



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 appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Sondous KIRAM**

Le : mardi 9 juillet 2019

### Thème

**Caractérisation des bactéries associées aux  
nodules de la légumineuse Astragalus de la  
région de Biskra**

---

#### Jury :

Mme. DJOOUAMA Manel	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. MOKRANI Djamila	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. BABA ARBI Souad	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

# **Remerciement**

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

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur M<sup>me</sup> MOKRANI Djamilia pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger travail, pour ses recommandations et ses conseils qui ont beaucoup enrichi mon travail.*

*Nous voudrions également exprimer nos gratitudes à tous les ingénieurs de laboratoire et aussi l'équipe de la bibliothèque*

*Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail. Mes amis de la faculté en général et de la 2<sup>ème</sup> année Master Microbiologie Fondamentale et Appliqué 2019 en particulier pour leur soutien moral et leur inspiration*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, prunelles de mes yeux,*

*J'espère leur inspirer joie et fierté.*

*Mes sœurs*

*Mes frères*

*Ma famille*

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

*Sondous*

# Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	

## Partie 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### chapitre 1 : GENERALITE

1.1 Le cycle d'azote.....	3
1.2. Fixation biologique de l'Azote (FBA).....	4

### Chapitre 2 : LA SYMBIOSE LEGUMINEUSE-RHIZOBIA

2.1 Mécanisme de la symbiose .....	6
2.2. Mécanisme de la nodulation .....	6
2.2.1. Partie bactérienne : BNL.....	7
2.2.2. Partie végétale : La famille de Fabaceae.....	7
2.3. Le genre <i>Astragalus</i> .....	10
<i>Astragalus gombo</i> .....	10
<i>Astragalus maréoticus</i> .....	10
<i>Astragalus armatus</i> .....	10
<i>Astragalus cruciatus</i> .....	10
2.4. Utilisations thérapeutiques : .....	11

## Partie 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

### Chapitre 3 : MATERIEL ET METHODES

3 .1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	12
3.1.1. Source des isolats .....	12
3.1.2. Stérilisation des nodules et Isolement des souches à partir des nodules.....	13
3.2. Caractères morphologiques et culturaux .....	13
3.2.1. Préparation de milieu de culture .....	13
3.2.2. Purification des isolats .....	14

3.2.3. Conservation des souches .....	14
3.3. Examen microscopique.....	15
3.3.1. Coloration de Gram.....	15
3.4. Caractérisation phénotypique des isolats.....	15
3.4.1. La résistance intrinsèque aux antibiotiques .....	15
3.4.2. La sensibilité aux métaux lourds.....	16
3.4.3. Caractérisation des isolats : la galerie API20 E .....	16
3.5. Effet de la température .....	18
3.6. Effet de l'herbicide .....	18
3.6.1. En milieu solide .....	19
3.6.2. En milieu liquide.....	19

#### Chapitre 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractérisation morphologique et culturaux.....	20
4.1.1. Isolement et identifications .....	20
4.1.2. Croissance des isolats sur milieu YMA .....	20
4.1.3. Coloration de Gram.....	21
4.1.4. La sensibilité des antibiotiques .....	21
4.1.5. La sensibilité des métaux lourds .....	22
4.1.6. Galerie API20E : .....	23
4.1.7. Effet de la température.....	27
4.1.8. Effet de l'herbicide .....	30
<b>Conclusion</b> .....	39
<b>Bibliographie</b> .....	41
Annexes	
Résumé	

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Quelques espèces des légumineuses .....	9
<b>Tableau 2:</b> Solution d'antibiotiques utilisés .....	16
<b>Tableau 3:</b> Concentrations et les solvants des métaux utilisés .....	16
<b>Tableau 4 :</b> Intervalle des concentrations minimales inhibitrices des métaux lourdes .....	22
<b>Tableau 5:</b> Identification des isolats en utilisant système l'API 20 E .....	23
<b>Tableau 6 :</b> Effet de Roundup sur la croissance des isolats .....	31

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Cycle d'azote (site web1).....	4
<b>Figure 2 :</b> Les étapes de la nodulation (site web 2).....	7
<b>Figure 3 :</b> Localisation géographique des zones de prélèvement dans la région de Biskra (Site.....	13
<b>Figure 4 :</b> Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).....	14
<b>Figure 5 :</b> Inoculation de pré culture dans les puis de galerie API 20E (photo original).....	18
<b>Figure 6 :</b> Morphologie et la croissance les colonies des isolats sur YMA (photo.....	20
<b>Figure 7 :</b> Effet de différents antibiotiques sur la croissance des souches .....	22
<b>Figure 8 :</b> Identification des isolats en utilisant système l'API 20E (photo original).....	27
<b>Figure 9 :</b> Effet de la température de 37°C sur les isolats .....	28
Figure 10 : Effet de la température 40°C sur les isolats .....	29
<b>Figure 11:</b> Effet de la température 45°C sur les isolats.....	30
<b>Figure 12 :</b> Effet de Roundup à 25 mg /ml (photo originale).....	32
<b>Figure 13 :</b> Effet de Roundup à 50 mg /ml.....	33
<b>Figure 14 :</b> Effet de Roundup à 100 mg /ml (photo originale).....	33
<b>Figure 15 :</b> Courbe de croissance de la souche MB10 .....	35
<b>Figure 16 :</b> Courbe de croissance de la souche F16 .....	35
<b>Figure 17 :</b> Courbe de croissance de la souche GB15 .....	36
<b>Figure 18 :</b> Courbe de croissance de la souche GR12.....	36
<b>Figure 19 :</b> Courbe de croissance de la souche K24.....	37
<b>Figure 20 :</b> Courbe de croissance de la souche C45.....	37
<b>Figure 21 :</b> Courbe de croissance de la souche MH6.....	38
<b>Figure 22 :</b> Courbe de croissance de la souche CK4.....	38

# Liste des abréviations

A : *Astragalus*.

BNL : bactéries nodulant les Légumineuses.

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de Calcium.

CaCO<sub>3</sub> : Carbonate de Calcium.

CIT : Citrate

GEL : Gélatinase

GLU : Glucose

H : Heure

H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène

HgCl<sub>2</sub> : Chlorure de mercure.

IND : Indole

INO : Inositol

LDC : Lysine décarboxylase

MAN : Mannitol

MEL : Melibiose

MNA : Mannitol Nitrate Agar

MNB : Mannitol Nitrate Broth

N<sub>2</sub> : Azote atmosphérique.

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside

RHA : Rhamnose

SAC : Saccharose

SOR : Sorbitol

TDA : Tryptophane désaminas

URE : Uréase

VP : Pyruvate de sodium

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol Broth .

ZnCl<sub>2</sub> : Chlorure de Zinc

# Introduction

### Introduction

Le sol constitue un support pour différents cycles d'échanges d'énergie et de transfert de substances entre les différentes entités qui l'abritent. Un des cycles les plus importants est le cycle de l'azote. La fixation biologique de l'azote ( $N_2$ ) s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia, parce que ces associations ont le plus grand impact quantitatif sur ce cycle. Il existe approximativement 700 genres et 13000 espèces de légumineuses, mais seule une portion de 20% qui constitue les légumineuses d'importance agricole a été étudiée (EL-Hilali, 2006).

Les symbioses végétales sont une composante fondamentale de la stabilité et de la durabilité des écosystèmes. L'introduction des légumineuses, associées à leurs auxiliaires microbiens fixateurs d'azote améliore la biodisponibilité d'éléments nutritifs, dans des sites dégradés fortement appauvris en éléments nutritifs, Elle consiste une condition primordiale pour réussir l'installation de plantes en milieu particulièrement contraignant, comme le sont les sites de carrière de calcaire après exploitation sous climat méditerranéen. (Brunel *et al.*, 2007)

Les légumineuses figurent parmi les dons de la nature les plus abondants et les plus précieux. Elles fournissent un nombre important de produits et améliorent la fertilité des sols. Ces produits sont les principales sources, de protéines pour la plupart des pauvres à travers le monde, à l'huile végétale, au fourrage et bois combustible. Elles améliorent aussi la fertilité des sols grâce à leur capacité de fixer l'azote ( Dekak , 2010).

Le genre *Astragalus* de la famille des Fabacées comprend plus de 1500 espèces dont la plupart se répartissent en Orient. Une cinquantaine d'espèces sont retrouvées en Afrique du Nord et quinze environ au Sahara (Teyeb *et al.*, 2012).

Les rhizobia , deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air.

Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte. Cette symbiose rhizobia-Légumineuse (actuellement dénommée Symbiose Légumineuse- bactéries nodulant les légumineuses (BNL) fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable (Sebihi , 2008 ).

Dans le cadre de la recherche de couples symbiotiques légumineuse-rhizobia efficaces, pour la réhabilitation des écosystèmes appauvris et dégradés, l'identification et la caractérisation de la bactérie symbiotique (rhizobia) constitue un préalable à toute application. D'un point de vue taxonomique, les rhizobia sont diversifiés avec près de 6 genres décrites à ce jour, appartenant aux sous classes Alpha, Bêta et Gamma des Protéobactéries (N'zoué *et al.*, 2006)

L'objectif de notre travail est de réaliser la caractérisation phénotypique des bactéries associées aux nodules d'*Astragalus* récolté des différentes régions de Biskra. Notre travail est constitué de 4 chapitres :

Le premier chapitre comporte des généralités sur l'azote, le cycle d'azote et la fixation biologique d'azote.

Le deuxième chapitre, comporte les deux éléments de la symbiose légumineuses-BNL, les étapes de nodulation ainsi que les utilisations thérapeutiques de l'*Astragalus*.

Le troisième chapitre : matériel et méthodes, comprenant les tests de galerie API 20E, la sensibilité des souches aux antibiotiques, la résistance intrinsèque des souches aux différents métaux lourds et l'effet de l'herbicide(Rhoundup).

Le quatrième chapitre comprenant les résultats et discussions, conclusion et perspectives.

Partie I :

Synthèse bibliographique

# Chapitre 1 : Généralités

## 1.1.Le cycle d'azote

Dans le cycle de l'azote (Figure 1), les transformations microbiennes, des composés azotés les plus importantes pour la production végétale, concernent l'équilibre entre formes assimilables et formes non assimilables par la plante (minéralisation de l'azote organique, immobilisation de l'azote minéral)

Les apports d'azote sont assurés par fixation biologique d'azote moléculaire ; et les exportations ou pertes par nitrification-dénitrification et volatilisation de l'ammoniaque. (Roger *et al.*, 1996 )

### a.Ammonification

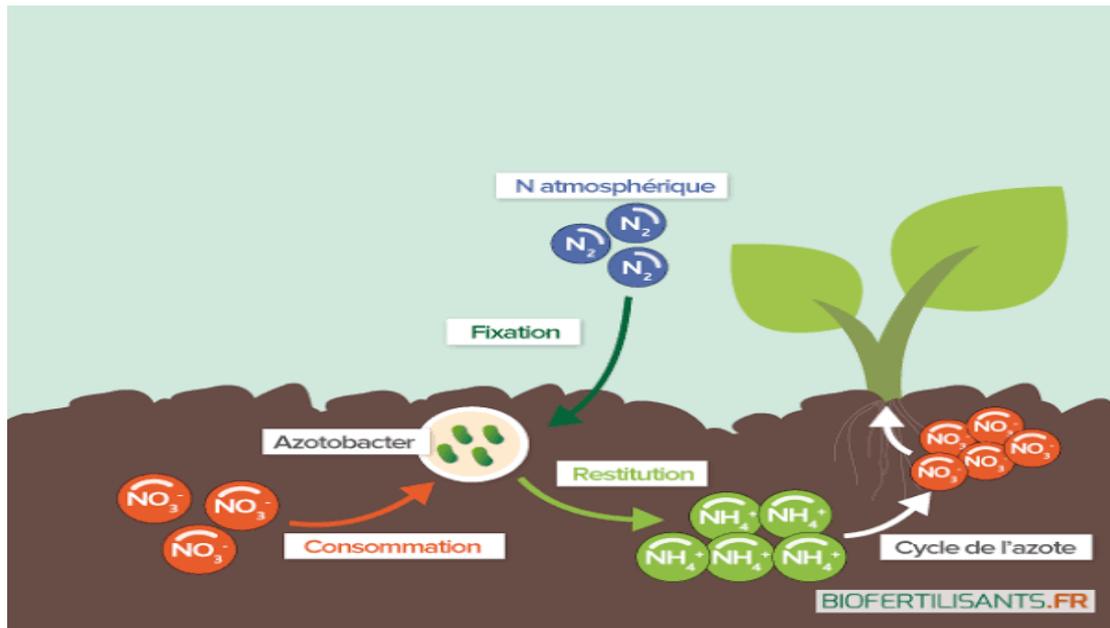
Au cours de la décomposition, l'azote organique est transformé en ammoniac par une série des microorganismes, une partie de l'ammoniac peut être volatilisé et retourne dans l'atmosphère, mais la grande partie est recyclé en nitrate par les bactéries de sol (William et Hopkins, 2003)

### b.Nitrification

La formation de nitrate est initiée par l'oxydation de l'ammoniac en nitrite par des bactéries appartenant au genre *Nitrosomonas*, le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres des genres *Nitrobacter* (William et Hopkins, 2003)

### c.Dénitrification

Lors de cette étape , les bactéries dites ( dénitrifiantes ) réduisent la nitrate en diazote de forme volatile et en anaérobiose , qui retourne à l'atmosphère sous formes gazeux (  $N_2$  et  $N_2O$  ) ( William et Hopkins , 2003 )



**Figure 1:** cycle d'azote (site web1)

## 1.2. Fixation biologique de l'Azote (FBA)

La plus grande partie de l'azote de la biosphère (78%) se trouve dans l'atmosphère. la fixation d'azote est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol.

La première source d'azote utilisée par les plantes est l'azote du sol. En absence de tout apport d'engrais, les plantes non fixatrices d'azote utilisent l'azote du sol durant leur cycle physiologique. Même les plantes fixatrices d'azote atmosphérique utilisent d'abord l'azote de la semence et du sol durant la première phase de la croissance. L'azote du sol est essentiellement sous forme organique. C'est par minéralisation que la matière organique du sol libère l'azote utilisable par les plantes (Dekak , 2018)

Le renouvellement des formes assimilables de l'azote peut être assuré par certains microorganismes du sol qui réduisent biologiquement l'azote moléculaire. (Mbengue, 2010)

La fixation biologique de  $N_2$  est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. (Roger ,1996)

D'après Obaton (1992), la fixation de l'azote est catalysée par une enzyme appelée nitrogénase.

La fixation de l'azote atmosphérique est réalisée au niveau de nodule ; la conversion de  $N_2$  en ammonium faite par la nitrogénase qui comprend :

- \* protéine I (dénitrogénase ) qui réduit l'azote en ammoniac .
- \* protéine II (dénitrogénase réductase) assure le transfert des électrons libérés par le Co-facteur ferrédoxine. (Duhoux et Nicole, 2004),

# Chapitre 2 :La symbiose légumineuse-rhizobia

### 2.1. Mécanisme de la symbiose

La symbiose légumineuse-rhizobia est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, la bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. (Philippe et *al.*, 1998 )

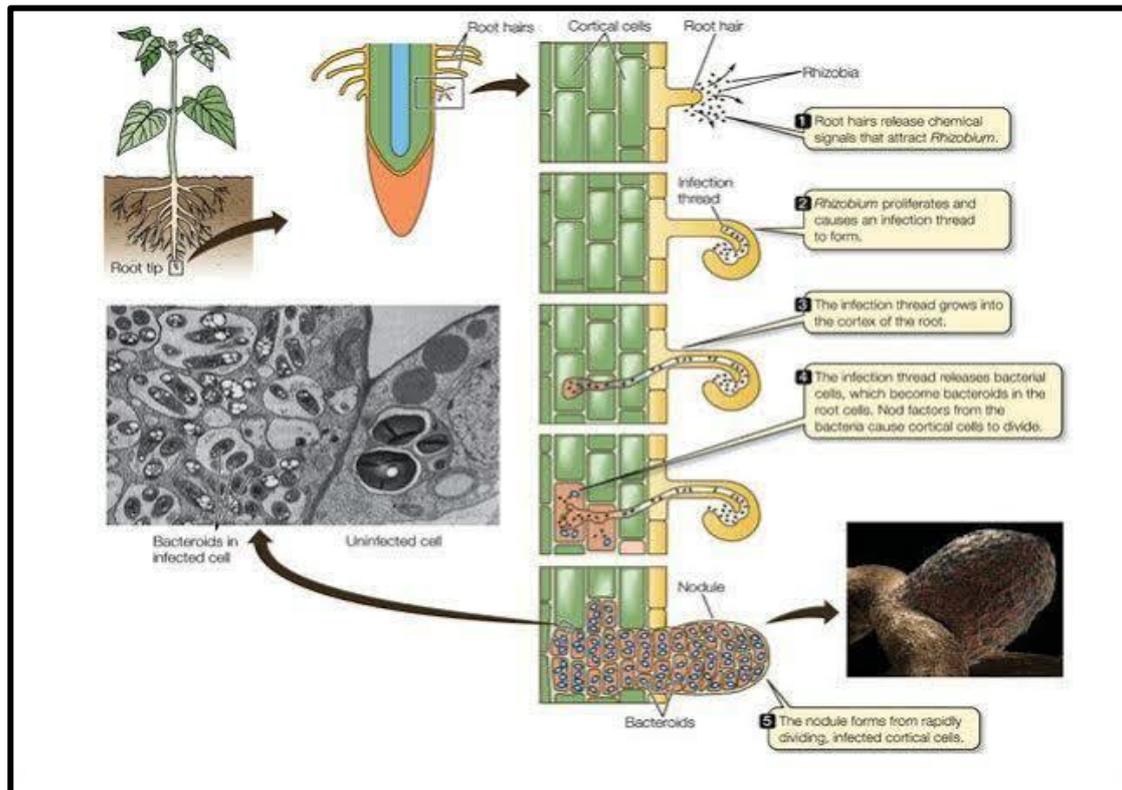
L'association symbiotique légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Elle est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires. (Torche et *al.*, 2010)

### 2.2. Mécanisme de la nodulation

Les nodosités sont présentés chez les sous familles de Fabaceae : 90 % des espèces de Faboïdées, le sont également chez les Mimosoïdées (même pourcentage) et les Césalpinioïdées (1/3 des espèces), ce qui est une preuve supplémentaire de l'unicité des Fabales (Dupont et Guignard, 2015) .

Il existe souvent une population considérable de bactéries dont le fond génétique est similaire à celui du rhizobia nodulant, mais qui manque des gènes nécessaires à la symbiose. Même parmi les bactéries qui possèdent les gènes de symbiose, la plante hôte peut encore être très sélective (Zeze et *al.*, 2001 ) .

la nodulation est un processus fait dans cinq étapes (figure 2) entre deux partenaires:



**Figure 2 :** Les étapes de la nodulation (site web 2)

### 2.2.1. Partie bactérienne : BNL

Les microsymbiotes sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatives, aérobies, non sporulentes et à l'état libre dans le sol.

D'un point de vue phylogénétique, ces bactéries appartiennent aux Protéobactéries. (Duhoux et Nicole, 2004)

Depuis l'adoption de la taxonomie polyphasique comme critère de caractérisation, leur classification se répartit actuellement en 10 genres que désignerons collectivement sous le nom de rhizobia (Duhoux et Nicole, 2004)

### 2.2.2. Partie végétale : La famille de Fabaceae

Fabaceae (ou Leguminosae) est une famille économique importante qui comprend trois sous-familles : *Mimosoideae* (fleur actinomorphe à pétales de valvates), *Caesalpinioideae* (fleur zygomorphe à disposition imbriquée de pétales) et *Faboideae* (ou *Papilionoideae*, fleur zygomorphe à corolle papilionacée) (Shi *et al.*, 2015).

**a.Papilionoideae**

Appelées *Papilionacées*, en raison de la forme de la corolle en « papillon », comprennent de nombreux représentants de nos régions : les Trèfles, les Pois, les Haricots (Dupont et Guignard, 2015).

Dans le tableau 1 on site les principaux espèces d'*Astragalus* de cette sous-famille

**b.Mimosoideae**

Comprennent surtout des ligneux des pays chauds, les flamboyants (*Delonix regia*), parure des tropiques ou le Caroubier, seule espèce méditerranéenne de la sous-famille (Dupont et Guignard, 2015).

**c.Caesalpinoideae**

Elles ont un périanthe actinomorphe réduit mais des étamines généralement nombreuses.

Les fleurs sont réunies en capitules sphériques, des sortes de pompons faits surtout d'étamines. Les genres les plus connus sont les *Acacias* et la *Sensi* (Dupont et Guignard, 2015).

**Tableau 1** : quelques espèces des légumineuses (Ghanbarian *et al.*, 2011)

Famille	Espèce
<i>Papilionaceae</i>	<i>Alhagi persarum Boiss.</i> <i>Astragalus anacardius.</i> <i>Astragalus bakhtiaricus.</i> <i>Astragalus brachycalyx.</i> <i>Astragalus camptoceras .</i> <i>Astragalus campylanthus.</i> <i>Astragalus campylorrhynchus</i> <i>Astragalus coluteopsis.</i> <i>Astragalus commixtus.</i> <i>Astragalus crenatus.</i> <i>Astragalus curvirostris.</i> <i>Astragalus doshman-ziariensis.</i> <i>Astragalus fasciculifolius.</i> <i>Astragalus fischeri .</i> <i>Astragalus hamosus L.</i> <i>Astragalus ledinghamii Borne.</i> <i>Astragalus ptychophyllus Boiss.</i> <i>Astragalus reuterianus Boiss.</i> <i>Astragalus rhodosemius Boiss.</i> <i>Astragalus susianus.</i> <i>Astragalus tribuloides.</i> <i>Cicer oxyodon.Boiss.</i>

### 2.3. Le genre *Astragalus*

Ce genre est largement répandu dans les régions tempérées et arides du monde principalement situés en Asie (1500 espèces), en Amérique du Nord (500 espèces) en Amérique du Sud (150 espèces) et en Europe (120 espèces), mais aussi sur les montagnes d'Afrique (Benchadi *et al.*, 2013)

Nombreuses espèces au sein de ce genre sont des ressources importantes pour la production de plantes médicinales ou feuillage pour animaux sauvages. La nodulation de 90 espèces d'astragales ont été signalées, bien que très peu de travail taxonomique ont été réalisé sur les microsymbiotes associés à ces espèces (Wei *et al.*, 2003).

Les espèces choisies sont :

#### *Astragalus gombo*

La consistance différente des parois sont épaisses et coriaces, spongieuses, et à feu grande, de 25 mm; gousse à parois épaisses, ligneuse, très dure, ornée de grosses nervures et terminée en bec robuste et long, assez commun dans tout le Sahara. Endémique. (Ozenda, 2004)

#### *Astragalus maréoticus*

L'*Astragalus maréoticus* est un échantillon avec fleurs et fruits, stigmaté non bardu, gousse presque glabre, à poils courts; fleurs bleuâtre-pale, feuilles longues à 6-8 paires de folioles commun au Sahara. (Ozenda, 2004)

#### *Astragalus armatus*

Plante gousse uniloculaire non divisée longitudinalement par une cloison, à parois parcheminées; calice renflé en vésicule, enfermant le fruit; plante très épineuse, les pétioles devenant durs et aigus; folioles petites, très caduques; rameaux écailleux, glabres. Lisière très commun au Sahara. (Ozenda, 2004)

#### *Astragalus cruciatus*

C'est une plante à grappe de gousses sessile ou portée par une hampe plus courte que la feuille axillante; plante très variable, portant souvent deux fruits seulement dans chaque grappe, très commun au Sahara septentrional, paraît manquer plus au Sud. (Ozenda, 2004)

#### 2.4. Utilisations thérapeutiques :

Les espèces du genre *Astragalus* sont appréciées dans la médecine traditionnelle à travers le monde, et utilisées comme herbes médicinales contre les ulcères d'estomac, la toux, la bronchite chronique, l'hypertension, les maladies gynécologiques troubles, diabète et morsures venimeuses du scorpion. Certaines plantes du même genre ont été rapporté comme ayant des activités immunostimulantes, cardiovasculaires et antivirales (Benchadi *et al.*, 2013)

La préparation d'*Astragalus* a été approuvée en cas de collapsus cardiovasculaire et de maladie hypotonique. Il a un effet anti-inflammatoire et diurétique général et peut être utilisé pour le traitement des troubles vasculaires rénaux.

L'utilisation d'*Astragalus* dans les lésions du foie chez les patients atteints de tuberculose pulmonaire a été proposée. Elle a des propriétés médicinales dues à la présence de glycosides et de flavonoïdes (Lysiuk *et al.*, 2016)

Les composants biologiquement actifs des espèces d'*Astragalus* sont la saponine, les composés phénoliques et les polysaccharides .composés toxiques, tandis que les composants toxiques sont constitués de nitrotoxines, d'alcaloïdes, d'imidazoline et de sélénium dérivés, *A. cruciatus Link.*, Est particulièrement connu en médecine de Nord-africaine traditionnelle espèces toxiques, Il cause au bétail une maladie appelée "Asaydal" (Benchadi *et al.*, 2013)

Parie II :  
Partie expérimentale

# Chapitre 3 :

## Matériel et Méthodes

### **3 .1.Isolement des bactéries à partir des nodules**

#### **3.1.1. Source des isolats**

Les nodules ont été obtenus à partir d'une collection réalisés par les étudiants des années passées dans trois régions de Sud-Est Algérien ( Figure 3), collectés à partir, El Hadjeb et Fontaine des gazelles et El choucha de la wilaya Biskra.

#### **La région de collecte des nodules :**

Biskra située à l'Est de l'Algérie, au Sud des monts des Aurès, la wilaya de Biskra apparaît comme un véritable espace tampon entre le Nord et le Sud. Sa superficie est de 21671 km<sup>2</sup>, soit 0,91 % du territoire national. Le climat est aride, avec des hivers froids et secs et des étés chauds et secs ; la température moyenne annuelle est de 22,3°C, avec un minimum de 11,4 °C en janvier et un maximum de 34,2 °C en juillet.

À l'exception des montagnes septentrionales, la wilaya de Biskra reçoit moins de 200 mm de pluie par an, sauf année exceptionnelle (Farhi , 2001).

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

Notre deuxième site d'échantillonnage est la commune d'EL Hadjeb, wilaya de Biskra.

Notre troisième site d'échantillonnage est la région d'el Choucha à la commune d'EL Hadjeb.



Nous avons préparé les milieux de culture suivants : (voir Annexe 1)

- ✓ YMA (Yeast Manitol Agar)
- ✓ YMB (Yeast Manitol Broth)
- ✓ YMA +CaCO<sub>3</sub>

Le pH des milieux est ajusté à 6.8

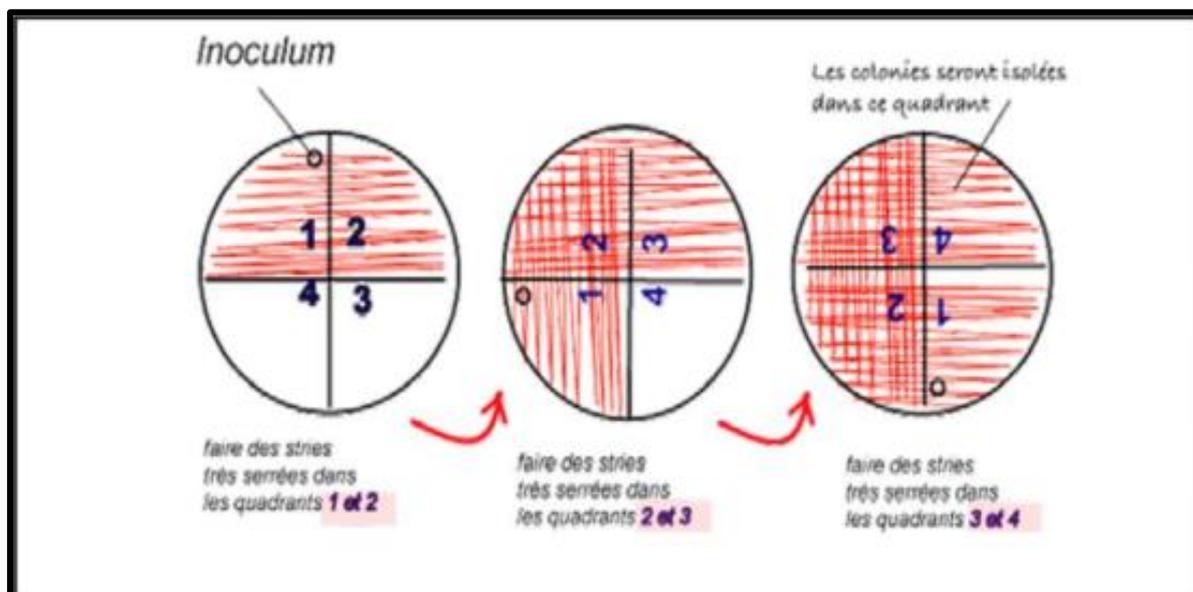
La stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 minutes

### 3.2.2. Purification des isolats

Des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes ont été effectués

Dans des tubes contenant le YMB, l'ensemencement est réalisé puis les tubes sont placés dans un bain-Marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C pendant 72 h.

Ensuite l'ensemencement se fait sur le milieu YMA selon la méthode des quatre cadrants (Figure 4)



**Figure 4 :** Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

### 3.2.3. Conservation des souches

La conservation est réalisée dans des tubes contenant 10 ml de milieu YMA additionnée de 3g de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant l'acidité.

Chaque culture bactérienne en phase exponentielle estensemencée sur des tubes inclinés contenant le milieu YMA, Incubation à 28°C pendant 3 jours.

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

### **3.3. Examen microscopique**

#### **3.3.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été mise au point par Christian Gram en 1884.

En effet, cette coloration complexe permet de différencier des bactéries intactes et morphologiquement semblables en deux groupes  $G^+$  et  $G^-$ .

Elle se base sur la couleur de la paroi cellulaire après avoir utilisé la méthode de la coloration.

Les étapes de la coloration de Gram sont décrites dans l'annexe 2.

### **3.4. Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **3.4.1. La résistance intrinsèque aux antibiotiques**

L'action d'un antibiotique est caractérisée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui représente la plus faible concentration de l'antibiotique inhibant la croissance du rhizobia à la température optimale de 28°C. Les profils de la CMI de différents antibiotiques sont d'un intérêt écologique très important puisqu'ils permettent d'identifier une souche de rhizobia déterminée introduite dans un sol particulier (El-Hilali ,2006).

Les tests ont été réalisés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA additionnées de concentrations différentes d'Antibiotiques (Tableau 2).

Les boîtes ont été subdivisées en 2 secteurs. Chaque secteur a étéensemencé par une anse de platine d'une préculture fraîchement préparée.

- Le milieu a été additionné de différentes concentrations d'antibiotiques selon la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1985). Les solutions d'antibiotiques ont été stérilisées par filtration (filtre 0.22 $\mu$ m) puis additionnées au milieu YMA préalablement autoclavé et maintenu à une température de 55°C.

- Les résultats de chaque test ont été évalués après une semaine d'incubation à 28°C.

**Tableau 2:** Solution d'antibiotiques utilisés

Antibiotique	les concentrations en µg/ml	Solvant
L'acide nalidixique	110, 120, 130,140	NaOH 1N
Norfloxacin	10, 15, 20, 25	Ethanol 95%
Néomycine sulfate	10, 20, 30,40	Eau distillée

### 3.4.2. La sensibilité des métaux lourds

Les métaux lourds sont présents naturellement dans le sol suite à la dégradation des roches mères. Plusieurs paramètres influencent la disponibilité et la mobilité des métaux dans le sol.

Les plus importants à signaler sont le pH, le type du sol et les processus physico-chimiques exercés par les différents êtres vivants qui existent dans ce sol (El Hilali ,2006).

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister aux métaux lourds, trois métaux lourds ont été testés sous forme de chlorures sont :  $ZnCl_2$ ,  $CuCl_2$  et  $HgCl_2$ .

Les souches sont cultivées sur le milieu YMA contenant différentes concentrations de métaux lourds (Tableau 3) dans le but de déterminer la concentration minimale inhibitrice, puis incubation des boîtes à 28°C jusqu'à 7 jours (Dekak, 2018).

**Tableau 3:** concentrations et les solvants des métaux utilisés

les métaux	les concentrations en µg/ml
$HgCl_2$	1, 3, 5,7, 10, 15, 20
$CuCl_2$	100, 200,300, 350, 400, 450
$ZnCl_2$	100, 200, 300, 400, 500, 600,650, 700, 750, 800

### 3.4.3. Caractérisation des isolats : la galerie API20 E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

Par la suspension en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement et pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant (Figure 5).

Remplir avec la suspension le tube et la cupule pour les trois tests CIT, VP, GEL et remplir uniquement le tube pour les autres tests,

Recouvrir la remplir d'huile de paraffine les cupules pour les tests suivants : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S.

Refermer la boîte d'incubation et incuber à 28°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, les résultats traduisent par de virage de couleur spontanés ou révélés par l'addition de réactifs après 10 min d'ajout du réactif pour les tests suivants :

- Test VP : ajout d'une goutte de VP1 et de VP2.
- Test GLU : ajout d'une goutte de Nitrite 1 et Nitrite 2.
- Test de l'indole : ajout une goutte de JEMS(Covacs).
- Test de TDA : ajout une goutte de TDA.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (Annexe 3).



**Figure 5** : Inoculation de pré culture dans les puis de galerie API 20E (photo original)

### 3.5. Effet de la température

Les souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 40°C et 45°C, et les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation, ce teste est utilisé pour estimer les températures optimales et maximales de croissance.

### 3.6. Effet de l'herbicide

Souvent les agriculteurs voulant protéger leur culture avec des herbicides en ignorent que ce traitement risque d'influencer sur le processus de fixation (bactérie + plante) et provoquant la réduction de la croissance des plantes.

Pour suivre cet effet, on a suivi l'effet d'un herbicide *in vitro* par deux méthodes :

Rhoundup est utilisé par les agricultures

### 3.6.1. En milieu solide

L'effet de Roundup sur nos isolats a été étudié sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose YMA.

On a trois concentrations d'herbicide (25g /l ; 50 g/l ; 100g/l) avec trois répétitions, ces concentrations sont mélangées avec le milieu YMA, puis versées dans des boîtes de Pétri. Après l'ensemencement des 8 souches et à la fin l'incubation pendant 4 jours à 28°C, la lecture se fait selon le degré de croissance : bonne, moyenne, faible et nulle (Elzanaty *et al.*, 2015)

### 3.6.2. En milieu liquide

La deuxième méthode, et celle de la culture en bouillon pour suivre la croissance bactérienne en présence de l'herbicide, Dans des flacons de 150 ml contenant 50 ml de YMB, le pH du milieu était ajusté à 7, Les isolats en phase de croissance exponentielle sont ajoutés après l'addition de différentes concentrations d'herbicide.

Les flacons ont été incubés dans un Bain marie agitateur rotatif pendant 4 jours à 180 tr / min. La croissance des d'isolats est suivi en enregistrant la densité optique (DO).

L'expérience a été menée en trois répétitions. La turbidité a été mesurée à l'aide de spectrophotomètre à 600 nm contre le blanc (bouillon YMB stérilisé non inoculé) et le temps moyen de génération a été calculé pour chaque isolat (Elzanaty *et al.*, 2015).

# Chapitre 4 :

## Résultats et discussion

## 4.1. Caractérisation morphologique et cultural

### 4.1.1. Isolement et identifications

Notre analyse est effectuée sur 80 souches isolées par les étudiants des années précédentes, ces souches sont conservées par la méthode de Vincent (1970).

Dans ce travail, on a choisis 8 souches isolées à partir des nodules, des *Astragalus gombo*, *Astragalus maréoticus*, *Astragalus armatus*, *Astragalus cruciatus* récoltées de différents sites de wilaya de Biskra, selon la méthode de Vincent (1970), et Somasegaran et Hoben (1994).

### 4.1.2. Croissance des isolats sur milieu YMA

Après 72h d'incubation, les colonies apparaissent sur le milieu YMA (Figure 6), avec une couleur crème ou blanche, de taille variable ayant une forme circulaire bombée, de texture translucide ou opaque et d'un aspect de surface lisse et brillant, La morphologie des isolats est identique à celle trouvé par plusieurs auteurs : Vincent (1970), (Gauri *et al.*, 2011) et (El Hilali, 2006).



**Figure 6** : Morphologie et la croissance les colonies des isolats sur YMA (photo Original)

### 4.1.3. Coloration de Gram

L'observation microscopique a permis d'observer des bâtonnets courts Gram négatif, la même observation a été enregistrée par Vincent (1970), ( Deora et Singhal ,2010) au cours des études précédentes sur les rhizobia.

### 4.1.4. La résistance intrinsèque des antibiotiques

D'après les résultats obtenus : Annexe 4 et Figure 7, on estime que :

Pour la Norfloxine : la concentration 25 µg/ml peut inhiber les souches GB15 –MB10 –GR12 qui sont présentent la résistance la plus forte, et pour la concentration de 20 µg/ml, elle inhibe les deux souches K24 et C45. La plus faible concentration est remarqué avec CK4 ou la CMI est 15 µg/ml, tandis que les deux souches MH6 et F16 présentent une faible croissance a 25 µg/ml .

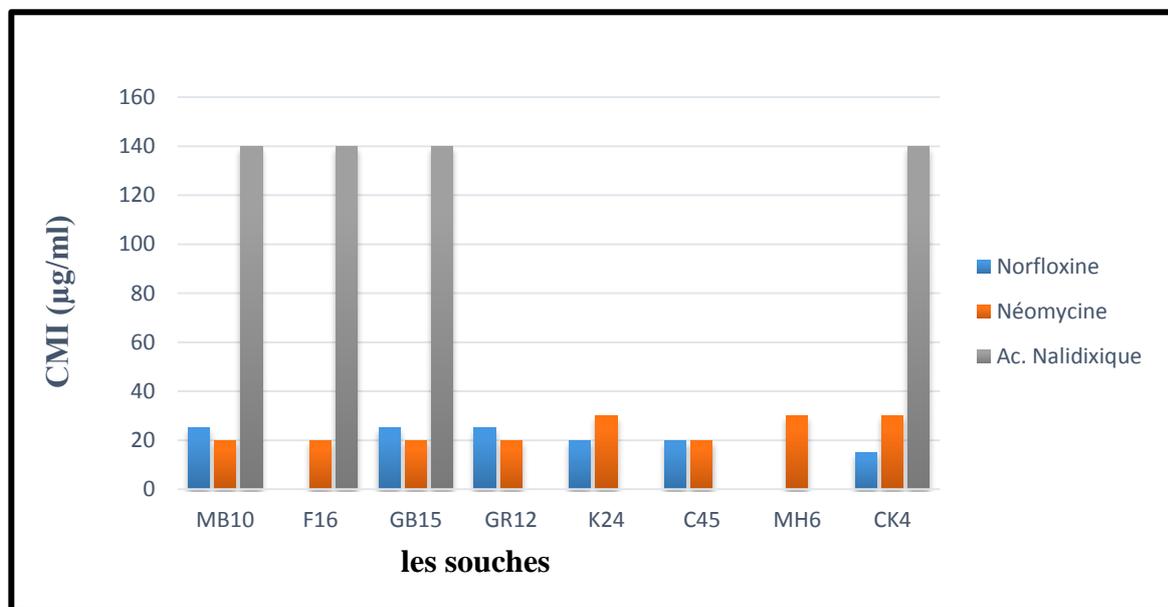
Pour Néomycine : une concentration de 20 µg/ml suffit pour l'inhibition complète des souches GR12 – F16 –GB15 –MB10 - C45, par contre les autres souches K24 – MH6 et CK4 ont un CMI de 30 µg/ml.

Pour l'acide Nalidixique : nos isolats sont très résistants pour cet antibiotique, et cela est confirmé par une CMI de 140 µg/ml pour 50% des souches et l'autre moitié on remarque une faible croissance dans les concentrations étudiées.

D'une façon générale il y'a une hétérogénéité entre les isolats envers les antibiotiques.

Cacciari *et al* (2003) en étudiant de nombreuses souches de rhizobia isolées à partir de *Acacia* de sols Sahéliens Sénégalais et Tunisiens, trouvent que les isolats provenant des sites Tunisiens sont, globalement, tolérants à tous les antibiotiques, bien qu'à différents degrés. les isolats provenant des sites Sénégalais ne présentent eux que de faibles niveaux de résistance, à part quelques isolats résistants à un seul antibiotique, la sensibilité aux antibiotiques, plus élevée chez les souches sénégalaises que chez les souches tunisiennes, peut être imputée à la biomasse microbienne moins abondante dans la rhizosphère des *Acacia* de Tunisie .

Cette différence résistance vis-à-vis des antibiotiques les résistances les plus élevées sont probablement dues à la plus grande aptitude des souches à survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance des bactéries producteurs d'antibiotiques.



**Figure 7 :** Effet de différents antibiotiques sur la croissance des souches

#### 4.1.5. La sensibilité des métaux lourds

La contamination des sols par les métaux est très répandue et l'origine peut être diverse : exploitations industrielles, centrale électrique, fabrication de pesticides, engrais, boues d'épuration, et la préoccupation majeure est la contamination par les métaux lourds qui à certaines concentrations, devient néfaste pour les microorganismes. (Saoudi, 2017)

Après le teste de sensibilité des métaux lourds et on trouve que toutes les souches sont sensibles aux différentes concentrations des métaux lourds testées, concentration de  $7\mu\text{g/ml}$ , pour le  $\text{CuCl}_2$  .elle est  $300\mu\text{g/ml}$ , et pour  $\text{ZnCl}_2$ , la CMI est  $650\mu\text{g/ml}$  (Tableau 5)

**Tableau 4 :** concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds

Les métaux lourds	CMI
$\text{HgCl}_2$	$7\mu\text{g/ml}$
$\text{CuCl}_2$	$300\mu\text{g/ml}$
$\text{ZnCl}_2$	$650\mu\text{g/ml}$

**4.1.6. Galerie API20E :**

Après l'incubation, les résultats trouvés sont présentées, dans le tableau 5 et Figure 8.

**Tableau 5 : Résultats des isolats en utilisant système l'API 20 E**

Test	Souches testées							
	B10	F16	GB5	GR12	K24	C45	MH6	CK4
ONPG	-	-	+	-	-	-	+	-
ADH	+	-	+	+	+	+	+	-
LDC	-	+	-	-	-	-	-	-
ODC	+	-	+	+	+	+	+	+
CIT	+	-	+	+	-	-	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	+	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	+	+	+	+	+	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	-	-	-	-	+
MAN	-	+	+	+	+	-	+	-
INO	-	+	-	+	+	-	+	-
SOR	-	+	-	+	-	-	+	-
RHA	-	+	+	+	+	+	+	-

SAC	-	+	+	+	-	-	+	-
MEL	+	+	+	+	+	+	+	-
AMY	-	+	+	+	+	+	+	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	-
GLU	+	+	-	+	+	+	+	-

#### 4.1.6.1. Recherche de la $\beta$ -galactosidase (test ONPG)

Les souches MB10-F16-GR12-K24-C45 et CK4 présentent un résultat négatif donc ils ne possèdent pas la  $\beta$ -galactosidase contrairement aux souches GB15 et MH6 qui marquent le virage de couleur indiquant la possession de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase

des résultats similaires ont été signalés par Shahzad *et al*(2012) en travaillant avec *R.meliloti* nodulant *Medico Sativa* et Boulbaba *et al* ( 2007) sur rhizobia cultivés dans des sols Tunisiens .

#### 4.1.6.2. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

L'apparition de couleur jaune pour les souches F16 -GR12- K24 -C45- MH6 montre que ces dernières sont capables d'utiliser le Glucose comme source du carbone, par contre les trois souches F16 - GB15 et CK4 qui sont donc n'assimilent pas le glucose colorées par le bleu.

Pour le mannose et l'inositol les souches GB15- GR12 et K24 ont assimilé ces deux sucres, par contre une réaction négative est observée avec les souches MB10- F16- C45 et CK4.

Nos isolats utilisent aussi le sorbitol sauf les deux souches GR12 et MH6. Ces résultats sont différents à ceux de Gauri *et al*(2011) ayant trouvé que toutes les souches utilisent le Sorbitol.

Pour le rhamnose et saccharose, le premier est assimilé par GB15-GR12-K24-C45-MH6 et le deuxième est assimilé seulement par GB15-GR12-MH6. Nos résultats sont différents à ceux d'El Hilali (2006) qui a trouvé que les souches de rhizobia nodulant le genre *Lupinus* utilisent le saccharose et le rhamnose.

D'après les résultats obtenus, on observe une différence nette dans l'utilisation des sucres et on estime que les sucres les plus utilisées par nos souches sont : Ara, Mel, Glu, Sor, Rha et Amy et les sucres moins utilisées sont : Man, Ino et Sac.

Toutes les souches peuvent utiliser une majorité de sources de carbone. la plupart des souches peuvent utiliser des hexoses (rhamnose et sorbitol), des pentoses (arabinose et xylose), des disaccharides (lactose et saccharose) et des trioses (glycérol) Nos résultats sont en accord avec ceux trouvé par Gauri *et al* ( 2011) dans leurs étude sur *R trifolium alexandrinum*, et Shahzed *et al* (2012) ayant trouvé que *Rhizobium meliloti* utilise tous les sucres comme source de carbone, et Alshaharani et Shetta (2013) étudient les rhizobia isolés à partir des espèces de genre *Acacia* trouvent les mêmes résultats .

#### **4.1.6.3. Assimilation des acides aminés comme source d'azote**

(Test ADH) : toutes les souches sont capables d'assimiler l'Arginine sauf la souche CK4.

(Test ODC) toutes les souches sont capables d'assimiler l'Ornithine.

(tes LDC) toutes les souches sont capables d'assimiler le Lysine .

Les résultats des tests nutritionnels montrent que les souches peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates, et peuvent pousser en présence de la majorité des acides aminés testés et n'exigent pas toutes les vitamines pour la croissance, nos résultats sont similaires à ceux trouvées par Torche *et al* (2010) dans leur travaux sur des BNL des genre *Hedysarum* .

Dans l'étude de Zhang *et al* (1991) sur les rhizobia isolées à partir de *Acacia* (Sénégal) et *Prosopis* (Soudan) ont trouvé que ces souches sont capable d'assimiler l'Arginine et incapables d'assimiler le Tryptophane

#### **4.1.6.4. Hydrolyse de l'urée**

La seule souche qui donne une coloration rose et peut hydrolyser l'urée est la souche MH6, par contre les reste ne possèdent pas l'uréase et n'a donné aucune alcalinisation du milieu et cela est traduit par la couleur jaune.

Ces résultats sont opposés avec les résultats de Alshaharani et shetta (2013), et Gauri *et al* (2011) qui ont trouvés que les rhizobia ont une activité catalytique positive, et on peut expliquer cette différence au site de collection ainsi nos souches sont issus des plantes récoltés

de Biskra (région aride, Sahara ) par contre Boulbaba *et al* ( 2007) ont trouvé des résultats similaires avec nos souches , ils ont trouvées des résultats négatives .

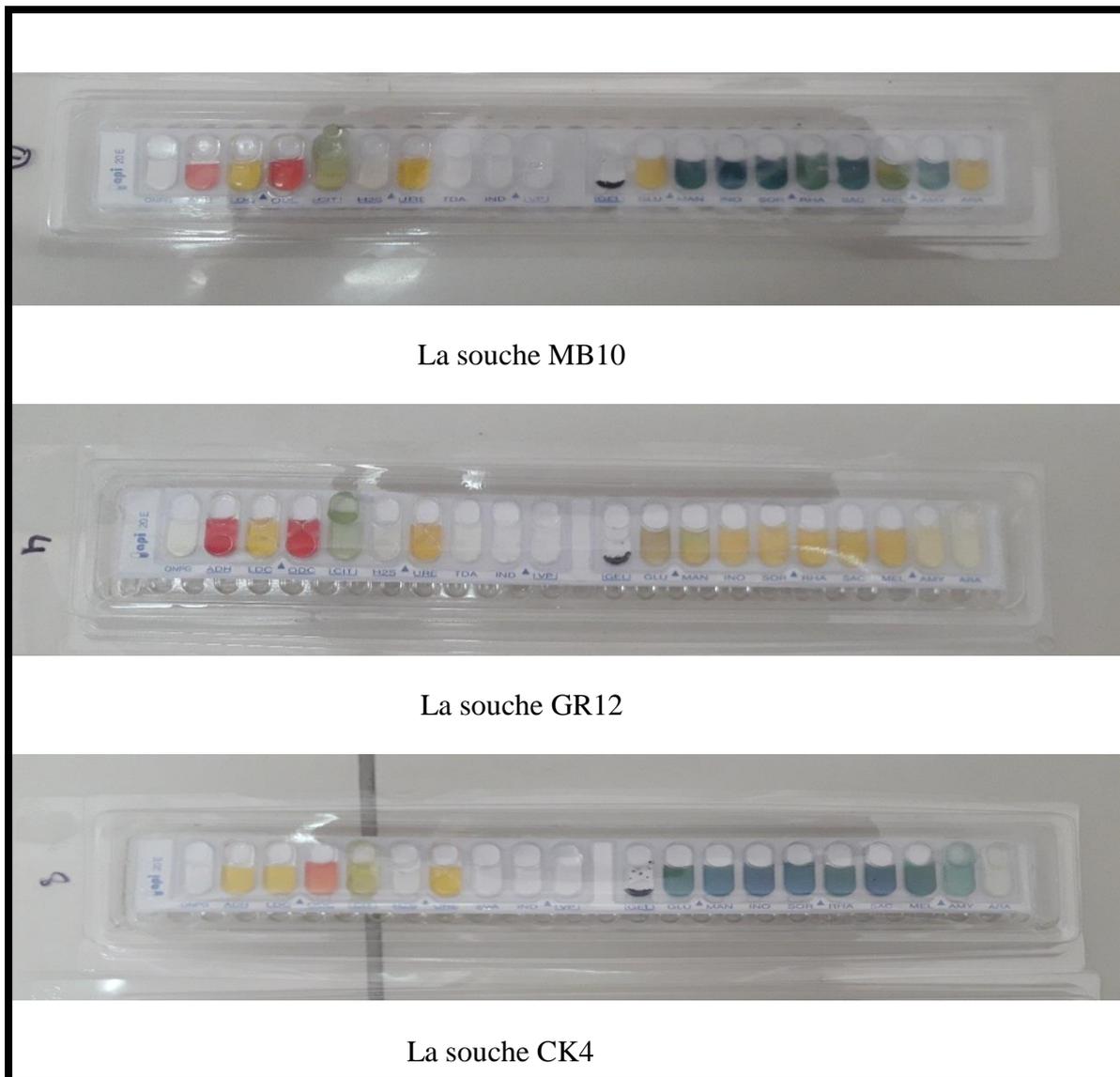
#### **4.1.6.5. Réduction du nitrate**

Après l'addition des réactifs I et II du nitrate réductase, la majorité des souches ne réduisent pas les nitrates en nitrite et donnant une réaction négative sauf les souches F16, GB15et CK4 qui a donné une réaction positives.

Dekak (2018) trouvé que toutes les souches sont nitrate positive aussi Zhang *et al* (1991) ont trouvées des résultats similaires.

#### **4.1.6.6. Hydrolyse de gélatine**

Nos isolats ne possèdent pas la gélatinasse et ça se traduit par la réaction négative ; Singh *et al* (2008) et Gauri *et al* (2011) ont trouvés les mêmes résultats, par contre Boulbaba *et al* (2007) enregistrent que les isolats des espèces *Cicer arietinum L* sont capables d'hydrolyser la gélatine.



**Figure 8 :** Identification des isolats en utilisant système l'API 20E (photo original)

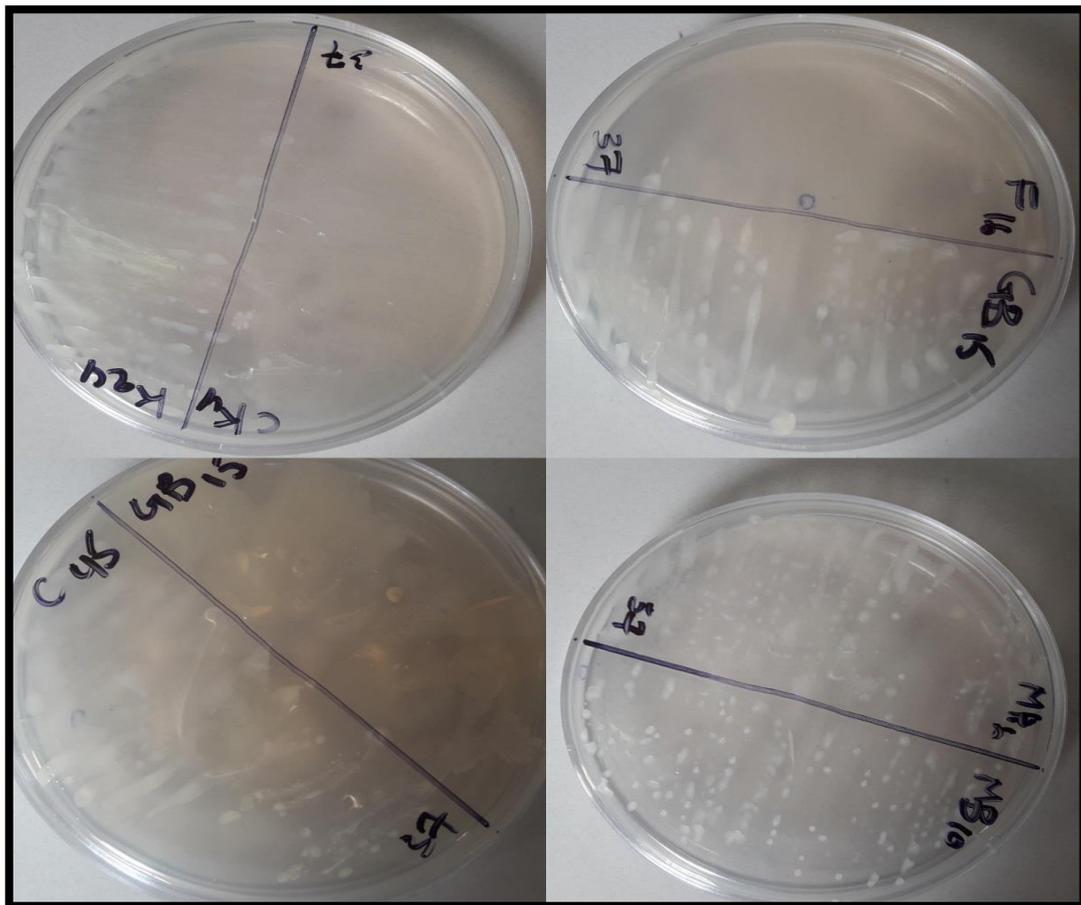
#### 4.1.7. Effet de la température

La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol. L'influence de la température sur la croissance est en fait une mesure sur la turgescence et sur l'action des enzymes de la cellule. Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. Le stress thermique (non extrême) induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HcP (Heat shock proteins), qui assurent la protection des enzymes clés de la physiologie microbienne (Al- Hilali, 2006).

Généralement, on a trouvé que la majorité de nos isolats tolèrent un intervalle de 4 °C jusqu'à 40°C.

Une faible croissance est enregistrée pour toutes les souches à 4°C, et une croissance moyenne à 20°C.

La température optimale de nos isolats est 28°C (mésophiles), à 37°C la plupart des souches tolèrent cette température c'est le cas de K24 -GB15 - C45 - GB15 - MH6 - MB10, et on note une absence de croissance chez les souches CK4 et F16 (Figure 9).



**Figure 9 :** Effet de la température de 37°C sur les isolats

A 40°C, observe une légère croissance MH6 et MB10, et les souches K24-GB15- C45 et GR12 supportent cette température (Figure 10) ce qui indique que nos isolas sont thermo-tolérants. Par contre les deux souches F16 et CK4 ne présentent pas une croissance à cette température (T° maximale) une croissance à cette température, des mêmes résultats similaires sont trouvés par Alshaharani et Shetta (2013).

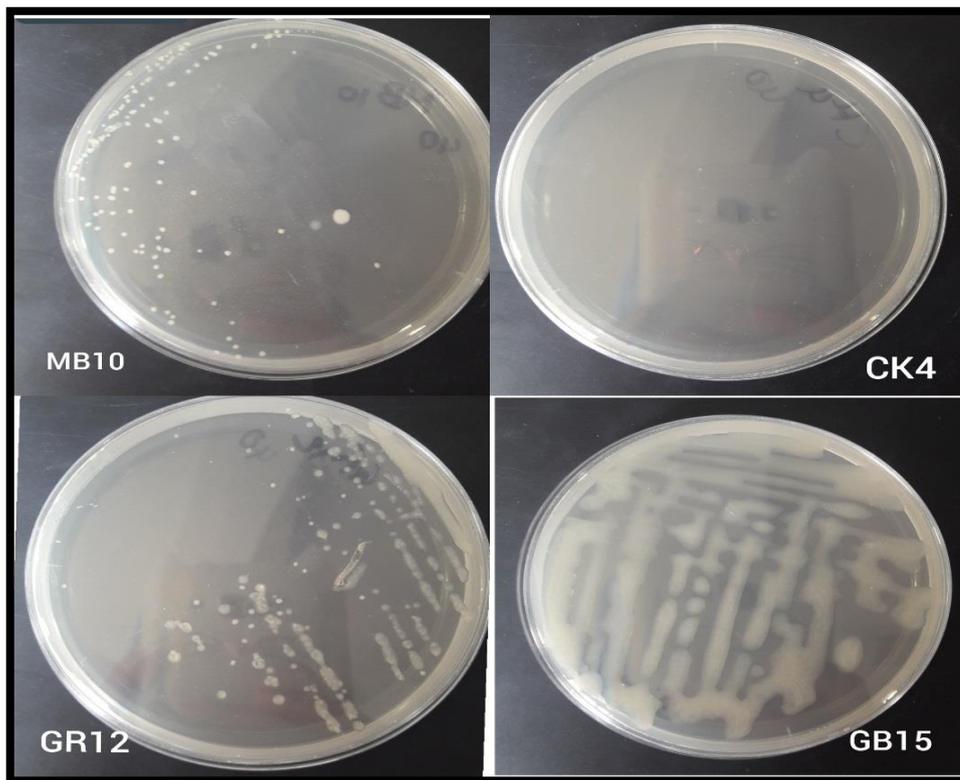


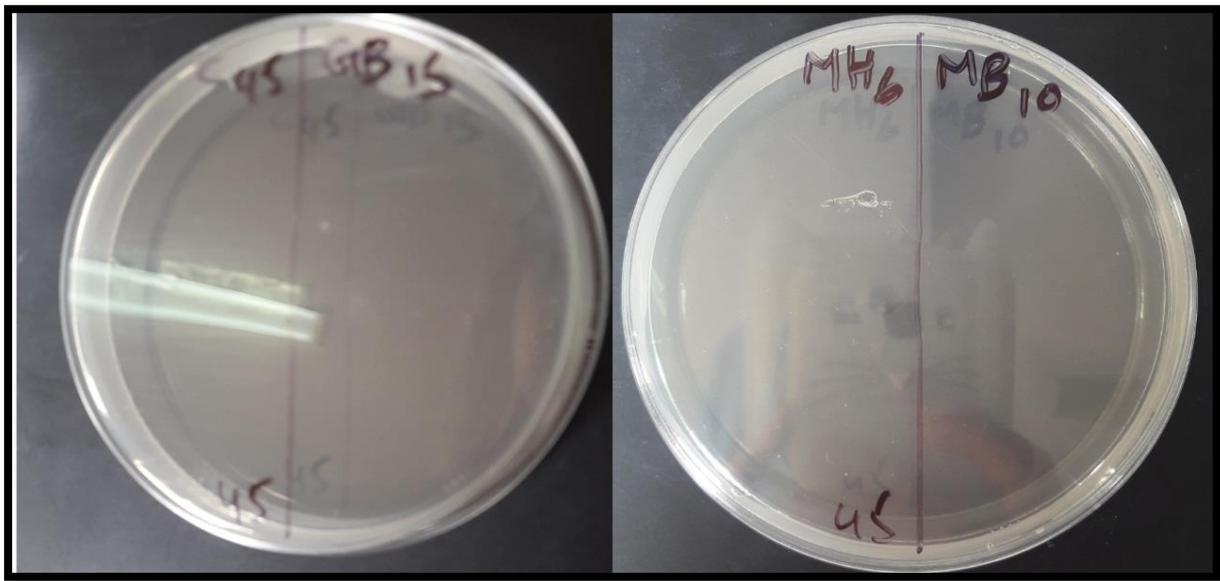
Figure 10 : effet de la température 40°C sur les isolats

A 45°C, La majorité des isolats ne tolèrent pas cette température sauf les deux souches K24 et CK4 qui tolèrent faiblement température (Figure 11).

Ces résultats sont différentes à celles de Saoudi (2008) sur le rhizobia nodulant *A. armatus* récoltés de Tamara (Biskra) .

Sakrouhi (2017) a étudié deux genres de *Acacia* et conclue que les souches isolées de la région de Fès (Maroc) tolèrent une température comprise entre 20°C et 55° , il a trouvé des souches qui tolèrent la température de 55°C et d'autres souches ne poussent pas dans cette température , et il a expliqué ca par le fait que ces souches ont besoin d'un temps de latence pour s'adapter aux températures élevées .

Cacciari *et al* (2003) aussi trouvent que toutes les souches, à l'exception de trois d'entre elles provenant d'un échantillon de profondeur du site de Louga (Sénégal), se sont révélées capables de se multiplier à 40 °C. La moitié des souches montrait une croissance à 42°C. Cinq d'eux peut tolérer jusqu'a45 °C, dont deux souches provenant d'un sol aride, deux d'un sol salin et une d'un isolat de surface.



**Figure 11:** Effet de la température 45°C sur les isolats

#### 4.1.8. Effet de l'herbicide

##### 4.1.8.1. En milieu solide

Il est clair que la dose la plus élevée de l'herbicide Roundup a un effet sur la croissance de rhizobia (Tableau 7), et nous avons observé une variabilité de croissance in vitro sous les différents traitements herbicides entre les isolats testés.

A 25 mg / ml : 75% des souches poussent et résistent dans ce milieu (Figure 12).

A 50 mg / ml : dans cette concentration seulement 50% des isolats poussent dans cette concentration (Figure 13).

A 100 mg / ml : dans cette concentration, on observe l'absence totale des colonies (Figure 14).

Elkanzy *et al*(2015) étudient l'effet de Roundup sur les rhizobia isolées à partir de l'espèce *Viciae faba L* en Egypte, et ils ont trouvé des résultats similaires.

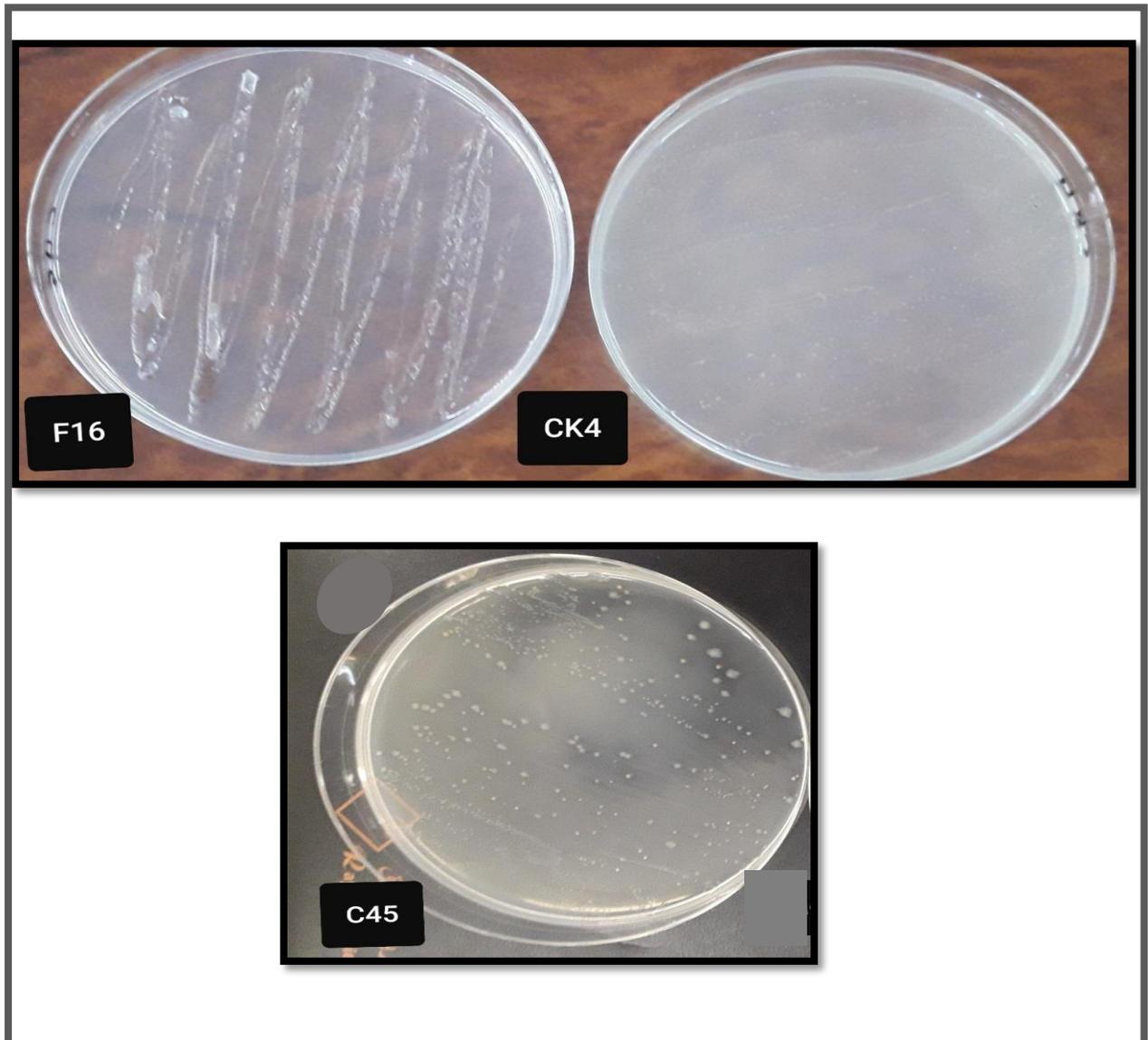
Ahemad et Khan (2013) rapportent que Roundup réduit le nombre de rhizobia dans l'inoculum en lysant ces bactéries durant le suivi de la croissance pendant 72h.

D'après Singh et Wright (2002) l'effet des herbicides (Bentazone) sur la croissance des *Rhizobium leguminosarum* peut être très différent selon la méthode utilisée. L'herbicide, à la

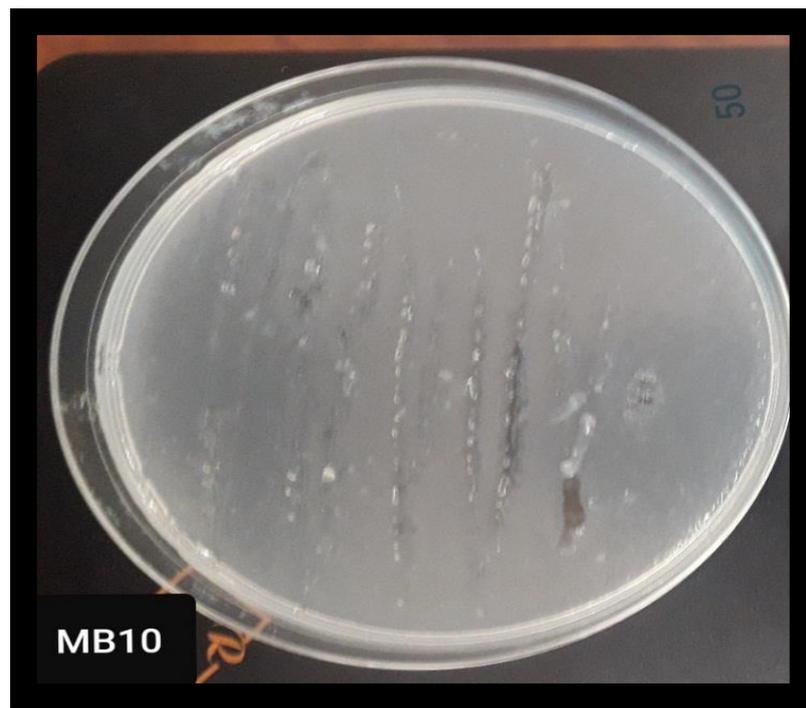
dose recommandée et augmente 10 fois supérieure à la dose recommandée, a eu un effet défavorable sur la croissance de *R. trifolii* dans les puits ainsi que sur les disques posés directement sur les plaques de gélose, mais ces résultats est différent dans la culture en bouillon, de même à une vitesse 10 fois supérieure à celle recommandée, et on conclue aussi que il est possible que les herbicides aient peu d'effet sur la croissance des rhizoia , mais qu'ils puissent quand même affecter négativement le processus de nodulation et l'activité de la nitrogénase. C'est pour ça il faut suivre cet effet *in vivo* dans un champ .

**Tableau 4 :** l'effet de Roundup sur la croissance des isolats

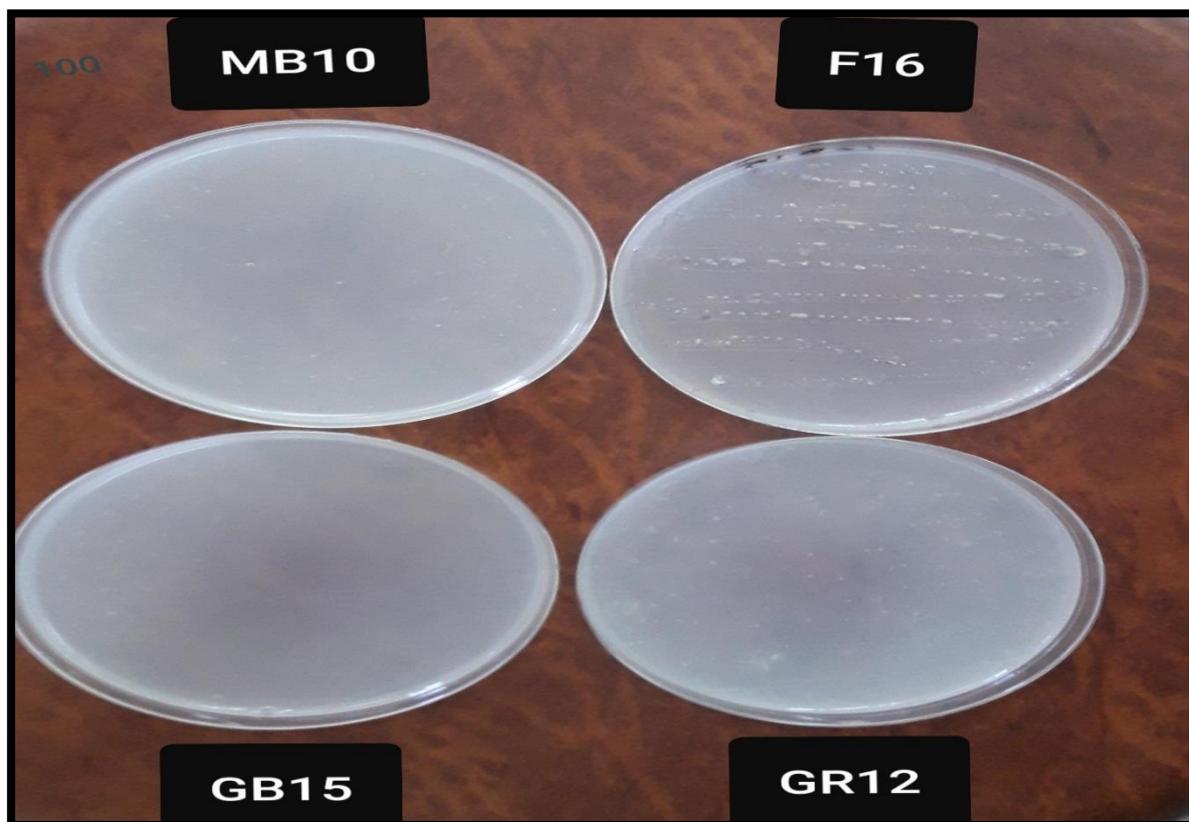
Les souches	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml
MB10	+	+	-
F16	+	+	-
GB15	+	+	-
GR12	-	-	-
K24	+	+	-
C45	+	-	-
MH6	+	-	-
CK4	-	-	-



**Figure 12** :L'effet de Roundup à 25 mg /ml (photo originale)



**Figure 13 :** L'effet de Roundup à 50 mg /ml



**Figure 14 :** l'effet de Roundup à 100 mg /ml (photo originale)

#### 4.1.8.2. En milieu liquide

La suivi de la croissance pendant 3 jours nous a permis de tracer les courbes de croissance (Figures 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 , 22)

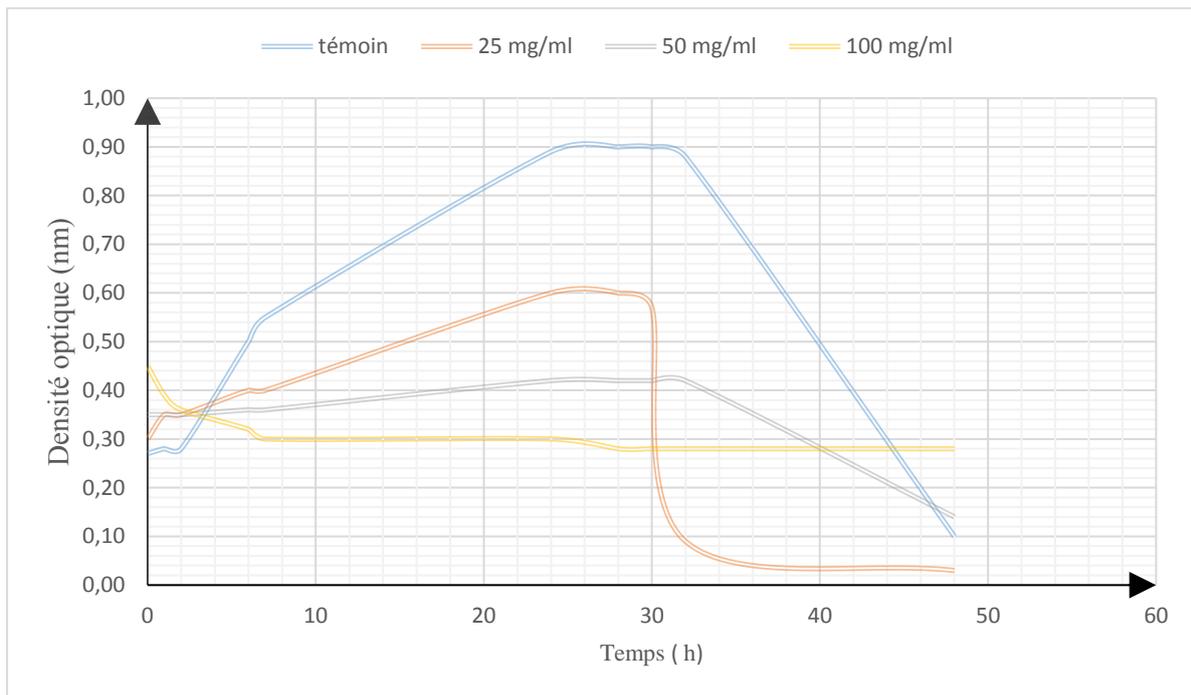
Dans la méthode de culture en bouillon, les rhizobia non traités (témoin) présentaient la plus haute DO, dans ce cas la croissance est rapide et optimale. La DO enregistrée avec une concentration (25 mg / ml) de Roundup avec les isolats MB10-F16-GB15-GR12-K24-C45 qui montrent qu'ils tolèrent cette concentration avec une croissance faible par rapport au témoin.

Cependant, la DO enregistrée avec une concentration (50mg/ml) de Roundup avec les isolats MB10-F16-GB15- K24 montrent une tolérance intermédiaire

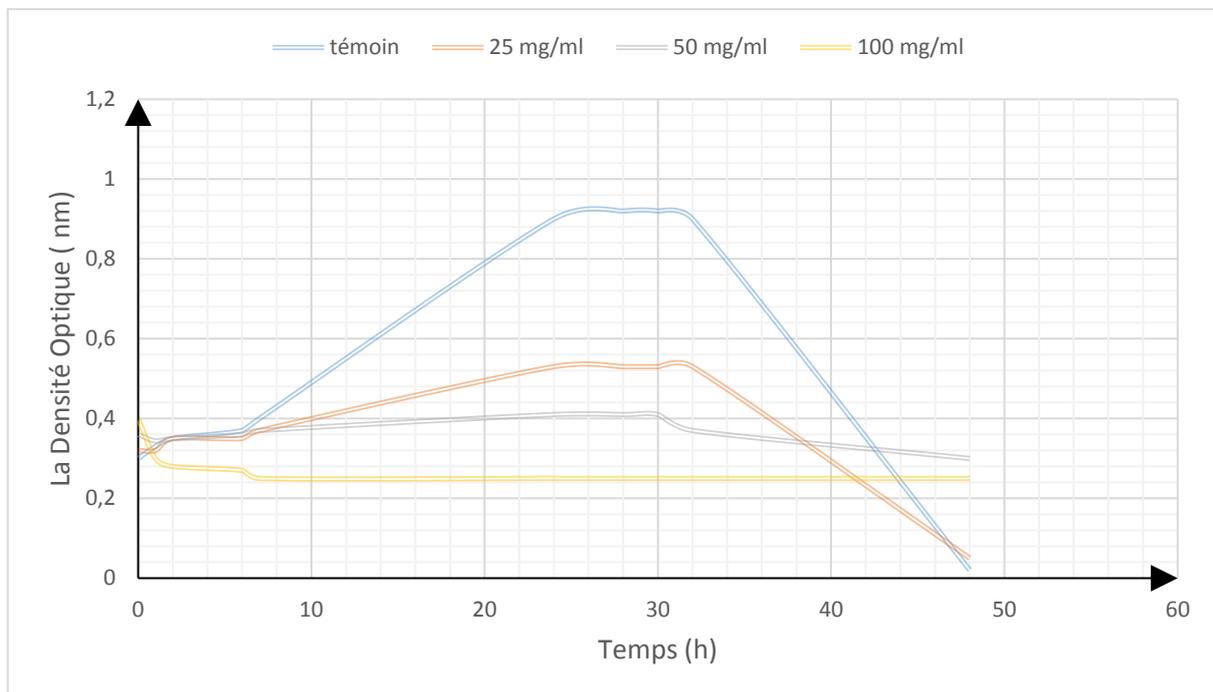
La densité optique enregistrée avec la concentration 100 mg/ml de Roundup est inhibitrice car il n'y avait aucune croissance pour tous les isolats.

Fox *et al* (2007) ont trouvé que l'effet de l'herbicide est dû à certaines substances chimiques qui se lient à des récepteurs sur les rhizobia et bloquent le signal envoyée de la plante affectant directement la survie des bactéries.

D'après les courbes, on peut aussi estimer la phase exponentielle des isolats, elle est au alentour de 18-20h.



**Figure 15 :** Courbe de croissance de la souche MB10



**Figure 16 :** Courbe de croissance de la souche F16

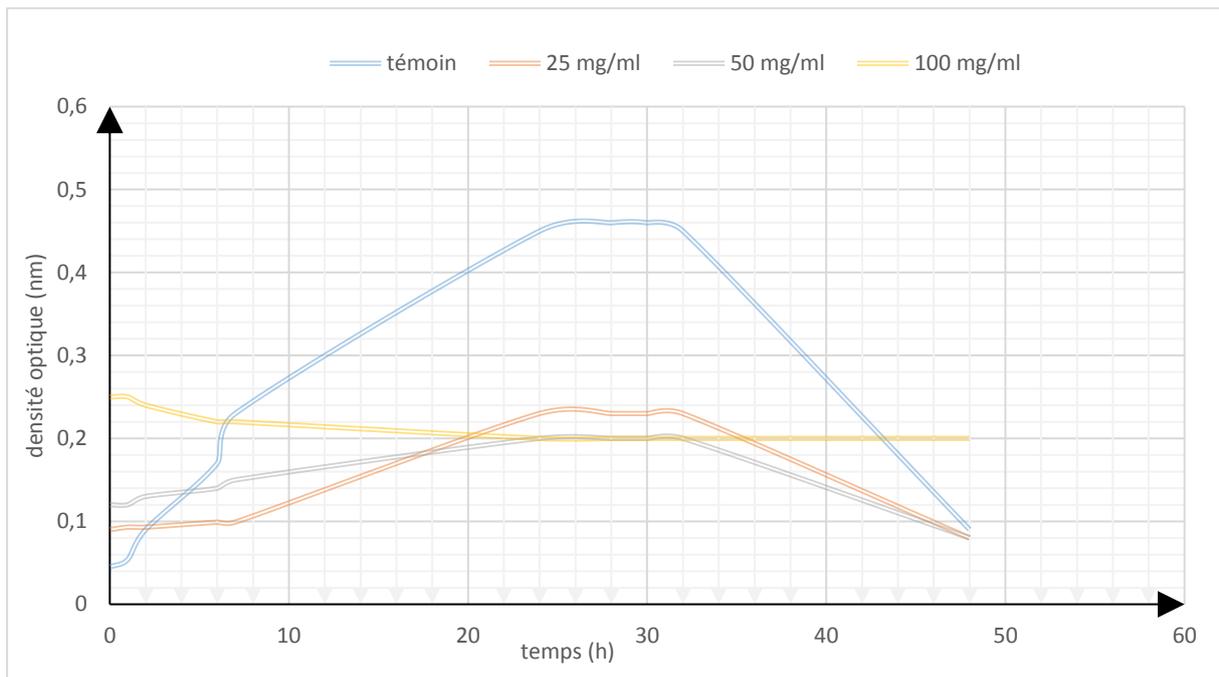


Figure 17 : Courbe de croissance de la souche GB15

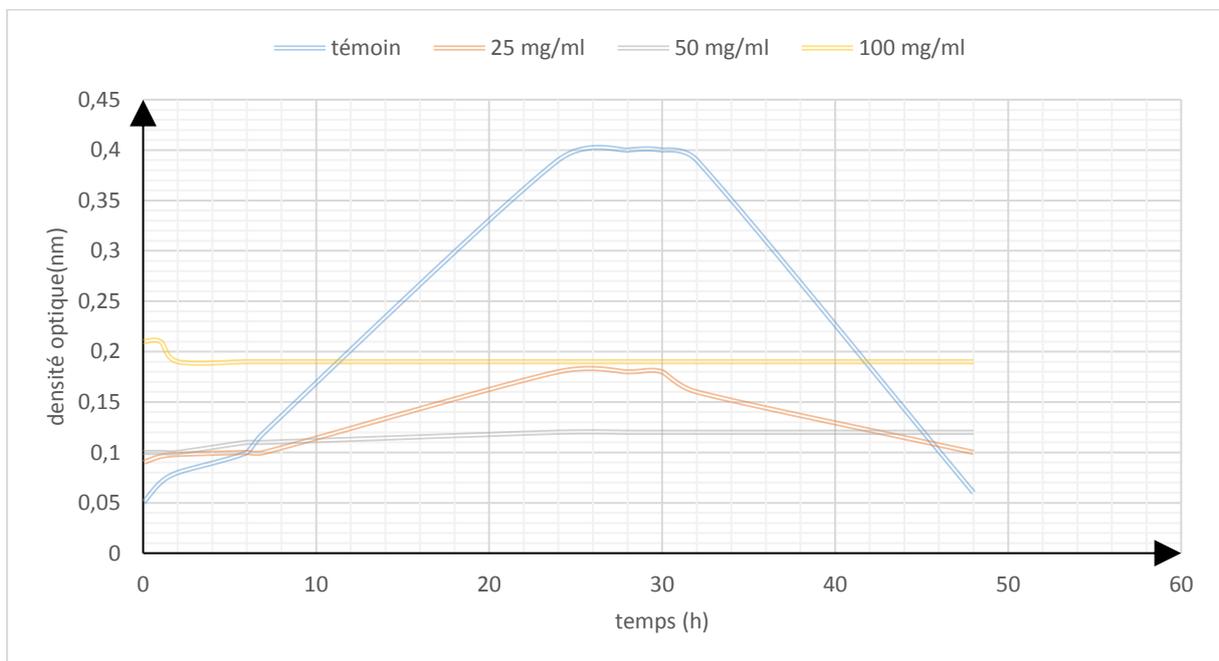


Figure 18 : Courbe de croissance de la souche GR12

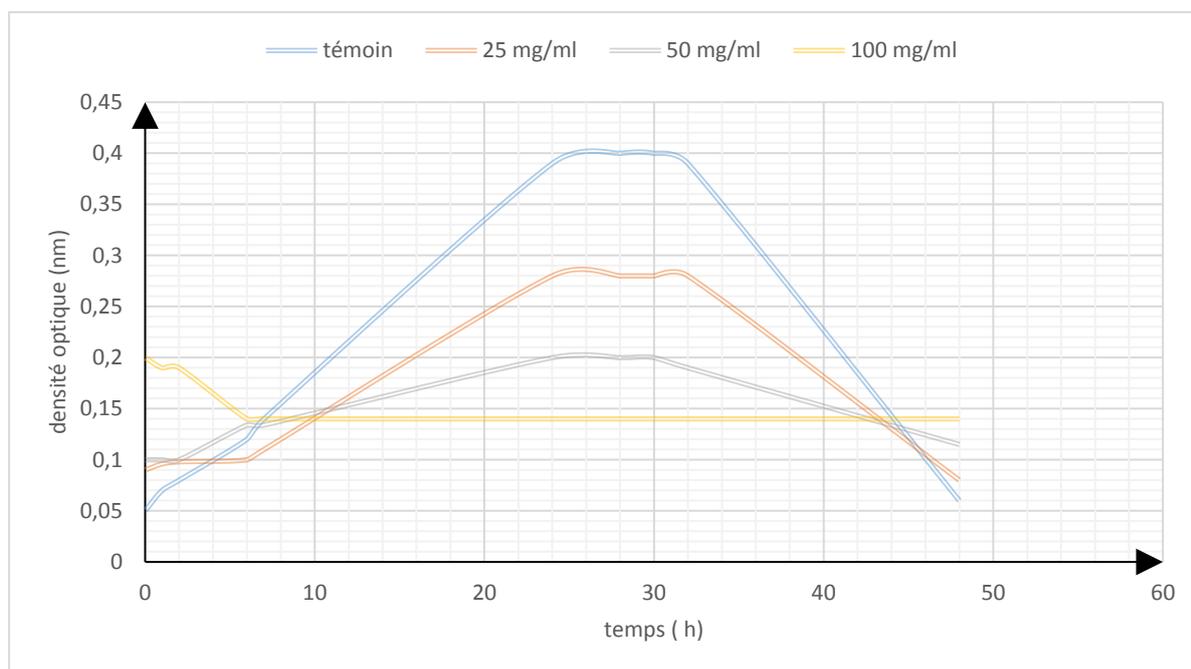


Figure 19 : Courbe de croissance de la souche K24

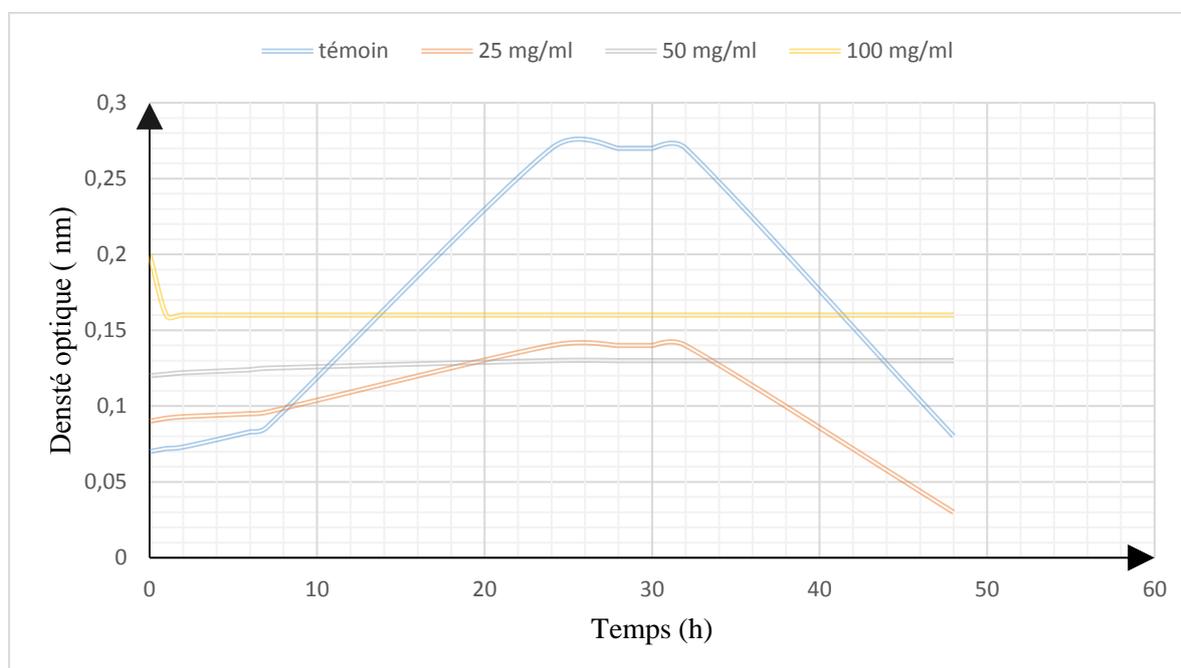
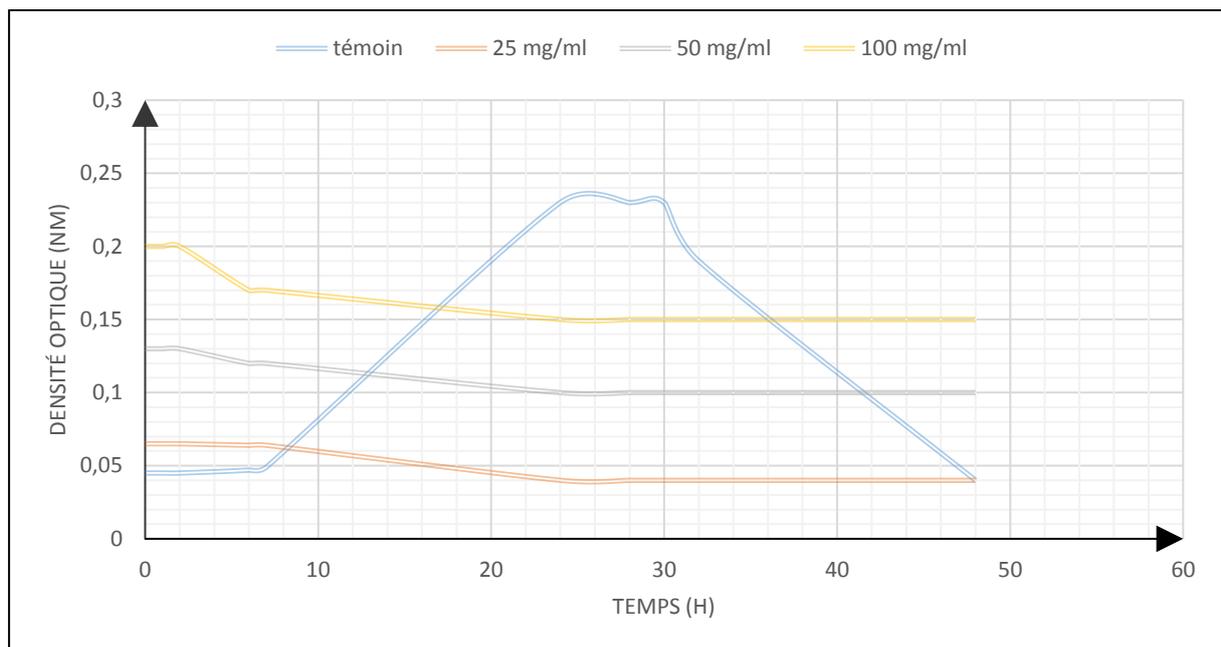
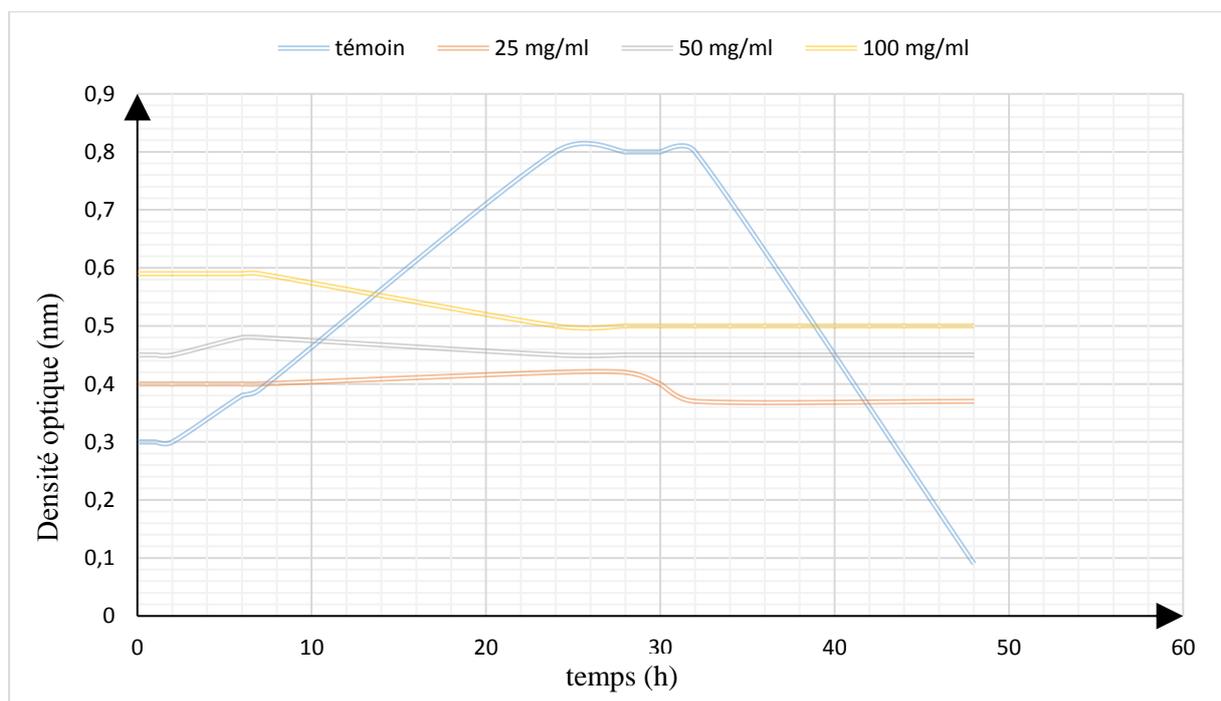


Figure 20 : Courbe de croissance de la souche C45



**Figure 21 :** Courbe de croissance de la souche MH6



**Figure 22 :** Courbe de croissance de la souche CK4

# Conclusion

## Conclusion

L'étude de la physiologie des rhizobia face aux contraintes environnementales peut apporter des indications utiles pour une meilleure compréhension des stratégies qu'elles adoptent pour résister aux conditions de privation de nutriments et être capables de survivre, les conditions redevenant favorables, de reprendre une activité et d'atteindre les sites de nodulation (Cacciari *et al.*, 2003).

Nous avons étudié la caractérisation phénotypique des souches isolées à partir de la wilaya de Biskra ; cette caractérisation comporte des tests nutritionnels, biochimiques sur la galerie API20E et la résistance aux antibiotiques, métaux lourds et l'effet de l'herbicide.

Après la réalisation de ce travail, on a obtenu les résultats suivants :

- Les souches présentent une résistance aux métaux lourds, les antibiotiques
- Concernant la sensibilité vers l'herbicide (Roundup) une concentration plus élevée induit une toxicité plus élevée pour les bactéries. car le nombre de colonies tolérantes au Roundup diminue lorsque la concentration augmente de 25 à 100µg/ml.
- Les souches sont cultivées sur YMA montrent que ce sont des bactéries Gram négative et ont une croissance rapide avec une température optimale de 28°C, les isolats sont des bactéries tolèrent des changements de la température de 4°C jusqu'à 40°C.
- D'après les tests nutritionnels et biochimiques sur la galerie API20 E, les souches assimilent à plusieurs sucres comme seule source de carbone et les acides aminés comme source d'azote.

Cette étude reste incomplète, il faut la finaliser par :

- Caractérisation moléculaire moléculaires tels que REP / PCR-RFLP, séquençage des gènes ARNr 16S et hybridation ADN/ADN pour bien mettre en évidence la diversité phénotypique.
- Etude *in vivo* l'effet des variations ( PH – température –antibiotiques , métaux lourds) sur la plante au cours de son développement .

- Suivre l'effet des autres herbicides *in vivo* et *in vitro* pour voir leurs effets sur les bactéries et la nodulation.

# **Bibliographie**

**Bibliographie**

Ahemad M., Khan M S. 2013. Pesticides as antagonists of rhizobia and the legume-Rhizobium symbiosis: a paradigmatic and mechanistic outlook. *Biochem Mole Biol* (1):63-7.

Alshaharani T S., Shetta ND. 2015. Phenotypic and biochemical characterization of root nodule bacteria naturally associated with woody tree legumes in Saudi Arabia. *Journal of environmental biology* 36(2) : 363.

Boulbaba L., Sifi B., Gtari M., Zaman-Allah M., Lachaâl M. 2007. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian journal of microbiolog* 53(3) : 427-434.

Brunel, B., Domergue, O., Maure, L., Brahic, P., Galiana, A., Josa, R., ... & Cleyet-Marel, J. C. (2007). Potentialité des associations symbiotiques plantes-micro-organismes pour réhabiliter des sites fortement dégradés en milieu méditerranéen. *Cahiers Agricultures*, 16(4), 324-329.

Cacciari I., Di Mattia E., Quatrini P., Moscatelli M C., Grego S L., De Paolis M R. 2003. Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress.

Dekak A., Benhizia Y. 2018, Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotyques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginesteae* (*Fabaceae*)

Deora, G S., Singhal K. 2010. Isolation, biochemical characterization and preparation of biofertilizers using Rhizobium strains for commercial use. *Biosci. Biotech. Res. Comm* 3(2) : 132-136.

Duhoux É., Nicole M., & Selosse, M. A. 2004. Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes: premier cycle, prépas, CAPES, Pharmacie.

El Hilali, I. 2006. La Symbiose Rhizobium–Lupin: Biodiversité des Microsymbiotes et Mise en Evidence d’une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*.

Elzanaty AM, Hewedy OA, Nagaty HH, Abd Elbary MI (2015) Molecular and Biochemical Characterization of Some Egyptian Genotypes Rhizobium (*Vicia faba*) Isolates. *J Bioengineer & Biomedical Sci* 5: 145. doi:10.4172/2155- 9538.1000145

Farhi A. 2001. Macrocéphalie et pôles d'équilibre : la wilaya de Biskra, L'Espace

Fossou R K., Kouassi N K. I. I., Kouadjo G C Z., Zako S M I B., Zézé A. 2012. Diversité de rhizobia dans un champ cultivé de pois d'angole (*cajanus cajanl.*)(légumineuses) à yamoussoukro (centre côte d'ivoire). *Agronomie Africaine* 24(1) : 29-38.

Fox J E., Gullledge J., Engelhaupt E., Burow M E., McLachlan J A. 2007. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(24) : 10282-10287.

Frédéric Dupont ., Jean-Louis Guignard. 2015. Botanique ; Les familles de plantes ; Professeur à l'université de Lille, Faculté des sciences ; pharmaceutiques et biologiques .

Gauri., Ashok K S., Rajendra P B., Shailija P., Manjinder K B., Ashok N. 2011. géographique. 3<sup>ème</sup> édit (tome 30), 245-255 pp.10)

Ghanbarian G A., Jafari E., Hatami A. 2011. Presentation of flora, life forms and chorology of plant species in the Jahrom area (Fars Province, Iran). *European Journal of Biology* 70(2): 1-11.

Jordan D C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 32(1) :136-139.

Lajudie P D., Dupuy N., Ndiaye A., Neyra M., Boivin C., Gillis M., Dreyfus B. 1998. *Acacia*: nodulation et rhizobiums associés.

Lysiuk R., Darmohray R. 2016. Pharmacology and ethnomedicine of the genus *Astragalus*. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine* (3) :46-53.

Mbengue M. 2010. Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula* , Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

N'zoué A., Domergue O., Molin L., Avarre J C., De Lajudie P. 2006. Tropical legume nodulating bacteria . *Molecular Biology of Tropical Plants*: 105-141

Obaton M. 1992. Facteurs pédoclimatiques limitant la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses. Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture. Wiley, Chichester p 57-66.

Ozenda P. 2004. Flore et végétation du Sahara : CNR. 3<sup>ème</sup> édition, Paris. pp. 279. pp.298..

Roger P A., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus, B., Sougoufara B. 1996. La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement?: conférence-débat de l'ORSTOM présentée le 30 mai 1996.

Sakrouhi I. 2017. Caractérisation physiologique et taxonomique des rhizobiums nodulant *Acacia* isolés des dunes de Merzouga et étude transcriptomique d'une souche modèle de la collection.

Saoudi M.2017. Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant la légumineuse du genre *Phaseolus*. Thèse de Doctorat en Génomique et Biotechnologie, Université Mentouri de Constantine, Algérie.

Sebihi F Z. 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum* Doctoral dissertation .Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes, Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. p 121.

Shahzad F., Shafee M., Abbas F., Babar, S., Tariq M M., Ahmad Z. 2012. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*). J Animal Plant Sci 22(2) : 522-4.

Shi C Q., Liu M., Zhang X., Cheng X., Wang C. 2015. Developmental and morphological studies of the suspensor and coleorrhizae in some taxa of the subfamily mimosoideae (fabaceae). Pak. J. Bot 47(1) : 341-345.

Singh B., Kaur R., & Singh K. 2008. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). African Journal of Biotechnology 7(20) : 304.

Singh G., Wright D. 2002. In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. Letters in applied Microbiology 35(1) : 12-16.

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

Teyeb H., Houta O., Douki W., Neffati M. 2012. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle d'Astragalus gombo collectée à partir de deux sites de la Tunisie. Journal de la Société Chimique de Tunisie 14 : 63-67.

Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli, R., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. Pallidum Desf.*, *H. Spinosissimum Subsp. capitatum*, *H. Carnosum desf.* et *H. Naudinianum Coss.* Sciences & Technologie. C, Biotechnologies (32) : 43-50.

Vincent J. M. 1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd , Oxford, United Kingdom.

Wei G H., Tan Z Y., Zhu M E., Wang E T., Han S Z., Chen W X. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53(5):1575-1583.

Zakhia F., & De Lajudie P. 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21(6-7): 569-576.

Zeze A., Mutch L A., Young J P W. 2001. Direct amplification of nod D from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environmental microbiology* 3(6) : 363-370.

Zhang X., Harper R., Karsisto M., Lindström K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41(1) : 104-113.

Site web 1 : cycle d'azote

[https://www.google.com/search?biw=1010&bih=466&tbm=isch&sa=1&ei=LwIRXZOdJuijgweatKDQCA&q=cycle+de+1%27azote+biofertilisants&oq=cycle+de+1%27azote+biofertilisants&gs\\_l=img.3...252534.260893..262372...0.0..0.1467.9646.2-3j51j3j4.....0....1..gswizimg.....0i8i30.VWg1ueuB2tE#imgrc=ZFhvMmJGSFcgM](https://www.google.com/search?biw=1010&bih=466&tbm=isch&sa=1&ei=LwIRXZOdJuijgweatKDQCA&q=cycle+de+1%27azote+biofertilisants&oq=cycle+de+1%27azote+biofertilisants&gs_l=img.3...252534.260893..262372...0.0..0.1467.9646.2-3j51j3j4.....0....1..gswizimg.....0i8i30.VWg1ueuB2tE#imgrc=ZFhvMmJGSFcgM)

site web 2 : les étapes de la nodulation

[https://www.google.com/search?q=les+%C3%A9tapes+de+nodulation&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcntCAht3iAhUPlxQKHTenCMQ\\_AUIECgB&biw=1010&bih=466#imgrcYGmsfbqb94uABM](https://www.google.com/search?q=les+%C3%A9tapes+de+nodulation&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcntCAht3iAhUPlxQKHTenCMQ_AUIECgB&biw=1010&bih=466#imgrcYGmsfbqb94uABM) :

Site Web 3 :

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

# Annexes

## Annexes

---

### Annexes

#### Annexe 1 : les milieux de culture

Milieu	Compositions	Quantité
YMB (Yest Mannitol Broth) (VINCENT, 1970).	Mannitol	10.00 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50 g
	MgSO <sub>4</sub>	0.20 g
	NaCl	0.10 g
	Extrait de levure	0.50 g
	Eau distillée	1000 ml
YMA (Yest Mannito Agar) (VINCENT, 1970)	YMB	1000ml
	Agar	15g
YMA-RC (VINCENT, 1970)	YMA	100ml
	Solution stock de rouge Congo	10 ml

#### Annexe 2

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir du la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95o, puis rincer l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20a 30 secondes ;

## Annexes

- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

### Annexe 3 : Tableau d'interprétation de la galerie API 20E

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

## Annexes

---

### Annexe 4 : la sensibilité des antibiotiques

	Norfloxiine				Neomycine				Nalidixique			
	10	15	20	25	10	20	30	40	110	120	130	140
<b>GR12</b>	++	+	+	-	+	-	-	-	++	+	±	-
<b>F16</b>	+++	+	+	±	+	-	-	-	++	++	+	-
<b>GB15</b>	+++	+	+	-	+	-	-	-	++	+	±	-
<b>MB10</b>	+++	±	±	-	+	-	-	-	++	++	+	±
<b>K24</b>	+++	±	-	-	+	±	-	-	++	++	+	±
<b>C45</b>	+	±	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+
<b>MH6</b>	++	+	+	±	+	±	-	-	+	+	+	±
<b>CK4</b>	+	-	-	-	++	+	-	-	++	++	±	-

++ : bonne ; + : moyenne ; ± : faible ; - : nulle .

## Annexe 5 : les densités optiques des souches testées

	concentrations	0	1	2	6	7	24	28	30	48
<b>MB10</b>	témoin	0,27	0,28	0,28	0,50	0,55	0,89	0,90	0,90	0,88
	25 mg/ml	0,30	0,35	0,35	0,40	0,40	0,60	0,60	0,57	0,50
	50 mg/ml	0,35	0,35	0,35	0,36	0,36	0,42	0,42	0,42	0,42
	100 mg/ml	0,45	0,39	0,36	0,32	0,30	0,30	0,28	0,28	0,28
<b>F16</b>	témoin	0,3	0,33	0,35	0,37	0,4	0,9	0,92	0,92	0,9
	25 mg/ml	0,32	0,32	0,35	0,35	0,37	0,53	0,53	0,53	0,53
	50 mg/ml	0,36	0,344	0,35	0,36	0,37	0,41	0,41	0,41	0,37
	100 mg/ml	0,4	0,3	0,28	0,27	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>GB1 5</b>	témoin	0,04 5	0,054	0,09	0,17	0,23	0,45	0,46	0,46	0,45
	25 mg/ml	0,09	0,093	0,093	0,099	0,099	0,23	0,23	0,23	0,23
	50 mg/ml	0,12	0,12	0,13	0,14	0,15	0,2	0,2	0,2	0,2
	100 mg/ml	0,25	0,25	0,24	0,22	0,22	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>GR12</b>	témoin	0,05	0,07	0,08	0,1	0,12	0,39	0,4	0,4	0,39
	25 mg/ml	0,09	0,096	0,098	0,1	0,1	0,18	0,18	0,18	0,16
	50 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12
	100 mg/ml	0,21	0,21	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
<b>K24</b>	témoin	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,39	0,4	0,4	0,39
	25 mg/ml	0,09	0,096	0,098	0,1	0,11	0,28	0,28	0,28	0,28
	50 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,134	0,134	0,2	0,2	0,2	0,19
	100 mg/ml	0,2	0,19	0,19	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
<b>C45</b>	témoin	0,07	0,072	0,073	0,083	0,086	0,27	0,27	0,27	0,27
	25 mg/ml	0,09	0,092	0,093	0,095	0,096	0,14	0,14	0,14	0,14
	50 mg/ml	0,12	0,121	0,122	0,124	0,125	0,13	0,13	0,13	0,13
	100 mg/ml	0,2	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
<b>MH6</b>	témoin	0,04 5	0,045	0,045	0,047	0,049	0,23	0,23	0,23	0,19
	25 mg/ml	0,06 5	0,065	0,065	0,064	0,064	0,04	0,04	0,04	0,04
	50 mg/ml	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,1	0,1	0,1	0,1
	100 mg/ml	0,2	0,2	0,2	0,17	0,17	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>CK4</b>	témoin	0,3	0,3	0,3	0,38	0,39	0,8	0,8	0,8	0,8
	25 mg/ml	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,42	0,42	0,4	0,37
	50 mg/ml	0,45	0,45	0,45	0,48	0,48	0,45	0,45	0,45	0,45
	100 mg/ml	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,5	0,5	0,5	0,5

### المخلص

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد الخصائص المظهرية و الغذائية والكيميائية باستعمال Galerie API20 E و اختبار مقاومته للمضادات الحيوية وحساسيتها للمعادن الثقيلة و المبيدات الحشرية، و أثبتت النتائج أن البكتيريا المدروسة سالبة الغرام و تنمو في درجة حرارة ملائمة 28°، و أثبتت أيضا قدرتها على استعمال العديد من السكريات كمصدر للكربون و أحماض أمينية كمصدر للأزوت

وجدنا تير في المقاومة ضد المضادات الحيوية ( نورفلكسين 20 ميكرو لتر /مل ، نيوميسين 25 ميكرو لتر /مل ) و حساسية لمختلف المعاد الثقيلة و المبيدات الحشرية .

الكلمت المفتاحية: ريزوبيا ، *Astragalus* ، تكوين العقد ، Roundup ، الخصائص الظاهرية

### Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer les propriétés physiologiques, nutritionnels, biochimique, ainsi que la résistance intrinsèques aux antibiotiques et aux métaux lourdes et suivre l'effet de l'herbicide.

Les résultats montrent que les isolats sont des bactéries Gram négative, à température optimale de 28°C et assimilent une large gamme des sucres comme source de carbone (principalement le Glucose et l'Arabinose) et les acides aminés (Arginine – Lysine et Ornithine) comme source d'azote et ils sont incapables d'assimiles le Tryptophane .

On trouve une variabilité dans la résistance aux antibiotiques (Norfloquine 20µg/ml et Néomycine 25 µg/ml) et une sensibilité vers les métaux lourdes. Les isolats résistent à l'herbicide Roundup jusqu'à 100µg/ml

Mots lés : Rhizobia , *Astragalus* , nodulation , Roundup , caractérisation phénotypique.

### Abstract

The objective of this study is to determinate the physiological, nutritional and chemical physiological

Properties and determination of their resistance to antibiotics, metals and follow the effect of herbicide .

The results showed that the samples were mobile Gram negative bacteria and ideal temperature for 28° growth. All sugars are used as a source of carbon and amino acids are used as the main source of nitrogen.

There is a variability in antibiotics resistance and sensivity to heavy metals and herbicide .

Key words: Rhizobia , *Astragalus* , nodulation , Rhoundup , phenotypic characterization,