



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

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**Khalida BOUDJEMLINE et Hanin BEN TAHAR**

Le : mardi 9 juillet 2019

### **Thème**

# **Caractérisation phénotypique et symbiotique des *rhizobia* isolés des légumineuses des régions arides (Biskra et Touggourt)**

---

#### **Jury :**

Mme. Aicha MDAJDBA	MAA	Université de Biskra	Président
Mlle. Souad BABA ARBI	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Manel DJOUAMA	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements Madame BABA ARBI S. Docteur au Département des Sciences de nature et de la vie - Université Mohamed Khider-Biskra pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer.

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.

Nous remercions beaucoup les ingénieurs de labo département pour tout l'aide que vous avez vous adonnez pour mettre fin à ce travail.

## Dédicace

Je m'incline devant Dieu tout puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Je dédie ce modeste travail:

A ma belle mère HANIA, et mon beau frère YUCEF pour lesquels je souhaite une longue et heureuses vie pleine de bonheur, pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites qui ont d'un pas à pas marché ma vie pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affectation.

A mon unique amie HASSINA qui m'a encouragé dans mon travail, et ma fille SARSSORA

À tout le reste de la famille : NASRO, MOHAMED, ZINO, ALI , LAYLA , HIND , AFEF , KHADRA , ZINEB

À HANIN , ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa bonne humeur.

À tous mes amis (es) AMEL , NASSERA , BOUTINA ....., et tous ceux qui m'ont aidé durant le parcours de mes études.

**KHALIDA**



## **Dédicace**

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde et qui ont sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études, ma douce et précieuse mère FATIMA et mon très cher père RABEH.

A ma chère sœur SALIMA.

A mes frères LAIDE, OTHMENE, SABER, MILOUDE, DJAMEL, KARIM et OUSSAMA.

A tous mes amies IHCEN, SALOUA, SELMA, ZOHRA, NOUR, NAIMA, LINDA, SAMIA, SONIA, FERIEL .....

A ma chère collègue KHADLIDA qui ma accompagnée tout le long de la réalisation de ce travail.

**Hanin**

## Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste d'abréviation

Introduction ..... 1

### Première partie :SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Chapitre 1. LEGUMINEUSE ET *RHIZOBIA*

1. Le macrosymbionte : les légumineuses ..... 2

1.1. Généralités ..... 2

2.2. La symbiose rhizobium-légumineuse ..... 2

1.2.1 Intérêt de cette symbiose..... 2

2. Le microsymbionte: les rhizobia ..... 3

2.1. Définition des rhizobia ..... 3

2.2. Classification des rhizobia..... 3

#### Chapitre 2. LA FIXATION D'AZOTE ET L'EFFET DES METAUX LOURDS SUR RHIZOBIA

3. La fixation biologique de l'azote atmosphérique..... 7

3.1. Les organismes et les systèmes fixateurs de l'azote ..... 7

3.1.1. Les fixateurs symbiotiques ..... 7

3.1.2. La fixation symbiotique d'azote ..... 7

4. Utilisation des rhizobia en agriculture ..... 7

4.1. Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia ..... 8

4.2. Effet des métaux lourds sur les *rhizobia* ..... 8

### Deuxième partie: PARTIE EXPERIMENTALE

#### Chapitre 3. MATERIEL ET METHODE

I. Caractère culturaux ..... 10

I.1. Revivification et purification des isolats ..... 10

I.2 .Conservation des souches..... 10

II. Test de nodulation..... 11

II.1. Préparation des pots .....	11
II.2. Préparation du substrat.....	11
II.3. Préparation de solution d'arrosage.....	11
II.4. Stérilisation et germination des graines .....	11
II.5. Plantation .....	11
II.6. Inoculation .....	12
II.6.1. Première inoculation .....	12
II.6.2. Deuxième Inoculation : Après une semaine de la plantation, on fait la deuxième	12
II.7. Suivre la croissance des plantes .....	12
II.8. Dénombrement.....	12
<b>III. Caractérisation préliminaire des isolats.....</b>	<b>12</b>
III.1. Coloration du Gram .....	12
<b>IV. Test biochimique .....</b>	<b>12</b>
IV.1. Recherche catalase .....	12
IV.2. Test de la catalase.....	13
<b>V. Etude de la tolérance des souches aux métaux lourds .....</b>	<b>13</b>

#### **Chapitre 4. RESULTAT ET DISCUSSION**

<b>I. Caractère culturaux .....</b>	<b>14</b>
I-1- Croissance sur YMA+ Rouge Congo .....	14
<b>II. Résultat de la caractérisation symbiotique des isolats (test de nodulation).....</b>	<b>14</b>
<b>III. Caractérisation phénotypique des isolats.....</b>	<b>15</b>
III.1. Résultat de la coloration du Gram .....	15
III.2. Test biochimique .....	16
III.2.1. Recherche de la catalase .....	16
III.2.2. Recherche d'oxydase .....	16
<b>IV. Etude de la croissance des souches en présence des métaux lourds.....</b>	<b>17</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>22</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>23</b>

**Annexe**



## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Classification des <i>rhizobia</i> (Graham, 2008).....	03
<b>Tableau II :</b> Résultats des souches au test de Catalase et Oxydase.....	16
<b>Tableau III :</b> Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds.....	17

## Liste des figures

<b>Figure I:</b> L'aspect des colonies de <i>Rhizobia</i> sur le milieu YMA+Rouge Congo.....	14
<b>Figure II:</b> Observation microscopique de la bactérie x 100.....	15
<b>Figure IV :</b> Exemple de résultats de croissances des souches en présence de différents métaux lourds.....	19
<b>Figure V :</b> Taux de résistance des souches étudiées vis-à-vis des métaux lourds.....	20

## Liste d'abréviation

**LPS** : Lipo Polysaccharides de Surface

**RC** : Rouge Congou.

**V/V** : Volume /Volume.

**VSM**: Volume de Suspension Mère.

**VMY** : Volume de milieu YMA.

**YMA**: Yeast Mannitol Agar.

**YMB**: Yeast Mannitol Brouth.

# **Introduction**

# Introduction

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. La symbiose *rhizobienne* est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en formes assimilable par les plantes (Zahran 2001).

L'association symbiotique légumineuse-*rhizobia* est un phénomène qui permet à la plante d'acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie d'obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. La survie des *rhizobiums* dans le sol, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs (Wery, 1985).

La recherche des taux de résistances des souches de *rhizobium* aux métaux lourds dans les différents écosystèmes est indispensable, pour comprendre ce phénomène sous l'angle épidémiologique et écologique et pour pouvoir lutter contre cet incontestable problème menaçant la fertilité du sol (Carrasco et al., 2005).

L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité des isolats associés de *Melilotus* et *Vicia* issues des régions de Biskra et Touggourt à noduler différents types de plantes légumineuse (*Melilotus indicus*; *Medicago sativa*; *Vicia faba*; *lens culinaris*) ainsi que leur tolérance en présence des métaux lourds.

Ce travail est réalisé en deux parties, une première partie consiste à une synthèse bibliographique: Chapitre 1: Généralités sur les *rhizobia* et la fixation biologique de l'azote atmosphérique.

Et une deuxième partie construite par deux chapitres; un chapitre décrit les matériels et les méthodes utilisés pour la caractérisation des *rhizobia* symbiotiques des légumineuses étudiées: test de nodulation et étude de la croissance des souches en présence des métaux lourds.

Le deuxième chapitre concerne la présentation et la discussion des résultats obtenus.

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

**Première partie**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre 1**

**LEGUMINEUSE ET**

***RHIZOBIA***

## **1. Le macrosymbionte : les légumineuses**

### **1.1. Généralités**

Les légumineuses représentent la troisième plus grande famille de plantes à fleurs (numériquement parlant) qui regroupe trois sous-familles, les Papilionacées (ou Fabacées), les Mimosacées et les Césalpinacées (Messaili, 1995; Dommergues et *al.*, 1999).

### **2.2. La symbiose *rhizobium*-légumineuse**

L'azote est l'élément nutritif dont les plantes ont besoin en grande quantité. La disponibilité de cet élément est fortement limitant aussi bien dans les écosystèmes naturels que cultivés et il a une grande influence à la fois sur le rendement et la qualité du produit. Les plantes acquièrent l'azote par l'assimilation de l'azote minéral (nitrate, ammonium) et pour certaines d'entre elles en mobilisant l'azote atmosphérique par le biais de leur association avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. (Stougaard, 2000)

#### **1.2.1 Intérêt de cette symbiose**

Cette symbiose permet aux légumineuses d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol, ce qui permet d'assurer leurs besoins. En outre, avec l'ascension des prix des engrais azotés et au vu des problèmes de pollution par les nitrates, l'importance des légumineuses à forte capacité fixatrice de l'azote devient évidente. Pour les régions où les sols sont généralement pauvres en azote la fixation symbiotique de l'azote est devenue un élément incontournable des politiques de limitation des apports d'engrais azotés que ce soit pour des raisons économiques, écologiques ou de durabilité de l'activité agricole (Alkama et *al.*, 2002; Jeder et *al.*, 2003).

Il est donc avantageux de cultiver les légumineuses car d'une part, elles fournissent des aliments riches en protéines et d'autre part, ce sont des cultures à faible niveau d'intrants que ne modifient que très peu les équilibres biologiques naturels (Sprent, 2001). Cependant ces avantages sont subordonnés à leur capacité de contacter des symbioses fixatrices de l'azote avec des *rhizobia* des sols destinés à leur culture. Cette capacité ne peut s'exprimer avantagement que si la légumineuse rencontre dans le sol la souche de *rhizobia* qui est compatible avec elle et qui en même temps présente un pouvoir d'infectivité des racines (une bonne compétitivité vis-à-vis des autres bactéries et une grande efficacité au plan de réduction symbiotique de l'azote atmosphérique) (Graham, 2008).

## 2. Le microsymbionte: les *rhizobia*

### 2.1. Définition des *rhizobia*

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology, le genre *Rhizobium* comprend des bacilles de taille 0,5-1,0 x 1,2-3,0 µm. Ne formant pas de spores, Gram négatif, mobiles grâce à des flagelles péritriches. (Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) affirment la mobilité grâce un flagelle ou de deux à six flagelles péritriches. Sont aérobies avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons mais peuvent bien croître en faibles pression d'oxygène. En anaérobiose, elles sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons. La température optimale de croissance se situe dans l'intervalle de 25 à 30°C. Certaines espèces peuvent, cependant croître à des températures de plus de 40°C. Le pH optimum de croissance étant de 6 à 7. Les colonies sont généralement de couleur blanchâtre ou beige, de forme circulaire, convexe, translucides ou opaques, mucilagineuses et bombées. La croissance sur milieu (YMA) (Somasegaran et Hoben, 1994).

### 2.2. Classification des *rhizobia*

La classification des *rhizobiums*, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche polyphasique qui ne retient plus les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique. En effet, une même légumineuse peut être nodulée par différentes espèces de *rhizobiums* (le soja est nodulé par *Sinorhizobium fredii* et *Bradyrhizobium japonicum*) tandis qu'une même espèce peut regrouper des bactéries de spécificités d'hôte différentes (*Rhizobium leguminosarum* est divisé en trois *biovars* *bv. viciae*, *bv. trifolii* et *bv. phaseoli*) (Boivin et al., 1998).

Les méthodes d'énumération des *Rhizobia* et la mesure de la diversité n'ont pas donné une description exacte ; le nombre peut être sous-estimé et la diversité pourrait aussi être masquée grâce aux divergences causées par le choix de la plante hôte et les facteurs du sol (Terefework, 2002).

**Tableau I:** Classification des *rhizobia* (Graham, 2008)

Genre /espèce	Plantes hôtes
<i>Allorhizobium</i> <i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Acacia</i> , <i>Faidherbia</i> , <i>Lotus</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>

<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>A. doebereineriae</i>	
<b><i>Blastobacter</i></b>	<i>Aeschynomene indica</i>
<i>B. denitrificans</i>	
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	<i>Chamaecytisus,</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Lupines</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max Les pedeza, Medicago,</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Melilotus</i>
<b><i>Burkholderia</i></b>	<i>Mimosa</i>
<i>B. caribensis</i>	<i>diplotricha M. pudica</i>
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Macherium lunatum,</i>
	<i>Mimosa</i>
	<i>Aspalathus spp</i>
<b><i>Devosia</i></b>	<i>Neptunia natans</i>
<i>D. neptuniae</i>	
<b><i>Mesorhizobium</i></b>	<i>Amorpha fruticosa Prosopis alba</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Cicer arietinum Astragalus sinicus,</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Acacia Lotus corniculatus Cicer arietinum</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis Juriflora, leucaena</i>
<i>M. huaxuui</i>	<i>Astragalus adusvrgens</i>
<i>M. loti</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora,</i>
<i>M. plurifarium</i>	<i>Glycine, Caragana,</i>
<i>M. seplentrional</i>	<i>Saphora</i>

<i>M. temperatum</i>	
<i>M. tianshanense</i>	
<b><i>Ralstonia (cupriavidus)</i></b>	<i>Mimosa</i>
<i>R. taiwanensis</i>	
<b><i>Rhizobium</i></b>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. etli</i>	<i>vulgaris,</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Galega orientalis,</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Gofficinalis</i>
<i>R. hainanense</i>	<i>Pisum leucaena, Macropilium,</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Onobrychis P. vulgaris, leucaena,</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Macroptilium, Desmanthus Desmodium</i>
<i>R. leguminosarum</i>	<i>sinuatum, Stylosathes, Vigna, Arachis,</i>
	<i>Desmanthus Sesbania herbacea Indigofera</i>
<b><i>bvtrifolii</i></b>	<i>Trifolium La thyrus, Lens, Pisum,</i>
<i>bvviciae</i>	<i>Vicia P. vulgaris Astragalus, Lespedeza</i>
<i>bvphaseoli</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>
<i>R. mongolenes</i>	<i>P. vulgaris, Dalea, Leucaena,</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Macroptilium, Onobrychis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Amohicarpaea, Coronilla, Gueldenstaedtia</i>
<i>R. yunghinagense</i>	
<b><i>Sinorhizobium</i></b>	<i>Abrus precatorius Acacia spp Acacia senega,</i>
<i>S. abri</i>	<i>Prosopis, Chilensis Glycine max Sesbania</i>
<i>S. americanus</i>	<i>rostrata Acacia senegal, Prosopis chilensis</i>
<i>S. arboris</i>	<i>Kummerowia stipulacea Medicago</i>
<i>S. fredii</i>	<i>truncatula, M. polymorpha, M. orbicularis</i>
<i>S. indiaense</i>	
<i>S. kostiense</i>	

<i>S. kummerowiae</i>	
<i>S. medicae</i>	
<b><i>S. meliloti</i></b>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala Acacia, Sesbania</i>
<i>S. saheli</i>	<i>Acacia, Sesbania</i>
<i>S. terangae</i>	

**Chapitre 2**

**LA FIXATION**

**D'AZOTE ET L'EFFET**

**DES METAUX LOURDS**

**SUR RHIZOBIA**

### 3. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains microorganismes transforment l'azote de l'air (N<sub>2</sub> ou diazote) en ammoniac

(Huhevet et *al.*, 1996; Rose et Mueller, 2006).

Elle résulte de l'activité d'une enzyme qui s'appelle la nitrogénase (Maier et *al.*; 2009).

#### 3.1. Les organismes et les systèmes fixateurs de l'azote

Les micro-organismes fixateurs d'azote dit diazotrophes remplissent une fonction écologique irremplaçable (Davet, 1996). Ce sont des procaryotes (bactéries et cyanobactéries), qui vivent soit à l'état libre dans le sol, éventuellement en association avec un végétal, soit en symbiose avec un végétal (Luttge et *al.*, 1994, Vilain, 1997).

##### 3.1.1. Les fixateurs symbiotiques

La propriété symbiotique de fixation d'azote dans les nodules des plantes vasculaires est rencontrée chez deux groupes majeurs de bactéries phylogénétiquement différents ; les *rhizobia* (principalement *AlphaProteobacteria*) qui s'associent essentiellement avec des plantes légumineuses appartenant à la sous-famille des angiospermes (Fabaceae), et les *Frankia* (des *Actinobacteria*) qui s'associent avec un spectre plus large des plantes (Franche et *al.* 2009).

##### 3.1.2. La fixation symbiotique d'azote

Est l'un des processus biologique les plus importants qui influencent la production des plantes et la fertilité des sols (Serraj et *al.* 2004 ; Franche et *al.* 2009).

Ceci est dû aux grandes quantités d'azote atmosphérique apportées au sol par ce processus et dont la fixation symbiotique par les *rhizobia* qui vivent dans les nodules racinaires des plantes légumineuses constitue le mécanisme le plus important (Abdel-Ghafar 1989 ; Franche et *al.* 2009).

L'association symbiotique entre *Rhizobia*; bactérie fixatrice d'azote atmosphérique, et les légumineuses représente l'un des modèles les plus importants d'interactions entre bactéries et plantes (Madigan et Martinko, 2007).

### 4. Utilisation des rhizobia en agriculture

Il est maintenant bien connu que les légumineuses ont la faculté de former des nodosités racinaires en symbiose avec les bactéries *rhizobium*. L'exploitation des *rhizobia* est généralement reconnue comme une priorité pour la recherche en biotechnologie du fait de son

importance fondamentale pour la croissance des légumineuses et la production alimentaire. Les agriculteurs ne peuvent guère tirer parti des *rhizobia* présents naturellement dans le sol lorsque celui-ci contient des souches à faible pouvoir fixateur d'azote ou des populations limitées de souches à pouvoir fixateur d'azote élevé. C'est pourquoi il est courant aujourd'hui d'inoculer les légumineuses, c'est-à-dire d'ajouter délibérément des souches de rhizobium efficaces, de manière à accroître les populations efficaces et ainsi, augmenter les rendements des légumineuses (CPVQ, 1994).

La phytostabilisation est une technique qui vise à mettre en place une couverture végétale durable qui peut servir à contenir la pollution des sites fortement contaminés en utilisant des plantes tolérantes aux métaux lourds mais non accumulatrices des métaux. Il a été démontré que l'utilisation de la symbiose légumineuse/rhizobium est une approche importante dans la remédiation de sites chargés en métaux lourds mais la performance de cette relation symbiotique est impactée par les métaux lourds qui réduisent la colonisation des racines par les *rhizobia* et leurs activités de fixation de l'azote. Le développement des symbioses tolérantes aux métaux lourds est une nécessité absolue pour accélérer la croissance des légumineuses dans les sols contaminés en métaux lourds et stabiliser les sols des anciens sites miniers (Roba, 2016).

L'étude de la structure génétique et phénotypique des populations de bactéries symbiotiques pouvant s'associer à ces deux légumineuses revêt un grand intérêt et constitue une étape clé pour trouver la meilleure adaptation des deux partenaires (plante/rhizobium) et une bonne stratégie pour l'installation durable de la couverture végétale dans les sites miniers (Roba, 2016).

#### **4.1. Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia**

Divers facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse, l'acidité, l'alcalinité, les métaux lourds et les hydrocarbures, les températures extrêmes, 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 (Maynaud, 2012).

#### **4.2. Effet des métaux lourds sur les *rhizobia***

Certaines données de la littérature, rapportent que la présence de métaux lourds semble avoir un effet sur la fixation de l'azote atmosphérique, sur la biomasse et leur diversité ainsi que la taille de plantes (Rotheret *al.* (1983). Selon des essais faits sur des sols contaminés par le Cd, le Zn et le Pb, ont rapporté uniquement une perte mineure de l'activité nitrogénase, d e

la taille de plantes et de la nodulation. En effet, la capacité fixatrice d'azote est maintenue. De même, un retard de nodulation a été démontré par (Martensson et Witter (1990).

La diminution de la taille des populations de *rhizobium* en rapport avec l'augmentation des teneurs en métaux dans le sol et le temps d'exposition est actuellement bien étudiée (Pier-Anne, 2009).

**Deuxième partie**  
**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

**Chapitre 3**  
**MATERIEL ET**  
**METHODE**

### ➤ **Matériel**

L'ensemble des milieux de culture réactif et appareillages seront cités au fur et à mesure de leur utilisation.

### ➤ **Colorants réactifs et autres**

-Solution de rouge Congo (RC).

-Solution de violet de Gentiane ; solution de Lugol ; solution de Fuschine.

Alcool ; eau physiologique, eau oxygénée( $H_2O_2$ ); eau de javel.

-Huile d'émersion.

-Sulfates de cuivre ( $Cu\ SO_4, 5H_2O$ ) :50 mg/ml.

-Acétate de plomb ( $Pb\ (OOCCH_3)_2, 3H_2O$ ) : 30 mg/ml.

-Chlorure de mercure ( $HgCl$ ) : 200mg/ml.

-Sulfate de zinc ( $Zn\ SO_4, 7\ H_2O$ ) : 100mg/ml.

-Bichromate de potassium ( $Cr_2K_2O_4$ ) : 200mg/ml.

## **I. Caractère culturaux**

### **I.1. Revivification et purification des isolats**

Le repiquage se fait par des souches conservées de l'année passer sur le milieu YMA plus Rouge Congo (Annexe I).

A l'aide d'une anse de platine, on prend une goutte de la suspension, et on l'étale sur une boîte de pétri contenant le milieu YMA au rouge Congo dont la composition est celle donnée par Somasegaran et Hoben (1985) dans les tableaux (Annexe I).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des cadrans pour avoir des colonies bien isolées a partir des sept souches (ML2 ; ML22 ; BN3.1 ; BN4.2 ; TN1.4 ; TN2.1 ; TN4.3).

Incubation à une température de 28°C et à l'obscurité.

### **Lecture**

Après trois à cinq jours d'incubation, les colonies peuvent être observées sur les boîtes.

### **I.2 .Conservation des souches**

Les colonies purifiées sont conservées dans des tubes contenant le milieu YMA incliné, puis conservés réfrigérateur à (4 à 6°C) pour une utilisation ultérieure.

## **II. Test de nodulation**

Cette étape est nécessaire pour démontrer que les souches isolées sont capables d'induire la nodulation de leurs plantes hôtes et donc elles appartiennent aux *rhizobia*.

### **II.1. Préparation des pots**

A partir des bouteilles en plastique de 1,5 l de volume ont été trouées, lavées et désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium et bien rincées à l'eau stérile.

Les pots sont ensuite séchés et recouverts par du papier aluminium pour protéger le système racinaire des plantes de la lumière.

### **II.2. Préparation du substrat**

Le substrat utilisé est le sable. Le sable est lavé plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne claire, ensuite laisser sécher, puis stériliser dans un récipient au four Pasteur à 180°C.

### **II.3. Préparation de solution d'arrosage**

La nutrition des plantes est assurée par la solution de Rigaud et Puppo (1975), une à deux fois par semaine selon les besoins des plantes (annexe II).

### **II.4. Stérilisation et germination des graines**

Après sélection des graines saines de *Medicago sativa*, *Melilotus indicus*, *Vicia faba* et *Lens culinaris*, nous avons procédé à leurs stérilisations en surface selon le protocole de Vincent:

-Les graines sont mises dans un bain de l'éthanol à 95% pendant 30 s à 1 min afin de désinfecter leurs téguments ;

- Puis dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 3 à 4 min ;

- Ceci est suivi d'un très bon rinçage abondant, pour éliminer toute trace de l'éthanol et de l'hypochlorite de sodium.

Les graines ainsi stérilisées en surface sont mises à germer à l'obscurité à 20°C dans des boîtes Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau stérile.

### **II.5. Plantation**

Après germination des graines et apparition des racelles, les graines transférées stérilement dans les pots contiennent le substrat pour la plantation.

## **II.6. Inoculation**

**II.6.1. Première inoculation :** C'est après la plantation directe. L'inoculation des plantules a été réalisée par l'injection de 1 ml d'une suspension bactérienne de chaque souche obtenue sur milieu YMA, après l'ajout de 2ml d'eau physiologique stérile dans chaque tube YMA incliné et agitation.

**II.6.2. Deuxième Inoculation :** Après une semaine de la plantation, on fait la deuxième inoculation.

## **II.7. Suivi la croissance des plantes**

On suivi la croissance des plante à période 6 à 8 semaines.

## **II.8. Dénombrement**

Après la croissance des plantes, on fait le dénombrement des nodules des plantes à partir de système racinaire.

## **III. Caractérisation préliminaire des isolats**

### **III.1. Coloration du Gram**

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupe Gram positif et Gram négatif (Tortora., 2003).

-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.

- Le violet est éliminé avec le Lugol et laissé agir pendant 30 secondes.

- Après un lavage à l'alcool-acétone, le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau.

- 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.

## **IV. Test biochimique**

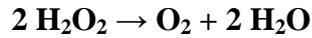
### **IV.1.Recherche catalase**

L'oxydase ou le cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaines respiratoires cytochromique bactériennes.

A l'aide d'une anse platine, une colonie est déposée sur un disque. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Camille, 2006).

#### IV.2. Test de la catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase : enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Prendre une lame porte objet propre .déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose.

Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase+ (Camille, 2006).

#### V. Etude de la tolérance des souches aux métaux lourds

Le test a été réalisé sur milieu solide YMA. Il permet d'étudier la capacité des souches à croître et à résister aux métaux lourds.

Les métaux lourds utilisés ainsi que leurs concentrations sont choisis selon des études faites Par El-Hilali (2006) et Abou Shanab et *al*, (2007). 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 ( $\text{Pb (OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$ ): 30 mg/ml.

Sulfate de cadmium ( $3 \text{ CdSO}_4, 8 \text{ H}_2\text{O}$ ): 10mg/ml.

Chlorure de mercure ( $\text{HgCl}$ ): 200mg/ml.

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

A partir des solutions mères (initiales) de sels de métaux lourds, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés à un volume de la gélose YMA (annexe I), pour avoir un volume final de 100 ml. Les concentrations et les volumes nécessaires pour la préparation des différents milieux YMA additionnés de métaux lourds à différentes concentrations est donné en annexe IV, étant donné que la concentration de la solution mère des différents métaux lourds est donnée en annexe III.

On préparer deux boites de Pétri du chaque concentration des métaux lourds et on fait ensemencement en spot à partir des souches.

Après incubation à 28°C pendant 6 jours, la présence ou l'absence de croissance est notée pour chaque souche à chaque concentration de métaux.

**Chapitre 4**  
**RESULTAT ET**  
**DISCUSSION**

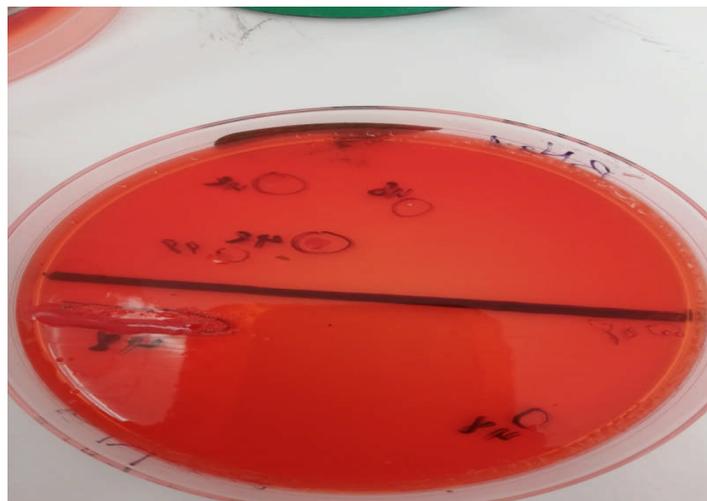
## I. Caractère culturaux

### I-1- Croissance sur YMA+ Rouge Congo

Cette étude a concerné 7 souches provenant de différentes origines (ML2 ; ML22 ; TN1.4 ; TN2.1 ; TN4.3 isolées de la légumineuse *Melilotus indicus* des palmeraies de Touggourt et les isolats BN3.1 ; BN4.2 obtenus des plantes de *Vicia faba* de la région de Biskra).

La croissance des sept souches sur le milieu YMA additionné de rouge de Congo est détectable après 48h d'incubation, les souches ML2 ; ML22 ; BN3.1 ; BN4.2 ; TN1.4 ; TN2.1 ; TN4.3 donnent des colonies lisses, visqueuses.

Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le rouge de Congo. Cette observation est commune chez la majorité des *rhizobia* (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).



**Figure 1.** L'aspect des colonies de *Rhizobia* sur le milieu YMA+Rouge Congo.

## II. Résultat de la caractérisation symbiotique des isolats (test de nodulation)

L'objectif de ce test vise à déterminer la capacité des isolats à noduler leur plantes d'origine (test d'authentification avec les plantes *Melilotus indicus* et *Vicia faba*) et leur aptitude à noduler d'autres plantes comme *Medicago sativa*, et *Lens culinaris*.

D'abord, concernant les essais de germination, les résultats montrent un taux de germination nul pour les graines de la luzerne (*Medicago*), ce résultat peut être dû à la qualité ou l'âge des graines utilisées pour le test.

En d'autre part, les graines de mélilot (*Melilotus*) et de lentille (*Lens*) ont montrées un taux de germination très élevé, mais toutes les graines germées meurent après plantation directement.

Alors que les graines de fève (*Vicia*) montrent un taux de germination faible avec pourriture rapide des graines germées.

Ces résultats peuvent être causés par plusieurs facteurs tels que la température de germination et de croissance et la composition de la solution d'arrosage.

En générale, l'implantation des cultures des légumineuses se fait dans la période de printemps (20 mars au 15 mai), sous climat méditerranéen qui se caractérise par une température compris entre 10 et 25°C (Mazoyer M. et al. 2002) alors que notre travail est réalisé au période de printemps de la région de Biskra caractérisée par une température plus élevée. Ces conditions ont conduit à la pourriture de la plus part des graines soit pendant la germination ou après leur plantation.

Par ailleurs, le manque de quelques composants de la solution d'arrosage ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) qui sont importants et nécessaire pour la nutrition et la croissance des plantes a contribué à la mort des jeune plantules en croissance.

Les éléments traces (comme Mo ; Mn et le Co) sont fréquemment classifiés selon leur importance vis-à-vis de la croissance des plantes, soit comme éléments essentiels (micronutriments), dont leur absence gêne la croissance des plantes, soit comme éléments toxiques.

Ces éléments sont indispensables pour la croissance aussi bien des rhizobiums que de leurs plantes hôtes (El-Hilali2006).

Tous ces facteurs ont participé à l'inhibition de la réussite du test de nodulation.

### **III. Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **III.1. Résultat de la coloration du Gram**

La coloration de Gram et l'observation microscopique révèlent que les souches étudiées ML2 ; ML22 ; BN3.1 ; BN4.2 ; TN1.4 ; TN2.1 ; TN4.3 sont des bactéries sous forme des courts bacilles à Gram négatifs (couleur rose).

Vincent (1970) ; Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1985) rapportent que les *rhizobia* sont des bactéries à Gram négatif de forme des bacilles.



**Figure 2.** Observation microscopique de la bactérie x 100.

### III.2. Test biochimique

#### III.2.1. Recherche de la catalase

Tous les isolats montrent un résultat positif, alors il y a un dégagement d'oxygène gazeux issu de la dégradation de l'eau oxygénée, sauf que ML8 et ML22 sont négatives li n'y a pas la dégradation de l'eau oxygénée .Tableau 2

#### III.2.2. Recherche d'oxydase

Les résultats obtenus du test d'oxydase montrent que toutes les souches sont oxydase positive. C'est-à-dire que ces bactéries possèdent une enzyme dans la chaîne respiratoire cytochromique bactérienne. Tableau 2

**Tableau 2.** Résultats des souches au test de Catalase et Oxydase

Souches	ML8	ML22	BN3.1	BN4.2	TN1.4	TN2.1	TN4.3
Catalase (+/-)	-	-	+	+	+	+	+
Oxydase (+/-)	+	+	+	+	+	+	+

#### IV. Etude de la croissance des souches en présence des métaux lourds

Les résultats de l'étude de la croissance des différentes souches en présence de Cinq (5) métaux lourds sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.** Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds.

Souches		ML8	ML22	BN3 .1	BN4.2	TN 1.4	TN2.1	TN4.3
Métaux lourds (µg /ml)								
Zn	50	++	++	++	++	++	++	++
	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+
CU	12,5	++	++	++	++	++	++	++
	25	+	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+	+
Pb	50	++	++	++	++	++	++	++
	100	+	+	+	+	+	++	++
	200	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+
Hgcl	50	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-	-	-
Cr2	50	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+

+++ : Très bonnes croissance ++ : Bonne croissance + : Faible croissance

- : Absence de croissance

Ces résultats montrent que la plupart des souches se développe en présence de faibles concentrations de métaux lourds. Leur croissance diffère en fonction de l'élément et de la concentration considérée.

En présence du zinc, la plupart des souches croît jusqu'à la concentration de 400 µg/ml, tous les souches développent dans toutes les concentrations testées.

Pour le cuivre aussi tous les souches développent sur toutes les concentrations testées.

D'après ces résultats, nous constatons que la plupart des souches croît en présence du plomb et du bichromate de potassium, avec des concentrations 50 µg/ml jusqu'à 400 µg/ml pour le plomb, et des concentrations 50µg/ml à 100µg/ml.

Concernant le chlorure de mercure, les souches ne présentent aucune croissance sur les différentes concentrations testées.

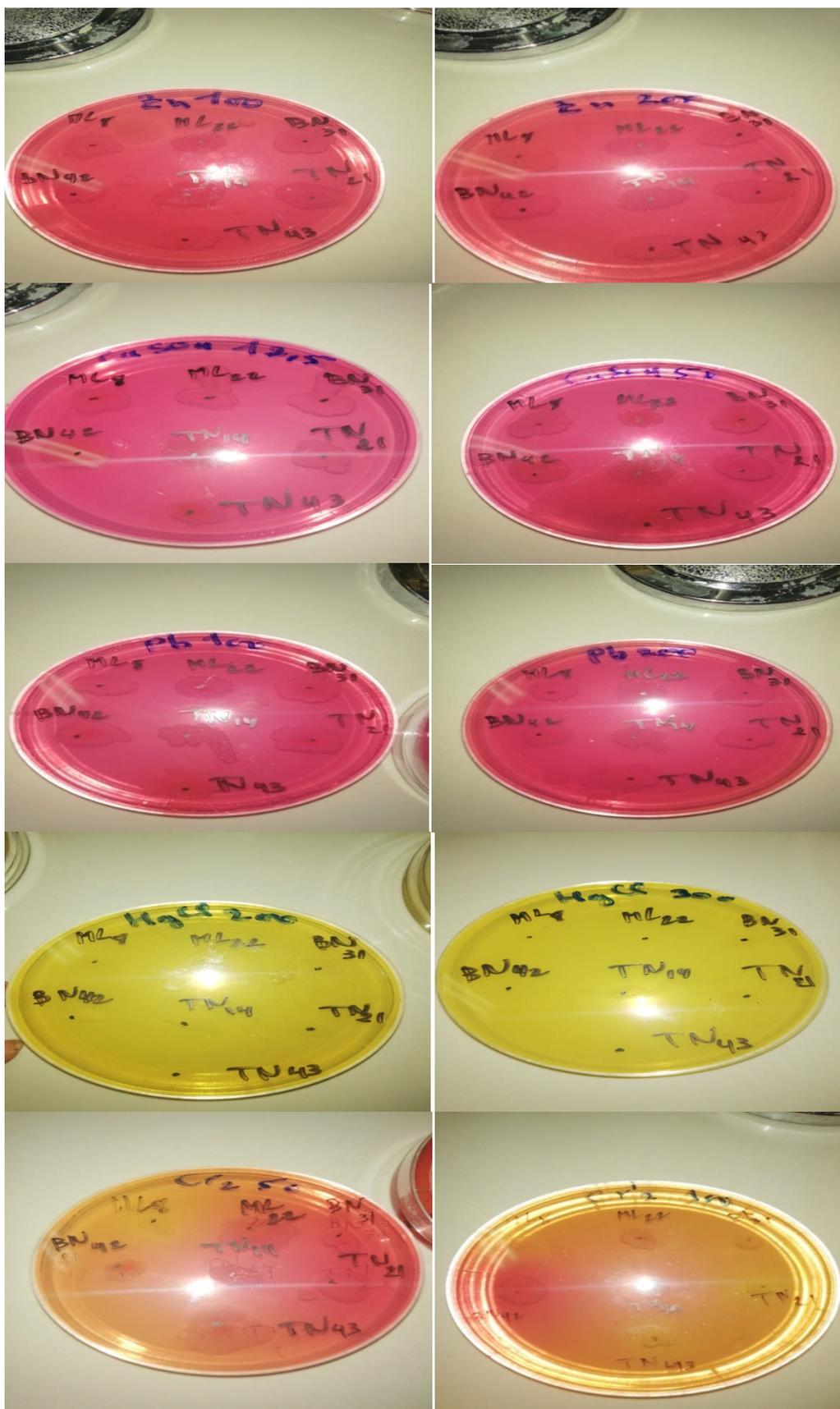
Ces résultats indiquent que nos souches possèdent une forte tolérance vis-à-vis de la majorité des métaux lourds, ils sont en accord avec les travaux de El-Hilali (2006) ; Abou Shanab et al, (2007) ; Roba (2016) et Ziribi et al. (2015).

Les éléments comme, Cr, Hg, Pb, et le Zn sont généralement présents dans le sol en faibles concentrations mais celles-ci peuvent augmenter à cause de processus naturels et des activités humaines comme la combustion de combustibles fossiles, l'exploitation minière, les engrais chimiques, les pratiques agricoles. Zribi et al, (2015) ont montré que la tolérance des rhizobia aux métaux lourds peut varier entre les individus au sein d'une même espèce.

Il a été rapporté aussi que les *rhizobia* étaient capables de résister à de fortes concentrations en différents métaux lourds grâce à la synthèse intracellulaire de biomolécules (polysaccharides, thiols et acides organiques) capables de séquestrer ces éléments et ainsi de limiter sa toxicité et les dommages éventuels (Peirera et al. 2006 ; Chaintreuil et al. 2007 ; Roba. 2016). De plus, les auteurs ont aussi mis en évidence la production extracellulaire de Lipo Polysaccharides de Surface (LPS) pour immobiliser les métaux sur la paroi cellulaire et limiter alors son entrée dans la cellule (Roba. 2016).

L'identification et la sélection de couples symbiotiques *Rhizobium*-légumineuse résistants aux métaux lourds peut constituer un moyen très efficace pour palier l'écotoxicologie des sols contaminés (El Hilali. 2006).

Un exemple de résultats de croissances des souches en présence des différents métaux lourds est présenté dans la figure 4:



**Figure 4.** Exemple de résultats de croissances des souches en présence de différents métaux lourds.

On peut noter qu'en présence du zinc, la plupart des souches croît jusqu'à la concentration de 400 µg/ml, toutes les souches se développent sur toutes les concentrations testées.

Pour le cuivre aussi, la totalité des souches sont capables de pousser sur les différentes concentrations testées.

Nos résultats, indiquent aussi que les sept souches croissent en présence du plomb et du bichromate de potassium, avec des concentrations de 50 µg/ml jusqu'à 400 µg/ml pour le plomb, et des concentrations 50µg/ml et 100µg/ml de du bichromate.

Concernant le chlorure de mercure, les souches ne présentent aucune croissance sur les différentes concentrations testées.

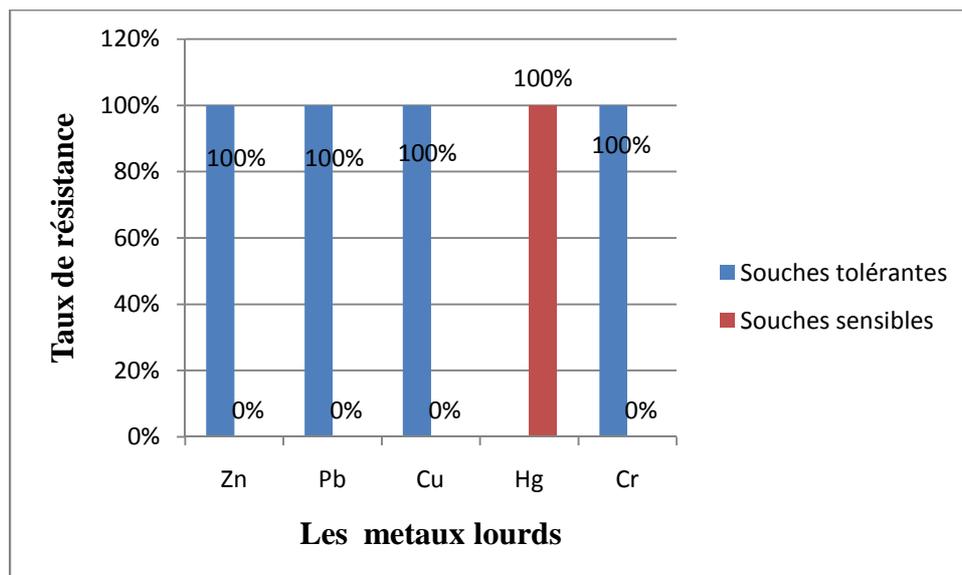
Les taux de résistance et de sensibilité des différentes souches aux métaux lourds sont présentés dans la figure 4 :

La plus forte résistance est observée dans le cas du zinc, plombe, cuivre et chrome, la majorité des souches ont résisté aux différentes concentrations. Les fréquences de résistance aux ions métalliques testés sont comme suit : Zn = 100%, Pb = 100%, Cu =100% Hg= 0%, Cr =100%,

Le mercure est le plus toxique pour les souches étudiées, sa présence inhibe la croissance de la totalité des souches. L'ordre de toxicité des métaux a été jugé selon les résultats obtenus comme suit : Hg> Cr> Cu > Pb > Zn.

Le pourcentage de résistance obtenu (figure 5) dans le cas du Zn (100%) du Pb (100%), sont similaire à ceux rapporté par Abou-Shanab et al. (2007), alors que les pourcentages de résistance obtenus dans le cas du Cuivre (100%) et Chromer (100%) sont supérieur à ceux rapportés par Abou-Shanab et al. (2007) qui ont rapporté des taux de résistance de Cu (98%) et Cr (53%).

Angel et *al.*, (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de Rhizobia à croissance lente sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'elles ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement.



**Figure 5.** Taux de résistance des souches étudiées *vis-à-vis* des métaux lourds.

Ces résultats indiquent que nos souches possèdent une forte tolérance vis-à-vis de la majorité des métaux lourds testés. Ils sont en accord avec les travaux de El-Hilali (2006) ; Abou Shanab et *al*, (2007) ; Roba (2016) et Ziribi et al. (2015).

Les éléments comme Cd, Cr, Hg, Pb, et le Zn sont généralement présents dans le sol en faibles concentrations mais celles-ci peuvent augmenter à cause de processus naturels et des activités humaines comme la combustion de combustibles fossiles, les engrais chimiques et les pratiques agricoles. Ziribi et al, (2015) ont montré que la tolérance des *rhizobia* aux métaux lourds peut varier entre les individus au sein d'une même espèce.

Il a été rapporté aussi que les *rhizobia* étaient capables de résister à de fortes concentrations en différents métaux lourds grâce à la synthèse intracellulaire de biomolécules (polysaccharides, thiols et acides organiques) capables de séquestrer ces éléments et ainsi de limiter sa toxicité et les dommages éventuels (Peirera et al. 2006 ; Chaintreuil et al. 2007 ; Roba. 2016). De plus, les chercheurs ont aussi mis en évidence la production extracellulaire de Lipo Polysaccharides de Surface (LPS) pour immobiliser les métaux sur la paroi cellulaire et limiter alors son entrée dans la cellule (Roba. 2016).

L'identification et la sélection de couples symbiotiques *Rhizobium-légumineuse* résistants aux métaux lourds peut constituer un moyen très efficace pour palier l'écotoxicologie des sols contaminés (El Hilali. 2006).

# **Conclusion**

## Conclusion

Dans ce travail, nous avons essayé d'étudier la symbiose entre sept souches de *rhizobia* avec quatre types de légumineuses la fève et la luzerne, la lentille et méteilots. Les quatre plantes ont été choisies pour leur importance économique, socio-économique et écologique.

Au terme de cette étude, on retiendra que :

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'examen microscopique et l'aspect des colonies apparues après environ 72 h d'incubation à 28°C a montré que ces isolats ont les caractères des *rhizobia* à croissance rapide en fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA.

Cette étude nous permet de décrire quelques paramètres à savoir les caractères morphologiques des colonies et les caractères biochimiques réalisés par teste d'oxydase et de catalase.

Les résultats du test de nodulation nous permettent de déduire l'importance des micronutriments comme Mo ; Mn et le Co dans la solution nutritive pour la croissance des plantes.

L'étude de l'impact de 5 métaux lourds sur la croissance des sept souches a été réalisée sur milieux solides (YMA). Les résultats obtenus ont montré la présence de différents niveaux de tolérance chez les *rhizobia* étudiés vis-à-vis de ces métaux. La plus forte résistance est observée dans le cas du zinc, plombe, cuivre et chrome dont la majorité des souches ont résisté aux différentes concentrations. Nous avons trouvé que l'ensemble des souches ne résistent pas au mercure qui est le plus toxique pour les souches étudiées, sa présence inhibe la croissance de la totalité des souches.

Enfin, comme perspective de notre recherche, il serait souhaitable :

- Réétudier les caractères symbiotiques des souches en respectant les conditions favorables pour la réussite de l'étude.
- Etudier le comportement des *rhizobia* en présence d'autre type des métaux lourds.

# **Références**

# **Bibliographiques**

**Références bibliographiques**

- Abdel-Ghafar A S (1989)** Aspect of Microbial Activities and Dinitrogen Fixation in Egyptian Desert Soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 3: p281-294.
- Abou-Shanab, R.A.I., Van Berkum, P., Angle, J.S. (2007).** 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*. *Chem.* 68, 360-367.
- Alkama N., Noureddine N.E., Haddadj A., Sadji H., Issad S., Amrani S., 2002.** La pratique de l'inoculation en agriculture et en foresterie : une biotechnologie à notre portée communication orale présentée au 2eme congrès de Biotechnologie. Tunisie.
- Amarger N., 2001.** Rhizobia in the Field. In: Sparks D.L. (Ed): *Advances in Agronomy*. Academic Press. 73: 109-136.
- Angel, J.S., Mc Grath, S.P., Chaudri, A.M., Chaney, R.L et Giller, K. E. (1993).** Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. *S Biol Biochem.* 25, 575-580.
- Camille D. 2006.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 2ème édition, TEC et DOC, p.15.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J. (2005).** Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyritemine. *Soil. Biol. and Biochem.* 37, 1131-1140.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999.** Les arbres fixateurs de l'azote: caractéristiques fondamentales et role dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulier aux zones subhumides et arides. Ed. CIRAD, Editions Espaces, FAO, IR. Montpellier. France. p499.

- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. Quae. Paris. 383p.
- El-Hilali, I. (2006).** La symbiose *Rhizobium*-LUPIN : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université du Rabat. 206p.
- Franche C, Lindström K. and Elmerich C (2009)** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: p35–59.
- Graham P.H., 2008.** Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth M.J, James E.K., Sprent J.,L., Newton W.E.(Eds): Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Springer, p23-43.
- Jordan D.C. (1984).** *Rhizobiaceae*. In :*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N. R.,Holt J. G. Vol: 1. Ed. Williams and Wilkins. ISBN. 10: 0-387-24145-0. Baltimore. pp. 234 – 245.
- Jordan D C (1984)** *Rhizobiaceae*. In: Krieg N R, Holt J G (Eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Baltimore, p: 234-242.
- Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R., 1996.** Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. Paris. 1072p.
- Jeder H., Akrimi M., Zouaghi M., De layudie P., Gillis M., Zaafouri M.S., 2003.** Diversité des rhizobia associés aux légumineuses pastorales des régions arides de la Tunisie. In: Drevon J.J. et Sifi B. (Eds): Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. INRA. Paris. Les colloques n°100. 163-172.
- Jordan D.C. (1984).** *Rhizobiaceae*. In :*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N. R.,Holt J. G. Vol: 1. Ed. Williams and Wilkins. ISBN. 10: 0-387-24145-0. Baltimore. pp. 234 – 245.
- Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R., 1996. Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. Paris. 1072p.
- Krichnan H.B. et Bennett J.O., 2007.** Rhizobia that are important for nodulation. In: Gnananickam S.S. (Ed): *Plant-Associated Bacteria*. Springer. pp 25-75.

- Luttge G., Pienaar B.J., Braune K, Perrino P., 1994.** Collecting with Vigna in Nata and Transvaal (South Africa). Plant Genetic Ressources Newsletter. pp. 21-23
- Mazoyer M. et al.** Légumineuses. In : Larousse agricole. Edition : 2002. France.
- Madigan M et Martinko, 2007.** Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris. 1047p.
- 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. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II
- Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C., 2009.** Environmental microbiology. Ed. Academic Press. 598p.
- Messaili B., 1995.** Systématique des spermaphytes. Ed. Office de publication universitaires. Alger. p91.
- Martensson A. M. et Witter E. (1990).** Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil micro-organisms in long-term field experiment, with special reference to sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 22 (7): 977-982.
- Pier-Anne, B. (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 Doctorat. Université de Sherbrooke
- Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S., 2003.** Biologie végétale. Ed. De Boeck université. Paris. 968p.
- Rother J.A., Millbant J.W., et Thornton T. (1983).** Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) in grasslands on soil contaminated with cadmium, lead and zinc. J. Soil Sei. 34: 127-136
- Roba Mohamad.** Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuses métallophiles : effets des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobia symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*. Interactions entre organismes. Université Montpellier, 2016.

- Rose M.R. et Mueller L.D., 2006.** Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693p.
- Rigaud J, Puppo A (1975).** Indole 3-acetic acid catabolism by soybean bactéroïdes. J Gen Microbiol 88:223-228.
- Sadowsky M.J., et Graham P.H., 2006.** Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin M et Falkou S. (Eds): the prokaryotes: ecophysiology and biochemistry. Springer. pp 817-841
- Somasegaran P., Hoben H.J. (1994).** Hand book for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.
- Somasegaran P, Hoben H G (1985)** Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development (USAID).
- Stougaard, J., 2000.** Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. Plant Physiology 124 :p 531–540.
- Serraj R, Adu-Gyamfi J, Rupela O P, Drevon J J (2004)** Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. In: Serraj R (ed) International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Oxford and IBH Publishing, pp 67–97
- Sprent J.I., 2001.** Nodulation in legumes. Dickerson (Eds). Royal botanical garden. Kew. united Kingdom. 364p.
- Tortora, G.J., Funk, B.R. et Case, C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Eddition du Renouveau Pédagogique Inc. 945 p.
- Vincent, J.M., (1970)** .A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Vilain M., 1997.** La production végétale : les composantes de la production. Ed. TEC et DOC. 478p.
- Wang, Q.R., Cui, Y.S., Liu, X.M., Dong, Y.T., Christie, P. (2003).** Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. J. Environ. Scien. Health Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng. 38, 823-838

**Wery, J. (1985).** Relation entre la nutrition azote et la production chez les légumineuses. *In:* nutrition azotée des légumineuses. Ed. INRA, Paris. 213p.

**Zribi, K., Nouairi, I., Slama, I., Talbi-Zribi, O., and Mhadhbi, H. 2015.** Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti symbiosis promotes the bioaccumulation of zinc in nodulated roots. International journal of phytoremediation 17. 1: 49-55.

**Zahran, H.H. 2001.** Rhizobia from Wild Legumes: Diversity, Taxonomy, Ecology, Nitrogen Fixation and Biotechnology. Journal of Biotechnology 91: 143-153.

# **Annexe**

## Annexes

**ANNEXE1 : Composition des milieux de culture.****Composition du milieu : Yeast-mannitol-agar (YMA) (Vincent, 1970)**

Mannitol 10.0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 gMgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O 0.2 g

Na Cl 0.1 g

Extrait de levure 0.5 g

L'eau distillé 1000ml

PH 6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

**Composition du milieu : Yeast-mannitol-broth (YMB) (Vincent, 1970)**

Mannitol.....10g

Extrait de levure.....0,35g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0,5gMgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O..... 0,2g

NaCl..... 0,1g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

Ajuster le pH à 6,8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

**Composition de la solution du Rouge Congo (RC)**

Rouge Congo 0,25 g

Eau distillée 100 ml

**Annexe II: Composition de la solution de Rigaud et Puppo (1975)**

Solution	Le composant	La quantité
<b>Solution I</b> <b>(Pour 100ml)</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04 g
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2 g
	KCl	2,01 g
	CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,2 g
	CoCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,2 g

<b>Solution II (pour 100 ml)</b>	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,8 mg
<b>Solution III (pour 100ml)</b>	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	1,875 g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,35 g

Pour la préparation d'un litre de solution d'arrosage: on ajoute 10 ml de la solution I, 1 ml de la solution II et 144  $\mu\text{l}$  de la solution III à un litre d'eau distillée stérile.

### Annexe III : Méthode de calcul de la solution mère (exemple de zinc)

$$\text{MM ZnSO}_4 = 65,4 + 32,1 + 64 = 161,5 \text{ g/mol}$$

$$\text{MM Zn} = 65,4 \text{ g/mol}$$

$$\begin{array}{l} 161,5 \text{ g/mol} \longrightarrow 100 \% \\ 65,4 \text{ g/mol} \longrightarrow X \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} 161,5 \text{ g/mol} \\ 65,4 \text{ g/mol} \end{array}} \right\} X = 40,495 \%$$

Préparation de la solution initiale :

$$C = 100 \text{ mg/ml}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g ZnSO}_4 \longrightarrow 0,404 \text{ g Zn} \\ X \longrightarrow 0,1 \text{ g} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1 \text{ g ZnSO}_4 \\ X \end{array}} \right\} X = 0,247 \text{ g}$$

Pour 10 ml on mesure 2,47 g

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \Longrightarrow \quad C_2 = \frac{25 \times 10^{-6} \times 100}{100 \times 10^{-3}}$$

$$C_2 = 0,025 \text{ ml}$$

$$C_2 = 25 \mu\text{l}$$

**Annexe IV:** Préparation des concentrations en sels de métaux lourds pour les tests faits sur le milieu YMA

**Sulfate de zinc (ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O) : 100mg/ml**

[Zn <sup>2+</sup> ]	25	50	100	200	400	800
VSM (ml)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
VMA (ml)	99,975	99,95	99,90	99,80	99,60	99,20

**VSM :** Volume de la solution mère **VMA :** Volume en milieu YMA

**Sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O) : 50mg/ml**

[Cu <sup>2+</sup> ]	12,5	25	50	100	200	400
VSM (ml)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
VMA (ml)	99,975	99,95	99,9	99,8	99,6	99,2

**Chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) : 5mg/ml**

[Hg <sup>2+</sup> ]	50	100	200	300	400	500
VSM (ml)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
VMA (ml)	99,75	99,5	99	98,5	98	97,5

**Acétate de plomb (Pb (OOCCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3H<sub>2</sub>O) : 30mg/ml**

[Pb <sup>2+</sup> ]	25	50	100	200	400	800
VSM (ml)	0,083	0,166	0,333	0,666	1,333	2,666
VMA (ml)	99,917	99,833	99,667	99,334	98,667	97,334

**Chromate de potassium (CrK<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) : 200mg/ml**

[Cr <sup>2+</sup> ]	50	100	200	300	400	500
VSM (ml)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
VMA (ml)	99,975	99,95	99,9	99,8	99,6	99,2

## ملخص

البقوليات تأسس تفاعل تكافلي مع بكتيريا الأرض لأسرة الريزوبيا لهذا قمنا باختبار العقيدات. تتعلق الدراسة المظهرية للسلاسل تحمل الخصائص المورفولوجية والثقافية ، والمقاومة الجوهرية للمعادن الثقيلة. في الوسط الصلب بوجود تراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة. النتائج التي تم الحصول عليها تبرز مقاومة وحساسية السلاسل تجاه المعادن الثقيلة. الكلمات المفتاحية: الريزوبيا, الخصائص المورفولوجية, المعادن الثقيلة .

## Résumé

Les légumineuses établissant une interaction symbiotique avec une bactérie tellurique de la famille des *Rhizobiacées*. pour cela on fait un test de nodulation. L'étude phénotypique des souches porte sur les caractères morphologiques et culturaux, la résistance intrinsèque aux métaux lourds aux concentrations en milieu solide en présence de différentes concentrations des métaux lourds.

Les résultats obtenus font ressortir la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis des métaux lourds.

**Mots clés :** *rhizobia*, caractères phénotypique, métaux lourds.

## Abstract

Legumes establishing a symbiotic interaction with a telluric bacterium of the family *Rhizobiaceae*. for this we do a nodulation test. The phenotypic study of the strains relates to the morphological and cultural characters, the intrinsic resistance to heavy metals at concentrations in solid medium in the presence of different concentrations of heavy metals.

The results obtained highlight the resistance and the sensitivity of the strains towards heavy metals.

**Key words:** *rhizobia*, phenotypic characters, heavy metals.

