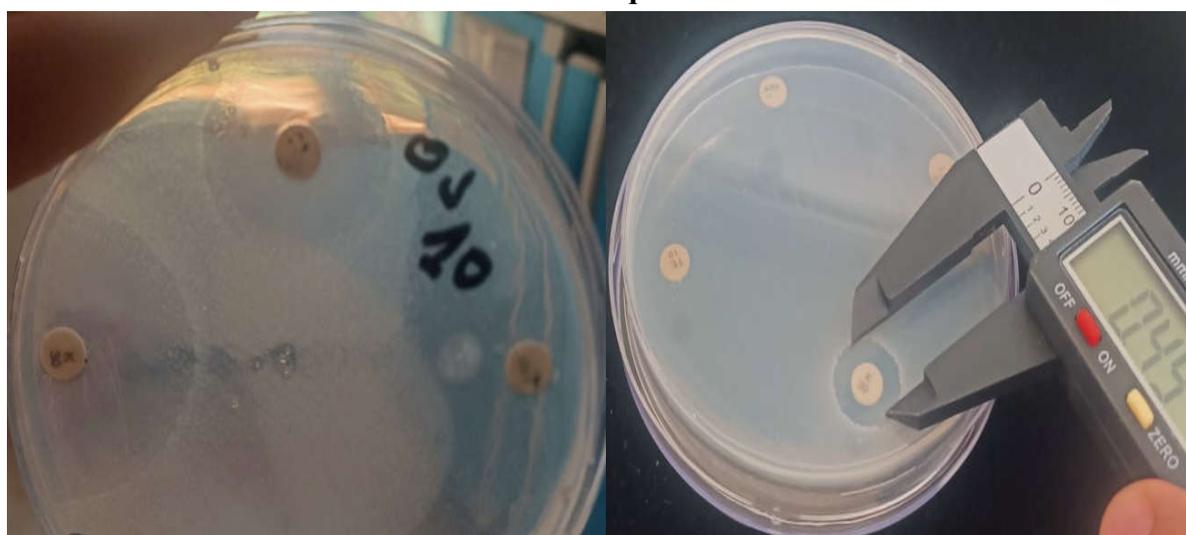
| | | | | | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|---|----|----|---|---|---|
| B4 | 3+ | 3+ | 2+ | + | + | - | - | + | - | - | - | - |
| B5 | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - | - | - |
| B6 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - |
| B7 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | + | - | - | - | - |
| B8 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | - | - | - |
| B9 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - | - | - |
| B10 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - |
| B11 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | - | - |
| B12 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | + | + | - | - | - |
| B13 | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| B14 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | + | + | - | - | - |
| B15 | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | - | + | - | - | - | - |
| B16 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | 2+ | + | - | - | - |
| B17 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | + | - | + | + | - | - | - |
| B18 | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | - | 2+ | 2+ | + | - | - |
| B19 | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | - | - | 2+ | + | - | - | - |
| B20 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + | - | + | - | - | - | - |
| B21 | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | + | - | - | - | - | - | - |
| B22 | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | - | 2+ | + | - | - | - |
| B23 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | + | - | - | + | - | - | - | - |
| B24 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + | - | - | - | - | - | - |

3+ : Bonne croissance 2+ : Croissance moyenne + : Faible croissance - : Pas de croissance

Tableau 8. Valeurs approximatives de la CMI.

| Métaux Souche | HgCl ₂ (Hg) µg/ml | ZnSo ₄ (Zn) µg/ml | Pb µg/ml | CuSo ₄ (Cu) µg/ml |
|------------------|------------------------------|------------------------------|-------------|---------------------------------|
| B1 | <400 | >800 | >800 | <50 |
| B2 | <200 | <200 | <500 | <25 |
| B3 | >800 | <200 | <500 | <50 |
| B4 | <100 | <200 | <500 | <50 |
| B5 | <400 | >800 | <800 | <25 |
| B6 | <300 | >800 | >800 | <50 |
| B7 | <800 | <200 | <800 | <50 |
| B8 | <100 | <200 | <500 | <25 |
| B9 | <400 | <400 | <800 | <25 |
| B10 | <200 | >800 | >800 | <50 |
| B11 | <200 | >800 | >800 | <50 |
| B12 | <400 | <800 | <800 | <100 |
| B13 | <500 | <400 | >800 | <50 |
| B14 | <300 | >800 | <800 | <100 |
| B15 | <100 | <200 | <500 | <50 |
| B16 | <300 | >800 | <800 | <200 |
| B17 | <800 | <200 | <800 | <100 |
| B18 | <300 | >800 | <800 | <200 |
| B19 | <400 | <200 | <500 | <100 |
| B20 | <100 | <400 | <800 | <50 |
| B21 | <300 | <800 | <800 | <25 |
| B22 | <300 | >800 | <800 | <100 |
| B23 | <200 | <200 | <500 | <50 |
| Os10 | <200 | >800 | <800 | <25 |

3.2.2-La résistance des souches aux antibiotiques

**Figure 12.** Lecture de la zone inhibitrice avec règle électronique.

Les résultats de la sensibilité et la résistance des souches étudiées aux antibiotiques sont illustrés dans le (**Tableau 10, Annexe 6 et Figure 13**). Ces résultats montrent que la moitié (50%) des isolats de *Genista saharea* sont toutes résistantes à l'ampicilline 10µg et (50%) sont sensibles. Ce pendant, elles sont toutes sensibles aux: Gentamicine 10 ug, Kanamycine 30UI et tétracycline 10UI. Dans les études *rhizobiales*, la résistance aux antibiotiques est utilisée comme moyen d'identification et de comparaison entre les différentes souches testées (Beck *et al.*, 1993). Ainsi, le degré de la résistance varie d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (Zhang *et al.*, 1991) et (Odee *et al.*, 1997). La kanamycine, inhibiteurs de la synthèse protéique, semblent avoir un effet néfaste sur la croissance de nos souches.

D'autre part (Sebbane, 2008), précise dans ces travaux il révèle que toutes les souches sont sensibles à la kanamycine.

(Batzli *et al.*, 1992) qui présentent des souches avec une grande tolérance aux tétracyclines et une faible tolérance à la kanamycine contrairement à (Maâtallah *et al.*, 2002) montrent que les souches de *rhizobia* sont résistantes à la kanamycine.

D'après (Dekak *et al.*, 2018) les résultats montrent que tous les isolats étaient résistants à la gentamycine. Cependant, ils étaient plus sensibles à la kanamycine. Plusieurs chercheurs ont rapporté des interactions antibiotiques/rhizobiums et il a été noté que les bactéries à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques que les rhizobiums à croissance lente (Maâtallah *et al.*, 2002) .

L'effet d'inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature , de sa concentration et le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre (Zhang *et al.*, 1991) et (Odee *et al.*, 1997).

Tableau 9.Résultat de test antibiogramme.

| ATB Souche | AMP 10 µg | GMN 10 µg | K 30 µg | TE 10 µg |
|---------------|--------------|--------------|------------|-------------|
| B1 | R | S | S | S |
| B2 | S | S | S | S |
| B3 | S | S | S | S |
| B4 | R | S | S | S |

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| B5 | R | S | S | S |
| B6 | R | S | S | S |
| B7 | INT | S | S | S |
| B8 | INT | S | INT | INT |
| B9 | S | S | S | S |
| B10 | R | S | R | INT |
| B11 | R | S | S | S |
| B12 | INT | S | R | R |
| B13 | R | INT | S | S |
| B14 | R | S | INT | INT |
| B15 | S | S | S | S |
| B16 | R | S | S | S |
| B17 | R | S | S | S |
| B18 | S | S | S | S |
| B19 | R | S | S | S |
| B20 | R | INT | S | INT |
| B21 | R | S | S | S |
| B22 | R | S | S | S |
| B23 | S | R | S | S |
| B24 | S | S | INT | INT |

INT : intermédiaire / S : sensible /R : résistance

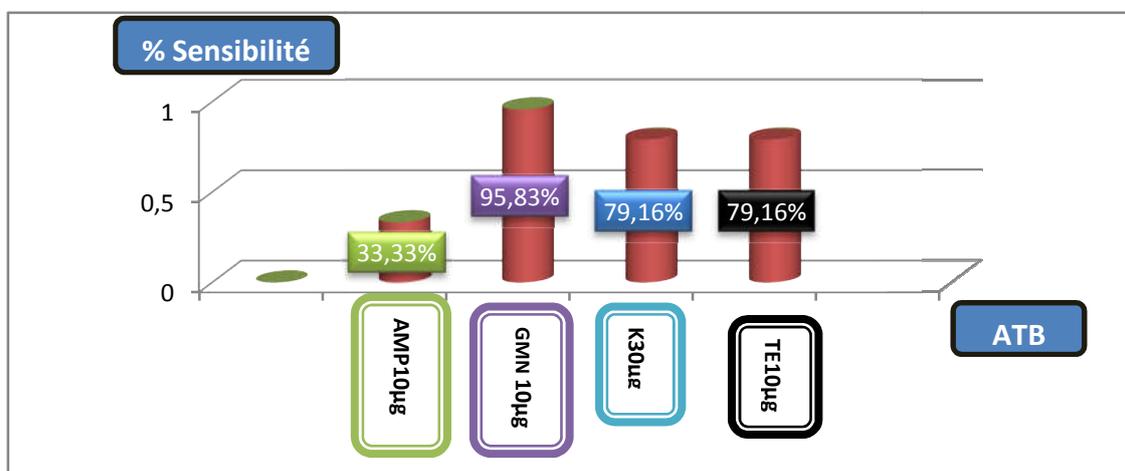


Figure 13. Effet des antibiotiques sur la croissance des souches (le pourcentage de sensibilité en fonction de la concentration des ATB).

R : Résistant / **INT** : Intère médiareN / **S** : Sensible

3.2.3–Test de nodulation

Grace à notre étude, nous avons constaté l'absence complète de nodule dans la partie racinaire dans tous les isolats étudiés en plus du témoin (**Figure15(A)**).

La partie aérienne pendant les quatre premières semaines jusqu'à début de la cinquième semaine, et la couleur des feuilles commence à changer en pointes de feuilles effilochées, indiquant que l'azote n'est pas fixé par les souches bactériennes (**Tableu11**) et (**Figure14**).

Alors les résultats obtenus peuvent interpréter par ;

- Soit Les bacilles colorés en violet (Gram positif) observés pour les isolats (Bg 4, Bg19, Bg20). Ils soient probablement dû à une contamination.
- Soit Cela confirme la relation antagoniste entre nos souches et notre plante *Vigna unguiculata*. c'est à dire ces souches Gram+ n'ayant pas la capaciter a noduler *Vigna unguiculata*, cela peut revenir à la spécificité de l'hôte, d'autre part la plupart des BNL sont aérobie, Gram- (Obaidalahe et Steils, 2016).

Ce phénomène et du à d'autres facteurs extrêmes (16H de lumière / 8H obligatoires), densité de l'inoculum, pH de sol, température et lumière (Obaidalahe et Steils, 2016).

(Dekkiche, 2017) Pour les variétés de pois chiche utilisées, il a été constaté que la plupart des plantes obtenues développaient des nodules aux caractéristiques phénotypiques différentes, sauf les témoins positifs et négatifs (en azote) qui ne produisaient pas de nodules. Cette variabilité a été observée dans le même pot quel que soit le cultivar et l'emplacement. Les nodules obtenus étaient de tailles différentes (0,1 à 1,5 cm) et présentaient différentes couleurs allant du blanc, rose foncé, rose clair, rose clair et marron. Les nodules trouvés dans les sols Sill et Hassi Messaoud étaient les plus petits en taille (0,2-0,3 cm) et étaient de couleur blanche à rose pâle, indiquant une fixation d'azote moins efficace.

Tableau 10. Résultat de test de nodulation pour les quatre souches étudiées.

| Code des souches | Date d'inoculation | Date de lecture | Test de nodulation | Fixation de l'azote | Nombre de nodule |
|------------------|--------------------|-----------------|--------------------|---------------------|------------------|
| B4 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B4 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B4 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B4 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B4 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B20 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B20 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B20 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B20 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B20 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19* | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19* | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19* | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19* | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19* | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19 | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| B19 | 19/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| T ⁻ | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| T ⁻ | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| T ⁻ | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| T ⁻ | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |
| T ⁻ | 16/04/23 | 31/05/23 | - | - | 0 |

T⁻ : Témoin négatifs

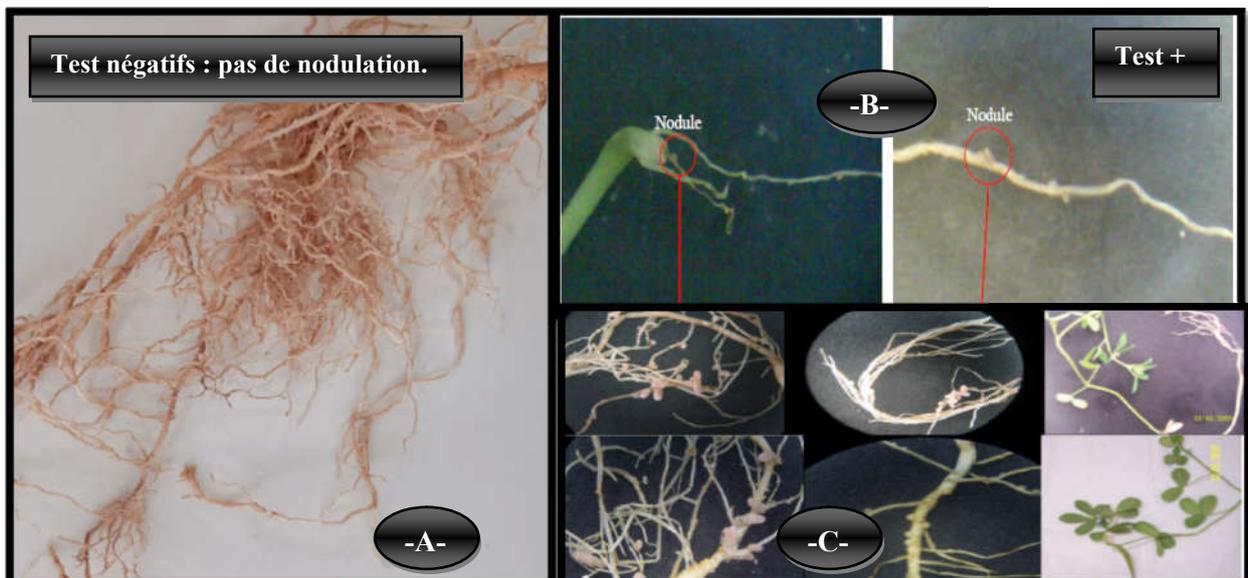
- : Test négatif



A : La plante une semaine après avoir semé la graine. **B** : Après quatre semaines.

C : La sixième semaine de semis et la dernière.

Figure 14. Aspect des plantes inoculées.



-A- : Résultat original (-); **-B-** : Résultat de (Dekak, 2010) (+); **-C-** : Résultat de (Chabbi, 2010) (+).

Figure 15. Aspect de la partie racinaire d'une plante inoculée.

Conclusion

Conclusion

L'atmosphère terrestre est composée à 80 % d'azote, un élément à la croissance des plantes. Cet élément est essentiel à la croissance des plantes. La fixation de l'azote est le deuxième processus biochimique le plus important après la photosynthèse.

La fixation de l'azote par la symbiose *rhizobium*-légumineuses présente un grand intérêt économique et agricole.

La croissance des légumineuses et l'efficacité de la symbiose *rhizobienne* varient selon qu'elles sont cultivées en monoculture ou en culture associée à la céréale.

La plupart des souches isolés de la région aride répondant d'une façon remarquable à des conditions de stress, il existe une variabilité de réponses entre ces souches vis-à-vis à ces conditions.

Au terme de cette étude et parcourant ses résultats obtenus, nous avons constaté que les isolats résistes des concentrations élevée de métaux lourds (Pb, Zn, Hg) et résistes des concentrations minimale de (Cu).

La majeure partie d'entre elle sensible de quatre antibiotiques intrinsèque est un signe de leurs compétitives envers d'autres populations microbienne, ce caractère peut être un critère taxonomique pour ces vingt quatre souches.

Bien que les résultats du test de nodulation des isolats étudiés aient donné des résultats négatifs, il nous donne une confirmation de l'hypothèse proposé que probablement les Gram+ nodulant les légumineuses.

En conclusion, les souches isolés des régions arides présentent des caractères physiologiques très résistantes vis-à-vis les Métaux lourd ce qui lui permet de résister aux conditions environnementales extrêmes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abou-Shanab R.A.I., Berkum P.V., Angle J.S. 2006. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere, Science Direct* 68:360-367.
- Adriano D.C. 2001. Trace Metals in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Second edition, Springer-verlag, New York, 882p.
- Akpanunam M.A., Sefa-Dedeh.S.1997. Jack bean (*Canavalia ensiformis*): nutrition related aspects and needed nutrition research. *Plant Foods Hum Nutr* 50 (2): 9-93.
- Asadi Rahmani H., Saleh-Rastin N., Khavazi K., Asghazadeh A., Fewer D., Kiani S., Lindstrom K. 2009. Selection of thermotolerant bradyrhizobial strains for nodulation of soybean (*Glycine max L.*) in semi arid regions of Iran. *World J.Microbiol Biotechnol* 25: 591-600.
- Azani N., Babineau M., Bailey C.D., Banks H., Barbosa A .R., Pinto R. 2017.A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny the legume phylogeny working group (LPWG). *Phylogeny and classification of the leguminosae* 66(1): 44-77pp.
- Azib S .2020. La symbiose *rhizobium*-luzerne: étude de la diversité *rhizobienne* et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans la Sahara septentrional est-algérien: écologie saharienne et environnement. Thèse de doctorat d'état, université de Ouargla, Algérie, 2p.
- 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): Microbiologie Appliquée. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar-Annaba, Agérie13-33p.
- Bala A., Murphy P. J., Giller K.E. 2004. Classification of Tropical Tree Rhizobia Based on phenotypic characters forms Nested Clusters of phylogenetic Groups. *Journal of applied Ecology* 6: 9- 19.
- Batzli J.M., Graves W.R., Berkum P. V.1992. Diversity among Rhizobia Effective With *Robinia pseudoacacia* L. *Applied and Environmentae Microbiology* 58 (7): 2137-2143.
- Baudoin J.P.2001. Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol, Agron, Soc, Environ* 5(4): 221-230.

- Beck D. P., Materon L.A., Afandi F.1993. Pratical Rhizobium- legume Technology manual. 1^{ère} édition , International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARA), Aleppo, Syria, 389p.
- Bekki A.1983.Contribution à l'étude de quelque espèce de luzerne et leur symbionte dans un environnement salé: Biologie Végétale. Université d'Oran: 48.
- Belabes R.K., Belaada N., Abedeli C. 2021. Contribution à l'étude de la croissance des souches de rhizobia isolées des zones arides: Biotechnologies. Mémoire de Master Académique, université Mohamed Boudiaf - M'sila , Algérie, 14p.
- Bélangier P.A. 2009. Etude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* SPP. Et sa symbiose avec l'aulne noir (*Alnus Glutinosa* (L) Gaertn). Thèse de magistère, université de Sherbrooke, Canada, pp.17-19.
- Berger A. 2019. Contribution des phytoglobines et des nitrates réductases à la régulation de l'oxyde nitrique et de la fixation de l'azote dans la symbiose *Medicago truncatula/ Sinorhizobium meliloti*: Ecologie Doctorat d'état, université Côte D'azur, France, pp.26-27.
- Bonnet R., Caron F., Cavallo J., Chardon H., Durgeon H., Chidiac C., Courvalin P., Dubreuil L., Jarlier V., Jehl F. 2013. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommendation, 19:133-142.
- Chabbi R. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Thèse de magistère, université Mentouri Constantine, Algérie, pp.42-44.
- Chaïch K. 2018. Diversité des associations *Rhizobium*-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional: Sciences Agronomiques. Thèse de doctorat d'état, université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, pp.17-144.
- Calvet R.2003.Le sol propriétés et fonctions: Phénomènes physiques et chimiques, Applications agronomiques et environnementales.2^{ème} édition, Grignon, Paris, P. 511.
- Canfield. D. E., Glazer. A.N., Falkowski.P.G.2010. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. Science 330(6001): 192-196.
- Costa E., Perez J., Kreft J.U. 2006. Why is metabolic labour divided in nitrification ?.Chemical 14(5): 213-219.
- Cronquist A.1981.An integrated system of classification of flowering plants. Columbia university Press, New york, 34: 1262p.
- Dekak A., Chabbi R., Menasria T., Benhizia Y. 2018. Phenotypic Characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. Microbiology 14: 4-18.

- Dekak A. 2010. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Thèse de magistère, université de Tébassa, Algérie, pp.10-90.
- Dekkiche S. 2017. Diversité taxonomique et moléculaire des rhizobiums nodulant le pois Chiche (*Cier arietinum L.*), dans l'Est Algérien: Biochimie et Microbiologie appliquées. Thèse de doctorat, université des frères Mentouri Constantine-1, Algérie, 57 pages.
- Domergue O. 2017. Diversité fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France: Interactions entre organismes, Bactériologie. Thèse de doctorat, université de recherche -Paris, France, 231p.
- EL-Hilali I. 2006. La symbiose Rhizobium-Lupin: Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus Luteus* : Microbiologie, Biologie Moléculaire. Thèse de doctorat, université du Rabat, Maroc, 206p.
- Ertl G. 2012. The Arduous Way to the Haber-Bosch Process. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 638(3-4):487-489.
- Fatnassi M., Padalino B., Monaco D., Aubé L., Korchani T., Lacalandra G.M., Hammadi M. 2014. Effect of different management systems on rutting behavior and behavioral repertoire of housed Maghrebimale camels (*Camelus dromedarius*). *Science* 46(5): 7-861.
- Frink C. R., Waggoner P.E., Ausubel J.H. 1999. Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *The Connecticut Agricultural Experiment Station* 96(4):1175-1180.
- Gadd G. M. 1992. Metals and microorganisms : a problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100 (1-3):197-203.
- Geddes B.A., Ryu M.H., Mus F., Costas A.G., Peters J.W., Voigt C.A., Poole P. 2015. Use of plant colonising bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Chemistry and Biochemistry* 35:2.
- Gharbi K. 2016. Contribution à l'étude des caractères symbiotiques des bactéries nodulant la légumineuse *Genista saharae* Coss et Dur. (Cas d'étude : la région de bouchagron, wilaya de Biskra): Microbiologie. Mémoire Master, université Mohamed Khider- Biskra, Algérie, p.30.
- Graham P.H. 1992. Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38:475-484.
- Graham P.H., Vance C.P. 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131(3): 872-877.
- Hancock J.F. 2012. Plant evolution and the origin of crop species (CABI): dictionnaire 3^{ème} édition, Michigan state university, USA, P.4.

- Hopkins W.G.2003. Physiologie végétale : dictionnaire. 1^{ère} édition, Bruxelles, Américaine, 514p.
- Jackai .L.E.N., Asalla.C.B. 1997. Pest management partices in cowpea: Pest management of borers of cowpea and beans. Insect Science and its application, p.23.
- Josey D. P., Beynon J. L., Johnston A. W. B., Beringer J. E. 1979. Strain Identification in Rhizobium Using Intrinsic Antibiotic Resistance. Microbiologie 46 (2): 343-350.
- Krieg R.N., Staley J.T., Brown D. R., Hedlund B.P., Paster B. J., Ward N.L., Ludwig W., Whitman W.B. 1984. Bergey's Manual of systematic Bacteriology, vol.4. Kreig, Paris, 122p.
- Lévêque C., Mounolou J.C.2001. Biodiversité: Dynamique biologique et conservation. Sciences. Dunod. Paris, 248p.
- Lograda T., Chaker A.N., Chalcha J.C., Ramdani M., Silini H., Figueredo G., Chalard P. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essentiel oils of *Genista ulicina* and *G.vepres*. Natural product communications 5(5): 835-838.
- Maâtallah J., Berraho E.B., Sanjuan J., Lluch C. 2002. Phenotypic Characterization of rhizoia isolated from Chichpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. Agronomie 22(3):321-329.
- Maynaud G. 2012. Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers: Microbiologie et Parasitologie. Thèse de doctorat d'état, université des Sciences et Techniques de Montpellier 2, France.
- Mellal H.2019. Symbiose *Rhizobium*-Lupin. Biodiversité des microsymbiotes et leur caractérisation à partir des nodules racinaires de la légumineuse *lupinus angustifolius*: Ecologie Microbienne. Thèse de doctorat d'état, université Freres Mentouri Constantine, Algérie, p. 11.
- Miloud Y. 2018. Etude du potentiel bénéfique des souches de *rhizobium* pour medicago truncatula : Symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose. Thèse de doctorat d'état, université de Toulouse, France, 27-31pp.
- Mouffok A. 2020. Etude de la symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba L.*) et la luzerne (*Medicago sativa L.*) cultivée sous contrainte hydrique :aspects morpho-physiologiques et agronomiques:Sciences Agronomiques. Thèse de doctorat d'état , université Mohamed Khider -Biskra, Algérie, p.4.
- Ndiaye M. 2007. Ecology and management of charcoat rot (*Macrophomina phaseolina*) on the cowpea in the sahel. PHD Thesis Wagennigen University, the Nertherland with summary in English, French and dutch. 114p.

- Obaidalaha Z., Steils N. 2016. La Trajectoire de Motivation A Frequenter Les Theatres : Le role des connaissances générales versus spécifiques. 15^{ème} Journées Normandes de Recherches sur la consommation : Société et Consommation.
- Odee D. W., Sutherland J.M., Makatiani E.T., Mcinroy S.G., Sprent J.I. 1997. Phenotypic Characteristics and Composition of Rhizobia associated With Woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Biotechnology* 188: 65-75.
- Ouslim S., Merabet C., Boukhatem Z., Bouchentouf L., Bekki A. 2019. Phenotypic And Symbiotic Diversity, of Nodulating Rhizobia Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria. *International Journal of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research* 3 (09): 2347-4289.
- Patricia M.2006.Etude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux, Influence des phytohormones sur la métabolisme azoté: Institut National Agronomique Paris-Grignon. Thèse de doctorat d'état, Ecole Doctorale Abies, France, 4p.
- Pelmont J.1993. Bactéries et environnement : adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble, 899p.
- Pinochet X., Salon C., Jeuffroy M., Touraine B., Cleyet-Marel J.C., Grignon I. 2006. Amélioration de la gestion de l'azote par les bactéries favorables à la croissance des plantes. *Académie d'Agréculture* 1025.
- Pujic P., Normand P.2009. La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes: Interactions plantes/micro-organismes. *Ecologie microbienne. Biofature* (298) 26-29pp.
- Samasegaran P., Hoben H. J.1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legumes- Rhizobium Technology. Springer Verlog, New York, Inc., 440.
- Samasegaran P., Hoben H.J. 1985. Methods in Legume-rhizobium Technology. NifTAL project and MIRCEN. Department of Agronomy, 2nd Soil Science Hawaii Institute Tropical Agriculture Human research, Univ Hawaii Manoa: pp.38-43.
- Sebbane M. 2008.L'effet deux modalité L' effet de deux modalités de prise d'information (Audition d'un CM vs lecture d'un photocopié) sur la réécriture d'un texte de spécialité enlangue L2: Un enjeu pour la didactique de l'apprentissage en L2 et l'évaluation des compétences en production, 2: 117-123.
- Skerman P.J.1982.Les legumineuses fourrageres tropicales.Edition: Rome, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 594p.
- Smil V. 1999. Nitrogen in crop production: Anaccount of global flows. *Biogeochemical cycles* 13 (2): 647-662.

- Solomon L., Fassil A. 2014. Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating Faba Bean (*Vicia Faba*) from Tahtay Koraro, Northwestern zone of tigray regional state, Ethiopia. *Agriculture* 2(11): 2347-4289.
- Soussou S. 2003. Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*: Agronomie et Environnement. Thèse de doctorat d'état, université de Sousse, Tunisie, pp. 34-38.
- Tharanthan R.H., Mohadevamma S. 2003. Grain legumes – a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 14(12): 507–518.
- Tourene M. 2018. Identification de bactéries associées au genre *Genista* : Ecologie Microbienne. Mémoire Mastère, université A. Mira-Bejaia, Algérie, pp.9-11.
- Vincent J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook n°15. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Wang S., Jiao X., Guo W., Lu J., Bai Y., Wang L. 2018. Adaptability of shallow subsurface drip irrigation of alfalfa in an arid desert area of Northern Xinjiang. *PLOS ONE* 13(4): 1-2.
- Wang Y., Shirogane T., Lui D., Harper J.W., Elledge S.J. 2003. Exit from exit: Restting the cell cycle through Amn 1 inhibition of G protein signaling. *Cel* 112 (5):697-709.
- Yattara I.I., Neyra M., Lahbib M.M., Yossi H., Lajudie P. 200. Diversité des Rhizobiums associés à *Dolichos lablab* utilisé pour l'amélioration de la jachère en zone sahélienne. *John Libbey Eurotext, La jachère en Afrique tropicale, session 8: 679–687.*
- White P.J., Brown P.H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of botany* 105:1073-1080.
- Zhang X., Hrper R., Karsisto M., Lindström K. 1991. Diversity of *Rhizobium* Bacteria Isolated from the Root Nodules of Leguminous Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(1): 104-113.
- Zorrig W. 2011. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*": Sciences Biologiques, Physiologie Végétale et Biologie Intégrative des Plantes, Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement. Thèse de doctorat d'état, université Tunis El Manar, Tunisie, pp. 11-15.

Annexes

Annexes1

Le milieu de culture

✚ **Milieu YMB (Yeast-Mannitol-Broth) en g/l** (Vincent, 1970)(Vincent J, 1970).

| | | |
|--|----------|---|
| Mannitol | 10.0 g/l |  |
| K₂HPO₄ | 0.5 g/l | |
| MgSO₄.7 H₂O | 0.2 g/l | |
| NaCl | 0.1 g/l | |
| Extrait de levure | 0.5 g/l | |
| L'eau distillée | 1l | |

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

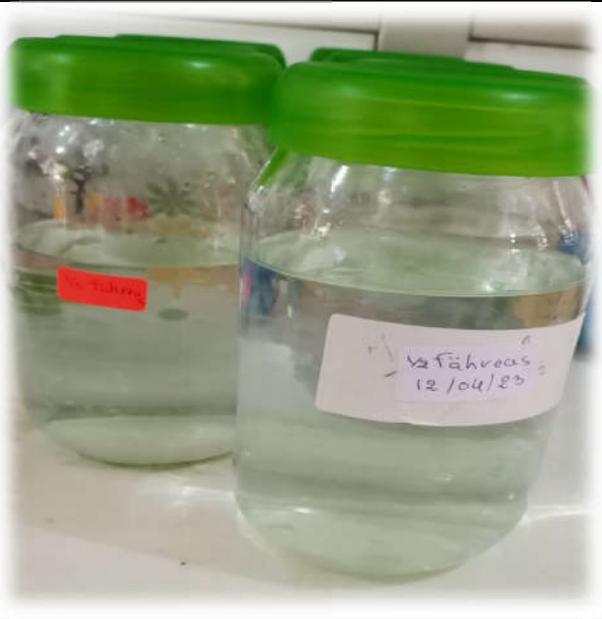
✚ **Milieu YMA (Yeast-Mannitol-Agar) en g/l** (Vincent, 1970)(Vincent J, 1970).

| | | |
|-------------|--------|--|
| YMB | 1.0 l |  |
| Agar | 15 g/l | |

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

Annexes2

✚ 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 | |

✚ Solution micro éléments g/l

| | | |
|--|------|--|
| H₃BO₄ | 2.86 |  |
| MnSO₄4H₂O | 2.03 | |
| ZnSO₄7H₂O | 0.22 | |
| CuSO₄5H₂O | 0.08 | |
| Na₂MoO₄ 2H₂O | 0.14 | |

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

Annexes3



Figure1: Les étapes de stérilisation respectivement (Originale).

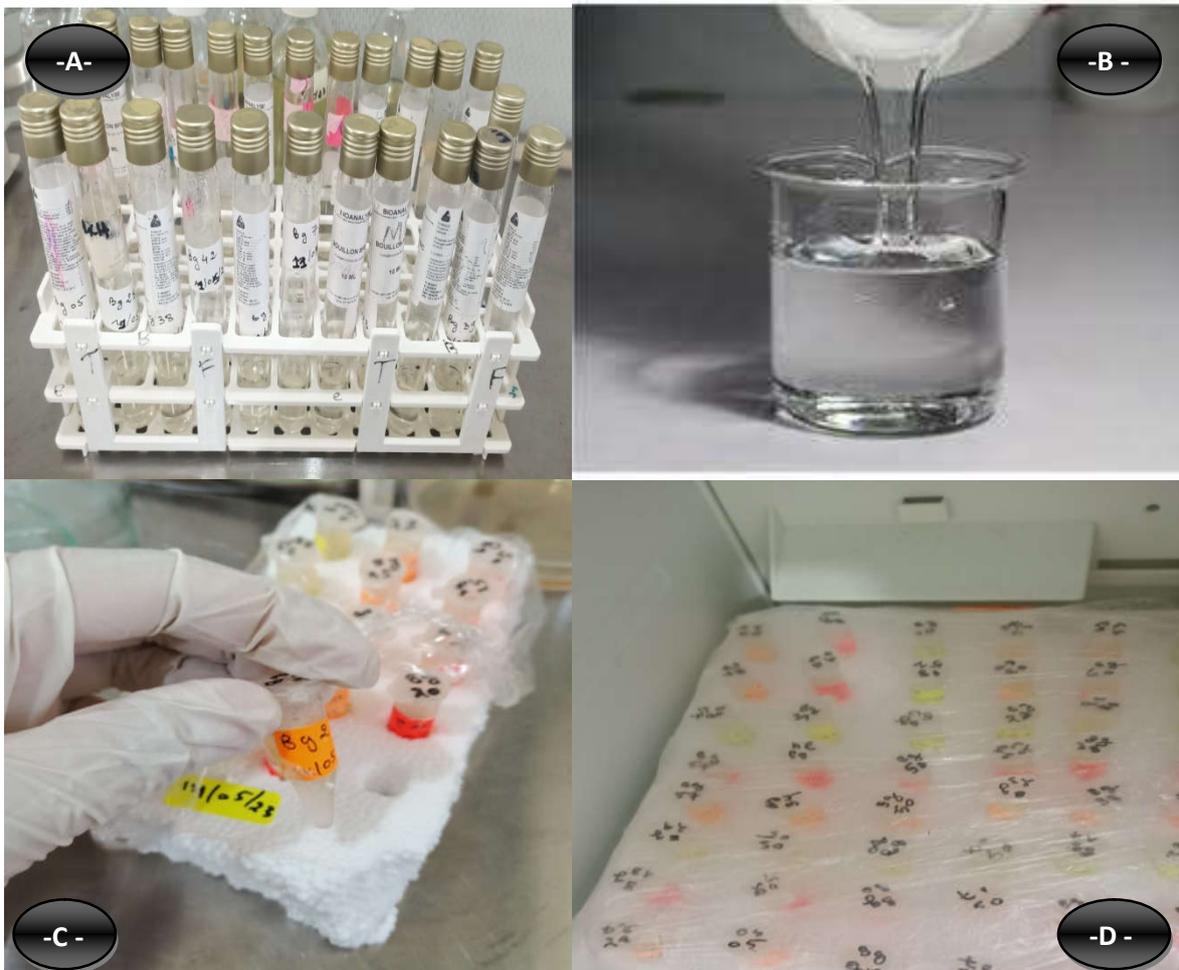
- A- : Présentation des graines de *Vigna unguiculata* ;-B- : Imbibition des graines dans l'éthanol 96 % (5seconds) ;-C- : Transformation des graines dans H_2SO_4 (3minutes) ou l'eau de javel 60% ;-D- : Rinçage des graines dans l'E.D.S ;-E- : Gonflement des graines dans E.D.S (1heure).

Annexe4

🚦 Coloration du Gram

| | |
|-------------------|---|
| 1ère Etape | -Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane, laissé agir pendant 1min. |
| 2ème Etape | - Le violet est éliminé avec le Lugol et laissé agir pendant 30 secondes. |
| 3ème Etape | - Après un lavage à l'alcool-acétone, le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau. |
| 4ème Etape | - La préparation est recouverte par la Fuschine, laissé agir durant 1 min. Après un nouveau lavage à l'eau, on égoutte la lame sur du papier absorbant puis on observe à l'huile immersion. |

🚦 Conservation des souches



-A- : Suspension bactérienne (dans YMB) ; **-B-** : Glycérol ; **-C-** : Ependorf : 0,5ml suspension bactérienne+ 0,5ml glycérol ; **-D-** : Microtube Ependorf congelées à - 80°C.

Annexe5

✚ Méthode de calcul de la solution mère (exemple de Plomb)

MM Pb (OOCCH₃)₂ = 207,2 + 63,9976 + 48,0428 + 6,0476 = 325,288 g/mol

MM Pb = 207,2 g/mol

325,288 g/mol → 100 %

207,2 g/mol → X

X = 63,64%

- Préparation de la solution initiale :

C = 30mg/ml

1 g Pb (OOCCH₃)₂ → 20,404 g Zn

X → 0,1 g

X = 0,247 g

- Pour 10 ml on mesure 2,47 g

C₁ V₁ = C₂ V₂

$$C_2 = \frac{25 \times 10^{-6} \times 200}{100 \times 10^{-3}}$$

C₂ = 0,166ml

C₂ = 25 µl

✓ Acétate de plomb (Pb (OOCCH₃)₂, 3H₂O) : 30mg/ml

| [Pb ²⁺] | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 500 | 800 |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| VSM (ml) | 0,166 | 0,332 | 0,666 | 1,332 | 2,666 | 3,332 | 5,332 |
| VMA (ml) | 199,834 | 199,668 | 199,334 | 198,667 | 197,334 | 196,668 | 194,668 |

✓ Chlorure de mercure (HgCl₂) : 5mg/ml

| [Hg ²⁺] | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 800 |
|---------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| VSM (ml) | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 8 |
| VMA (ml) | 199,5 | 199 | 198 | 197 | 196 | 195 | 192 |

✓ Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) : 100mg/ml

| [Zn²⁺] | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
|--------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| VSM (ml) | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
| VMA (ml) | 199,95 | 199,9 | 199,8 | 199,6 | 199,2 | 198,4 |

✓ Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) : 50mg/ml

| [Cu²⁺] | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
|--------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| VSM (ml) | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
| VMA (ml) | 199,9 | 199,8 | 199,6 | 199,2 | 198,4 |

Annexe 06

Tableau1 : Diamètres des zones d'inhibition (mm).

| Souches | ATB | AMP | GMN | TE | K |
|----------------|------------|------------|------------|-----------|----------|
| B1 | | 14,40 | 25,45 | 19,15 | 14,10 |
| B2 | | 27,50 | 23,45 | 44,90 | 32,40 |
| B3 | | 31,65 | 26,75 | 38,90 | 23,95 |
| B4 | | 00,00 | 22,80 | 23,10 | 18,25 |
| B5 | | 13,95 | 20,20 | 32,40 | 37,10 |
| B6 | | 00,00 | 21,90 | 21,50 | 28,80 |
| B7 | | 17,85 | 23,55 | 31,50 | 33,60 |
| B8 | | 18,85 | 24,90 | 17,80 | 35,50 |
| B9 | | 25,00 | 22,85 | 49,10 | 42,50 |
| B10 | | 12,50 | 20,45 | 16,30 | 37,69 |
| B11 | | 09,20 | 22,60 | 22,10 | 40,90 |
| B12 | | 19,90 | 21,40 | 13,00 | 12,10 |
| B13 | | 00,00 | 16,55 | 40,70 | 33,50 |
| B14 | | 10,85 | 22,75 | 18,65 | 21,85 |
| B15 | | 29,85 | 23,20 | 28,60 | 28,00 |
| B16 | | 00,00 | 21,50 | 19,60 | 35,30 |
| B17 | | 09,35 | 19,20 | 23,45 | 25,15 |
| B18 | | 28,10 | 24,90 | 48,60 | 39,10 |
| B19 | | 11,95 | 23,10 | 36,90 | 22,90 |
| B20 | | 12,45 | 17,50 | 18,05 | 25,05 |
| B21 | | 11,30 | 33,00 | 26,45 | 41,20 |
| B22 | | 00,00 | 24,40 | 39 | 24,70 |
| B23 | | 28,60 | 15,70 | 23,15 | 18,05 |
| B24 | | 30,60 | 24,60 | 18,60 | 38,40 |

الملخص

تم الشروع في هذا العمل لتقييم التنوع المظهري الفيسيولوجي في مجموعة من أربعة وعشرين سلالة بكتيرية عقدية للبقوليات معزولة من العقد الجذرية لنباتة جينيستا من منطقة جافة من الجزائر ، و لاختبار فعاليتها ومقاومتها لمجموعة من المعادن الثقيلة (الزئبق، الرصاص، الزنك، النحاس) ، مع مجموعة أخرى من المضادات الحيوية (الأومبيسيلين، الجونتاميسين، الكاناميسين، النيتيغاسيكلين).

أظهر التوصيف المظهري مجموعة متنوعة من الاستجابات ، أظهرت السلالات مقاومة واسعة لمعدن الزنك ،الرصاص والزرنيق ،عكس معدن النحاس الذي أعطى تأثير قوي ومميت لمعظم الخلايا .أظهرت الدراسة أيضا حساسية معظم السلالات البكتيرية لمختلف تراكيز المضادات الحيوية المستعملة. وتم أيضا في هذه الدراسة تسليط الضوء على اختبار خلق عقد بكتيرية جذرية مع أربعة سلالات بكتيرية موجبة الجرام، والتي أعطت نتائج سلبية مع نوع اللوبيا فيجنا /أونغويكولات .

لقد حصلنا على مجموعة كبيرة من المعلومات حول سلالات بكتيرية معزولة من عقد جذرية لنباتة جينيستا الصحراء المحلية التي يمكن استخدامها كسماد طبيعي فعال لتحسين التربة حتى تصبح صالحة للزراعية في المناطق الصحراوية لما تتمتع به من مقاومة عالية للمعادن الثقيلة

الكلمات المفتاحية : بكتيريا البقوليات العقدية ، جينيستا، المعادن الثقيلة ، المضادات الحيوية، اختبار العقد الجذرية ، فيجنا /أونغويكولات.

Résumé

Ce travail a été réalisé pour évaluer la diversité physiologique au sein d'une collection de vingt-quatre souches bactériennes BNL isolées à partir des nodosités racinaires de la légumineuse *Genista saharea* de la région aride d'Algérie et de tester leur résistance vis à-vis de différentes concentrations des métaux lourds (Mercure, Plomb, Zinc, Cuivre), avec un autre group d'antibiotique (Ampéciline ,Gentamicine, Kanamécine, Tétracycline).

La caractérisation physiologique a montré une diversité de réponses. Les souches présentaient un large spectre de résistance au métaux lourds Zinc, Plomb, Mercure. Contrairement au Cuivre, qui exerce un effet fatal sur la plupart des souches. L'étude a également montré la sensibilité de la plupart des souches bactériennes à différentes concentrations des antibiotiques étudiés. Le test de nodulation a également été mis en évidence avec quatre souches Gram-positives, qui ont donné des résultats négatifs avec l'espèce de *Vigna unguiculata* .

Mots clés : BNL, *Genista*, métaux lourds, antibiotique, test de nodulation, *Vigna unguiculata*.

Abstract

This work was carried out to evaluate phenotypic diversity within a collection of twenty-four bacterial strains isolated (BNL) from *Genista saharea*, from Algerian region arid, and to test their resistance to different concentrations of heavy metals (Mercury, Lead, Zinc, Copper) and with a group of antibiotics (Ompicillin, Gentamicin, Kanamycin, Tigasieline).

Physiological characterization showed a diversity of responses. The strains showed a broad range of tolerance to heavy metals Mercury, Lead, Zinc, and the reverse is true for Copper, which showed a fatal effect on most strains. The study also showed the sensitivity of most bacterial strains to different concentrations of the antibiotics studied. The nodulation test was also demonstrated with four Gram+ positive strains, which gave negative results with the *Vigna unguiculata* species.

Key words: BNL, *Genista*, heavy metals, antibiotics, the nodulation test, *Vigna unguiculata*.