



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 :
Amina Zeid

Le : mardi 29 septembre 2020

Thème

Caractérisation phénotypique et étude de la tolérance aux métaux lourds de quelques souches rhizobiennes

Jury :

M.	Bachir BENKADOUR	MAA	Université de Biskra	Président
Mlle.	Souad BABA ARBI	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances et à remercier: Madame BABA ARBI S. Docteur au Département des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Mohamed Khider-Biskra pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer.

Je remercie tous les jurys d'avoir accepté de faire partie du jury de cette mémoire. Je remercie également les ingénieurs de laboratoire de département pour tout l'aide que j'ai eu pour mettre fin à ce travail.

Je remercie ainsi monsieur yahia et mes amies pour leur soutien et leurs mots encourageants et Pour leur amitié sincère.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À ma raison d'être, mes chers parents :

*A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, à la source de la tendresse, à ma mère
(Houhou Razika) ♥que dieu l'accueille en son vaste paradis*

*A la personne qu'il me pousse vers l'avant et qu'il me donne l'espoir à vous mon père (Zeid
Mohamed Sghir) ♥*

*♥A mes sœurs : ma chère sœur Fatima et son marié, Roumaïssa la personne qui ma
soutient et m'a encouragé et son marié, et ma belle sœurs Selma je souhaite une longue et
heureuses vie pleine de bonheur*

♥A ma douce et précieuse (Aned Samira)

♥A mes frères : Oussama, Souhaib, Chouaib et ses femmes .Mon beau-frère Zahi

*Et toute les petites de ma famille surtout (Nounou et Joujou) à toute ma famille, mes
tantes et mes oncles.*

♥A mes très chères amies :Selsabil ,ikhlass, manel , Ahlem

A toute la promo de 2ème année master Microbiologie

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Chapitre I: symbiose *rhizobia* -légumineuse

1. Généralités :	5
1 .1 .La fixation biologique de l'azote :	5
1 .2 . Les fixateurs symbiotiques :	5
1 .3 . Les fixateurs libres :	5
1.4. Le macrosymbionte : les légumineuses.....	6
1 .5 . Le microsymbionte: les rhizobia.....	6
1 .6 .La symbiose rhizobium-légumineuses :	6
2. Intérêt de la fixation symbiotique d'azote:	7
2 .1 .Intérêt de la légumineuse à graine : <i>Vicia faba</i>	7
3 .Caractères généraux des <i>Rhizobia</i> :	8
3 .1 .Caractères symbiotiques :	8
4. Caractères culturels et biochimiques :	8
4 .1 . Caractères culturels :	8
4 .2 .Caractères biochimiques :	9
5 .Taxonomie des <i>Rhizobia</i> :	9
6 .Mécanisme de la fixation symbiotique de l'azote :	10
7. Utilisation des rhizobia en agriculture :	10

Chapitre II: l'effet de métaux lourds sur rhizobia

1. Définition de métaux lourds :	12
2 .Toxicité des métaux :	12
2 .1 .L'effet des métaux sur les microorganismes :	12
2 .2. Impact des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia :	13

Chapitre III: matériel et méthode

1. Matériel :	16
1.1. Matériel biologiques :	16
2. Méthodes :	16
2.1 Collecte et conservation des nodules :	16
2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules :	16
2.2.1. Stérilisation de la surface des nodules :	16
2.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boites :	16
2.2 .3. Incubation :	17
2 .2.4. Lecture :	17
2 .3 . Examen microscopique des isolats :	17
2.3.1 .Coloration de Gram :	17
2 .4 . Purification des isolats :	17
2 .5 . Conservation des isolats :	17
2 .5.1. Conservation à court terme :	17
3. Caractères biochimiques :	17
3.1 .Test de la catalase :	17
3 .2.Test de l'oxydase :	18
3 .3.Test au bleu de bromothymol (BTB) :	18
3 .4.Test de la mobilité :	18
3.5 .Croissance sur gélose glucose-peptone (GPA):	18
3.6. Test 3- céto lactose :	19
3.7. Test de citrate:	19
4. Tolérance à la salinité, à la température et pH :	19
4 .1. Tolérance à la salinité :	19
4.2. Tolérance à la température :	19
4.3. Tolérance au pH :	19
5. Caractérisation symbiotique (test de nodulation):	19
6. Résistance aux antibiotiques :	20
7.Étude de la tolérance des souches aux métaux lourds :	20

Chapitre IV : résultats et discussion

I. Partie réalisée :	23
1. Isolement du rhizobium :	23

2. Caractéristique morphologique :	23
2.1. Caractéristique macroscopiques :	23
2.2. Caractéristique microscopique :	23
3. Croissance sur YEM+rouge Congo :	24
4. Caractère biochimique :	25
4.1. Test des catalase et oxydase :	25
4.2 .Test de la mobilité :	25
4.3. Test BTB :	25
II- Partie non réalisée :	26
1 .Caractères symbiotiques (test de nodulation):	26
2 .Tolérance à la salinité, à la température et au PH :	28
2 .1. La température :	28
2 .2 .Na Cl :	29
2.3. pH :	30
3 .Caractère biochimique :	31
3.1. Test GPA :	31
3.2 .Test 3- cétolactose :	31
3.3 .Test de citrate :	31
4 .Résistance aux antibiotiques :	31
5. Étude de la croissance de souche <i>Vicia faba</i> en présence des métaux lourds :	32
Conclusion	34
Réferances Bibliographies	36
Annexes	41
Résumés	44

Liste des Tableaux

Tableaux 1 : Moyen de nombre de nodules par plante d'un quatre Région déférant	27
Tableaux 2: Différent T° entre PSR et les bactéries <i>rhizobiennes</i> dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie.....	30
Tableau 3 : Tolérance au pH entre bactéries <i>rhizobiennes</i> dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie et PSR et bactéries <i>rhizobiennes</i> dans différentes régions de Maroc.....	31
Tableau 4 : Croissance des souches <i>Vicia faba</i> en présence des différentes concentrations de métaux lourds.....	33

Liste des Figures

Figure1 : Aspect microscopique de la souche pp4 après coloration de Gram (Grossissement X1000).....	25
Figure2 : Aspect macroscopique de la souche pp2R1 sur milieu YEM+RC après 48H d'incubation	25
Figure 3 : Ineffectivité de nodule des souches <i>Vicia faba</i>	27

Liste des abréviations

SNF : Symbiotic nitrogen fixation

EPS: Exopolysacaride

PHB: Poly-hydroxybutyrat

LMR: Maximal résistant level

PSR: Phosphate solubilization ability of rhizobial

N₂: Azote moléculaire

NH₃: Azote ammoniacal, ou ammoniac

ETM: Éléments-Traces Métalliques

Introduction

En Algérie, la production des légumineuses fourragères et alimentaires constituent, en plus des céréales les défis majeurs de l'agriculture. Dans un contexte de sol pauvre en azote, les légumineuses sont intéressantes car elles ont la capacité de réaliser une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec les bactéries *rhizobiums* du sol. Elles développent des nodules sur leurs racines, dans lesquelles les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante (Nassira ,2014) .

Cette symbiose présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés. Les légumineuses à grains sont une source majeure de protéines chez l'homme et la nutrition animale, elles sont fréquemment cultivées en rotation ou en association avec les céréales afin d'améliorer leur nutrition en azote, les rendements des cultures et la fertilité des sols (Nassira ,2014).

La fixation de l'azote, c'est-à-dire la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac, est le phénomène de base qui ne rend pas l'azote disponible pour la biosphère. Parmi les organismes vivants, seuls quelques procaryotes ont cette capacité. Ils sont répartis sur la plupart des principaux phylums bactériens. Parmi celles-ci, certaines bactéries du sol, communément et collectivement appelées *rhizobium* ou *rhizobia*, peuvent former des symbioses avec les légumineuses. Ils induisent la formation d'organes spécialisés, appelés nodules, où ils fixent l'azote au profit de la plante. Ces symbioses ont une importance environnementale et agricole majeure puisqu'elles sont responsables de la majeure partie de la fixation biologique de l'azote atmosphérique sur Terre (Frédéric, 2001).

L'accumulation de métaux lourds dans les plantes présente un risque toxique pour l'Homme, car les plantes cultivées sont le point d'entrée dans la chaîne alimentaire. Par comparaison aux autres espèces, la laitue a tendance à présenter des teneurs élevées en cadmium, un métal lourd très toxique dont la concentration croît régulièrement dans les sols cultivés pour des raisons environnementales. En termes de sécurité alimentaire, il est donc important de produire des variétés accumulant des teneurs en cadmium réduites, et la laitue est un bon modèle pour débiter ce type d'approche (Walid ,2011)

L'objectif de notre travail est la recherche des *rhizobia* associés du la fève (*Vicia faba*) issues des régions de Biskra ainsi que l'étude de leur tolérance en présence des métaux lourds

(Détermination des concentrations critiques de certains métaux lourds permettant de différencier entre bactéries sensibles et résistantes)

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 chapitre2 : Effet des métaux lourds sur *rhizobia*

Et une deuxième partie (partie expérimental) construite à deux chapitres : un chapitre décrit les matériels et les méthodes utilisés pour la caractérisation des *rhizobia* symbiotiques des légumineuses. (Travail (tests) réalisés par l'étudiant) et étude Synthèse des tests réalisés dans les articles étudiés (les tests que nous pouvons les réalisés).

Le quatrième chapitre concerne la présentation et la discussion des résultats obtenus. (Présentation et discussion des résultats obtenus par l'étudiant et Synthèse et discussion des résultats obtenus dans les articles étudiés).

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

Première partie
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Symbiose *Rhizobia*- Légumineuse

1. Généralités :

1.1 .La fixation biologique de l'azote :

Les *rhizobiums* sont des bactéries particulières qui peuvent vivre dans le sol ou dans les nodules formée sur les racines des légumineuses. Ces nodules racinaires, elles forment une association symbiotique avec la légumineuse obtenant des nutriments de la plante et la production d'azote, appelé fixation biologique d'azote (Hussain et *al*, 2002).

La fixation symbiotique d'azote est un système associant aux plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries Gram négatif, Les résultats et interactions d'un groupe de recherche coopérative d'agronomes, de phytogénéticiens, de microbiologistes, de physiologistes et de moléculaires pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote (SNF) et le rendement N -dépendant du haricot commun sous une salinité modérée dans le bassin méditerranéen sont présentés. Ce dernier était associé à une grande diversité *rhizobienne*, y compris des espèces nodulant de haricot (Drevon et *al*.2000)

1.2 . Les fixateurs symbiotiques :

Sont représentés par :

Les *Rhizobia*, l'un des principaux groupes et le plus anciennement connu, s'associent aux légumineuses.

Les *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes (actinomycètes) associées à des arbres et des arbustes comme les *Casuarina*, les *Myrica* et les *Alnus* (Rabah ,2009).

Le processus symbiotique aboutit au développement, sur le système racinaire, de nodosités plus communément appelées nodules actinorhiziens ou actinorhizes, qui abritent le microorganisme. Au sein de ces structures, la plante hôte fournit des substrats carbonés à *Frankia* qui, en retour, transforme l'azote atmosphérique en ammoniac nécessaire à la croissance du partenaire végétal. Moins étudiée que la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, la symbiose actinorhizienne permet une fixation d'azote comparable et joue un rôle important au niveau écologique. (Benabdoun et *al* ,2012).

1.3 .Les fixateurs libres :

Sont représentés essentiellement par des *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhodospirillum* (Mouafek, 2010).

Ces sont caractérisées par la formation d'un nouvel organeau niveau des racines, le nodule ou nodosité, à l'intérieure duquel certaines cellules sont envahies par les microsymbiotes fixateurs d'azote qui se retrouvent séquestre dans des structures membranaires d'origine végétal formant un organite propre aux symbioses *rhizobia*-légumineuses et *Frankia*-plant actinorhiziennes : le nodule (Djouadi, 2018).

1.4. Le macrosymbionte : les légumineuses

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des ayant un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (ou *Fabacées*)

Les fabacées avec 10000 espèces représentent d'ailleurs les plus grands partis des légumineuses. Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines qui sont riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin , Soja) les trèfles ,les luzernes, le sainfoin et le lotie servent a l'alimentation du bétail (Chabbi ,2008).

1.5 . Le microsymbionte: les *rhizobia*

Les *rhizobiums* sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, gramme Négatives, aérobies et présent soit à l'état libre et en général dans le sol soi en association Avec des légumineuses. Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la Grande classe des eubactéries (Chabbi ,2008).

Les bactéries genre *rhizobium*, bâtonnet, mobiles, Aérobie, chimioorganohétérotrophe, leur source de carbone incluent les sucre, se trouve dans le sol et le nodule des racines, %GC (59_ 64), espèce de type : *R. leguminosarum* (Murray, 2004).

1.6 .La symbiose *rhizobium*-légumineuse :

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 des formes assimilables par les plantes. Bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges à partir de

Primordial racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige. C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries

A ce jour, les seules plantes non légumineuses capables de noduler avec des *rhizobia* (*Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium spp.*) sont de petits arbres tropicaux appartenant au genre *Parasponia*, de la famille des Ulmacées (Fassou, 2011).

2. Intérêt de la fixation symbiotique d'azote:

Il faut de 2 à 3 tonnes d'équivalent pétrole (du gaz naturel, le plus souvent) pour produire une tonne d'engrais azoté (L'azote produit industriellement par synthèse chimique) par le processus Haber-Bosch (gaz naturel pour fournir l'hydrogène et température et pression élevées nécessaires pour la réaction) (Selami ,2017).

- On produit environ 40 millions de tonnes d'ammoniac par le procédé Haber/ Bosh par année. C'est environ 1/5 de ce qui est produit par les bactéries fixatrices d'azote sur toute la planète.

- La moitié de l'engrais ajouté est absorbée par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé, ce qui engendre la pollution des nappes phréatiques.

- Les hauts rendements agricoles qui permettent actuellement de nourrir la population mondiale ne seraient pas possibles sans cette production industrielle d'engrais azoté.

En effet, l'azote de la fixation symbiotique a une contribution plus importante pour la croissance des plantes par rapport à celui des engrais azotés appliqués dans l'agriculture des pays en développement. L'azote fixé dans l'atmosphère contribue pour 50 à 60 % du N des légumineuses à graines, 55 à 60 % du N des arbres fixateurs d'azote, 70 à 80 % du N des légumineuses fourragères. Cette réserve d'azote, étant stockée dans les feuilles, les nodules ou bien les autres organes, reste plus longtemps disponible dans les sols comparativement à l'azote minéral fortement lessivé par les eaux. (Selami ,2017).

2.1 .Intérêt de la légumineuse à graine : *Vicia faba*

Connue sous le nom botanique de *Vicia faba* L., la fève appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionaceae*. *Vicia faba* L. est une légumineuses à graines annuelle, d'une taille d'environ 60 à 200 cm. La tige est creuse et rigide et la feuille porte 2 à 6 folioles. Les fleurs, sous forme de grappes, La grosseur de graine permet une distinction des deux sous espèces la fève, dont la graine aplatie avec un hile noir mesure 2 à 3 cm de

long la féverole dont la graine est plus petite, plus ou moins cylindrique ou ovoïde et légèrement comprimée. La racine pivotante, atteint environ 70 à 80 cm de profondeur., l'essentiel de la production est encore issu de variétés à fleurs colorées dont les graines contiennent des tanins L'origine de *V. faba* est floue, aucun géniteur sauvage n'est trouvé et plusieurs différences existent entre *V. faba* et d'autres espèces : *V. narbonensis*, *V. galilea*, *V. johannis* et *V. hyaeniscyamu*. La culture de *V. faba* major s'est développée dans les pays du Sud méditerranéen et en Chine et s'est étendue au 16^{ième} siècle à travers le Mexique et l'Amérique du Sud. La culture de *V. faba equina* s'est développée au Moyen Orient et en Afrique du Nord avec une plus grande concentration en Egypte. *V. faba* minor est présente en Ethiopie et est très développée en Europe (Odile, 2017) .

3.Caractères généraux des *Rhizobia* :

Plusieurs études ont été réalisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des *rhizobiums*. Ces études ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce (Dahbia ,2016).

3.1 .Caractères symbiotiques :

La symbiose est un processus composé de nombreuses étapes, chacune d'elle ayant pu être mise en évidence par l'inoculation de différents mutants symbiotiques (Corinne ,1985).

Il existe plusieurs type de symbioses fixatrice d'azote, certaines impliquent des *cyanobactéries* d'autres des bactéries a Gram –négatif photosynthétiques et diazotrophes qui vivent en colonies filamenteuses et qui peuvent interagir avec des plantes de aquatique tels que des ptéridophytes (symbiose entre *Azolla*, fougère aquatique, et *Anabaena*) (Djouadi, 2018).

4. Caractères cultureux et biochimiques :

4.1 . Caractères cultureux :

Sur le milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar), les *rhizobia* forment des colonies circulaires bombées, aqueuses, translucides, laiteuses ou blanches opaques, productrices d'EPS.

La plupart des *rhizobia* n'absorbe pas ou très peu le colorant de rouge Congo sur le milieu YEMA ce qui permet de distinguer les espèces contaminants colorées en rouge (Baba Arbi ,2016).

4.2 .Caractères biochimiques :

Les *rhizobia* sont des bactéries aérobies avec un système respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons.

Les *rhizobia* produisent de grandes quantités d'éléments extracellulaires (EPS) et également les lipopolysaccharides constitutives de la membrane externe et qui interviennent aussi aux différentes étapes de l'infection (Baba Arbi, 2016).

Généralement, les cellules des *rhizobia* contiennent des granules de poly-hydroxybutyrate (PHB) non colorés.

5 .Taxonomie des *Rhizobia* :

Ces symbiotes des légumineuses appartiennent à deux sous-classes phylogénétiques distinctes: les α et β -protéobactéries. Plus de 100 espèces regroupées en 13 genres : 11 appartenant à la sous-classe α - Protéobactéries et comprenant les genres: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* actuellement *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*. Deux genres appartenant à la sous-classe β -Proteobactéries, l'ordre des *Burkholderiales* dont *Burkholderia* et *Cupriavidus* anciennement *Ralstonia* (Frédéric ,2001).

La taxonomie étudie les relations naturelles existant entre les organismes et conduit à leur classification, condition préalable à l'identification de tout organisme. La taxonomie comprend (i) la caractérisation des organismes, (ii) la classification sur la base de la similitude, (iii) la nomenclature à donner des noms aux groupes et (iv) identifier les organismes inconnus, pour déterminer s'ils appartiennent ou non à l'une des unités classées et / ou nommées. Le concept central de la taxonomie bactérienne est l'espèce bactérienne. Contrairement aux animaux et aux plantes, les bactéries ont des caractéristiques morphologiques et physiologiques simples, limitées et insuffisantes pour les descriptions taxonomiques (Frédéric ,2001).

6 .Mécanisme de la fixation symbiotique de l'azote :

La fixation biologique d'azote atmosphérique est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement.

C'est le processus de réduction enzymatique de N₂ (azote moléculaire) en NH₃ (azote ammoniacal, ou ammoniac). Cette forme d'azote combinée représente la fin de réaction de fixation et le début de incorporation ,de l'azote fixé dans le squelette carboné .Ce processus est comparable à celui de la photosynthèse qui permet de produire de substance glucidiques à partir du gaz carbonique (CO₂) de l'atmosphère (Latati,2012).

Au sein du nodule, les *rhizobia* se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote. Cette réaction est possible grâce à une enzyme bactérienne : la nitrogénase, qui catalyse la réaction suivante :



7. Utilisation des *rhizobia* en agriculture :

Les légumineuses jouent un rôle important dans l'alimentation traditionnelle de nombreuses régions du monde car elles 'offrent une multitude d'avantages à la fois au sol et aux autres cultures cultivées en combinaison avec eux ou après les dans plusieurs systèmes de culture. La capacité des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique en association avec les *rhizobies* leur donne la capacité de pousser dans des sols très dégradés (Lesueur et *al*, 2012).

Mais lorsque les légumineuses nodulantes de *rhizobia* indigènes ne sont pas naturellement présentes, l'application d'inoculants *rhizobiens* est très couramment utilisée. L'utilisation d'inoculants *rhizobiens* efficaces de bonne qualité par les agriculteurs ont un réel potentiel pour améliorer les rendements des légumineuses dans les sols non fertiles nécessitant des applications élevées de minéraux les engrais.

Par exemple, des inoculant commerciaux efficaces pour le soja ont été testés dans différents endroits au Kenya L'application de l'inoculant *rhizobien* a considérablement augmenté les rendements en soja dans toutes les zones visées par le mandat (Lesueur et *al*, 2012).

Chapitre II :

E'FFETS DES METAUX LOURDS SUR *RHIZOBIA*

1 .Définition de métaux lourds :

Les éléments de la table périodique peuvent être classés, en fonction de certaines caractéristiques physiques et chimiques, en métaux et non métaux, à l'exception d'un petit nombre qualifié de métalloïdes. Le terme métaux lourds est un mot ambigu et dont la définition varie d'une source à l'autre. Jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale. , les métaux lourds regroupent les 53 métaux dont la densité est supérieure à 4-5 g/cm³. En fait, dans la plupart des cas beaucoup d'auteurs utilisent ce terme, à tort et à travers, pour caractériser les éléments toxiques. Ces éléments peuvent être classés en différents groupes sur la base de leurs caractéristiques (fonctions, propriétés électrochimiques) (Salah, 2018).

Les métaux lourds sont définis comme étant les éléments métalliques ayant une densité supérieure à 5 g/cm³ : cadmium, mercure, plomb, cuivre, nickel, zinc, cobalt, manganèse, chrome... Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces. Les plus toxiques d'entre eux sont le cadmium, l'arsenic, le plomb et le mercure. Ces éléments sont présents naturellement dans la croûte terrestre et dans tout organisme vivant, à des concentrations variables suivant les milieux et les organismes (Walid ,2011).

2 .Toxicité des métaux :

La toxicité des métaux et de leurs dérivés est connue depuis très longtemps. À une concentration plus élevée que la normale, les ETMs (Éléments-Traces Métalliques) peuvent entraîner des nuisances graves pour l'être humain, la faune, la flore et les micro-organismes. On distingue deux types de toxicité: la toxicité aiguë et la toxicité chronique. La première concerne les effets nocifs provoqués par une seule exposition à une forte dose de métal lourd de caractère plutôt accidentel (de courte durée). La seconde désigne les effets nocifs dus à une exposition répétée. Dans ce dernier cas, c'est l'accumulation de petites doses dans le corps qui provoque à long terme des effets indésirables (Soussou ,2013).

2 .1 .L'effet des métaux sur les microorganismes :

Les concepts de tolérance, résistance et sensibilité aux métaux peuvent être facilement confondus les uns avec les autres ou utilisés un peu à toutes les sauces.

De plus, les définitions précises des termes tolérance et résistance portent parfois à confusion dans la littérature. Le terme «tolérance » devrait être employé lorsque les organismes supportent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques, alors que le mot « résistance » 17 devrait être mentionné lorsque les organismes

survivent à la présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification spécifiques induits en présence du contaminant. Il faut donc. Porter une attention particulière à l'emploi de ces mots en contexte de contamination ou de décontamination des métaux. De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent la biodiversité des microorganismes retrouvés dans ces sols en comparaison avec des sols non pollués (Pier-Anne ,2009).

2.2. Impact des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/*rhizobia* :

Divers facteurs environnementaux tels que les métaux lourds 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).

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 plante. Selon des essais faits sur des sols contaminés par le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le plomb (Pb), ont rapporté uniquement une perte mineure de l'activité de la nitrogénase, de 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 (Maynaud ,2012).

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).

Le cadmium (Cd) par exemple est l'un des métaux lourds qui même à de faible dose est très toxique pour les organismes vivants. Son effet sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires est bien documenté. Au sein de la population de *Rhizobium* isolée des nodosités de *Trifolium pratense* L., le cadmium (Cd) affecte la diversité, la croissance et l'activité microbienne ce qui est directement corrélé avec la diminution du nombre de nodosités présentes sur les racines .

Deuxième Partie
PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre III :

MATERIEL

ET

METHODES

1. Matériel :

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

1.1. Matériels biologiques :

Nodules des légumineuses récoltées des sols de la région d'étude (Nodule de *Vicia faba*).

2. Méthodes : Travail (tests) réalisés par l'étudiant

2.1 Collecte et conservation des nodules :

- Les légumineuses (*Vicia faba*) ont été récoltées en période de floraison (mois de Mars).
- Les racines avec les nodules sont bien lavées à l'eau courante pour éliminer les débris de sol. Les nodules ont été détachés des racines (Benselama, 2015).

2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules :

2.2.1. Stérilisation de la surface des nodules :

Les nodules sont immergés dans une solution d'hypochlorite à 2 % pendant 4 min, ensuite, ils sont rincés abondamment (5 fois) avec de l'eau distillée stérile (V). (Mostapha et al ,2020).

2.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boîtes :

- Les nodules stérilisés sont mis dans des tubes stériles (à hémolyse ou à essai), avec un volume de 0.5 ml d'eau distillée stérile (1 nodule par tube). (Loubna et al ,2017 ; Ouslim et al ,2019).

- A l'aide d'une barre en verre stérilisée, on écrase les nodules pour obtenir une suspension de bactéroïdes (Somasegaran et Hoben ,1994).

- 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 YEMA au rouge Congo (**Annexe1**) dont la composition est celle donnée par (Somasegaran et Hoben ,1994).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des cadrans pour avoir des colonies bien isolées.

2.2.3. Incubation :

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à une température de 28°C et à l'obscurité (Mostapha et *al*, 2020).

2.2.4. Lecture :

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

2.3. Examen microscopique des isolats :

2.3.1. Coloration de Gram :

Un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram (**Annexe 2**) permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (comme les rhizobia) et les autres bactéries à Gram positif. La coloration de Gram doit son nom au médecin danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884 (Ouslim, 2015).

2.4. Purification des isolats :

Après l'isolement à partir des nodules, différents aspects de colonies peuvent être rencontrés sur les boîtes, ainsi différentes formes microscopiques peuvent être détectées, dans ce cas, une série de repiquage sur le même milieu (YEMA +0,0025% RC) est nécessaire pour avoir des souches pures. (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.5. Conservation des isolats :

2.5.1. Conservation à court terme :

Les isolats sont conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3g/l) en tube incliné sous forme de stries. Après incubation à 28°C pendant 48 h, les souches sont stockées à 4°C. Le CaCO₃ est utilisé pour neutraliser l'acidité du milieu (Kanouni, 2019).

3. Caractères biochimiques :

3.1. 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 : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ (Camille, 2006).

Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H₂O₂ à 10 volumes. La mise en évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (Abdlhafid, 2011).

3.2. Test de l'oxydase :

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral (Camille ,2006).

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur des disques imprégnés du réactif oxalate de N-diméthyle paraphénylène-diamine de couleur rose. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Abdlhafid ,2011).

3.3. Test au bleu de bromothymol (BTB) :

Chaque une des souches testées est mise en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu YEM gélosé additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur coloré de pH. Après cinq jours d'incubation à 28 C° (Ouslim ,2015).

On note si la souche a acidifié (couleur jaune) ou alcalinisé le milieu de culture (couleur bleu) .Dans le cas d'une acidification on parle de souche de *rhizobium* à croissance rapide et dans le cas d'une alcalinisation on parle de *Bradyrhizobium* (*rhizobiums* à croissance lente) (Ouslim ,2015).

3.4. Test de la mobilité :

Le milieu Mannitol Mobilité est un milieu de culture permettant de mettre en évidence l'utilisation du Mannitol et la mobilité bactérienne par ensemencement sur tubes inclinés par pique central à l'aide d'une anse de platine. Les caractères recherchés sont :

1. La dégradation du Mannitol par le virage de couleur ; le tube orange ou jaune indique la dégradation du Mannitol et le tube rouge indique qu'il n'y a pas de dégradation du Mannitol (Abdlhafid ,2011).
2. La mobilité : La recherche de la mobilité est réalisée en milieu mannitol- mobilité (Mouafek ,2010).

3.5. Croissance sur gélose glucose-peptone (GPA):

Le milieu glucose-peptone a été utilisé pour différencier les *rhizobies*, qui montrent généralement peu ou pas de croissance sur le milieu sans modifier le pH du milieu. Les contaminants comme les agrobactéries présentent une croissance massive sur le milieu avec un changement distinct de pH. La croissance des souches sur milieu basal d'YMA (Benselama et al ,2018 ; Sendeeep et al, 2015).

3.6. Test 3- cétolactose :

Tests biochimiques tels que ont été effectués pour différencier le *rhizobium* et *Agrobacterium* (Sendeeep et al, 2015),

3.7. Test de citrate:

L'utilisation du citrate par les isolats a été observée par la croissance sur des pentes de Gélose au citrate de Simon. Un changement de couleur distinct du vert au bleu fait référence à un test positif (Benselama et al ,2018).

4. Tolérance à la salinité, à la température et pH :

4.1.Tolérance à la salinité :

La tolérance bactérienne au Na Cl a été réalisée en évaluant les souches de croissance sur gélose ou bouillon YEM contenant des concentrations variées de Na Cl (0.03M ,0 ,8M, 0,127M jusqu'à 1,5 M).Les milieux sont inoculés à partir de pré culture bactériennes préparées sur milieu YMA. La croissance des bactéries est estimée par l'importance du diamètre de la colonie (ou la densité optique) en comparaison avec le témoin à concentration 0 ,001% (Mustapha et al ,2020 ; Ouslim et al ,2019 ; Y. Hajjam et al ,2016 ; Loubna et al ,2017).

4.2. Tolérance à la température :

La croissance à différentes températures a été réalisée par incubation des souches inoculées sur gélose ou bouillon YEM, à différentes températures de 5C°,38C° jusqu'à 45C°, pendant 72 heures. (Ouslim et al ,2019 ; Y. Hajjam et al ,2016 ; Loubna et al ,2017).

4.3. Tolérance au PH :

La tolérance des souches bactériennes aux pH acides et alcalins est réalisée sur milieu YMA ajusté aux valeurs de pH variables 4.5, 6, jusqu'à pH 10. Les plaques inoculées ont été incubées à 28 ° C pendant 72 heures (Ouslim et al ,2019 ; Y. Hajjam et al ,2016 ; Loubna et al ,2017).

5. Caractérisation symbiotique (test de nodulation):

Les graines de *Vicia faba* désinfecté à l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes puis dans l'hypochlorite de sodium à 12 ° pendant 3 minutes, soigneusement rincé à l'eau distillée stérile et mettre à germer sur des plats de Petrie contenant de la gélose à l'eau (0,8%) dans l'obscurité à 28 ° C (Mostapha et al ,2020 ; Djellali et al ,2017 ;Beimnet et al, 2020).

Après 4 à 5 jours, la racine laisses obtenus ont été transférés dans des pots en plastique désinfectés(ou transférées dans une fiole de 250 ml rempli de milieu liquide de Jensen. Chaque plant à été inoculé avec 1 ml de suspension rhizobiale (~10⁸cellules ml⁻¹) Contenant 150g de sable stérile Les plants ont été inoculés avec 1 ml de bactérie culture contenant (10⁸ bactéries / ml) (Loubna et al ,2017 ;Ouslim et al ,2019).

Les plantes ont été cultivées dans des chambres de croissance à 23°C, 10 h jour / 17°C, 14 h nuit photopériode. Trois répétitions ont été effectuées par isolat. Contrôle les traitements comprenaient des témoins négatifs non fertilisés et non inoculés et positifs non inoculés, fertilisés à l'azote (5 mM KNO₃) contrôles. Le développement des nodules à été périodiquement enregistré période de croissance de quarante-cinq jours (Djellali et al ,2017).

Des cultures bactériennes ont été réalisées, en milieu YEM pendant 48 h à 28 ° C, pour chaque souche bactérienne pour obtenir une concentration finale de 10⁹ CFU ml⁻¹ (Omar et al, 2019).

6. Résistance aux antibiotiques :

Le principe est basé sur l'observation de la croissance des bactéries *rhizobium* en présence des antibiotiques diffusés à partir de disques imprégnés déposés sur YEMA. Les antibiotiques utilisés étaient ampicilline (10 µg), acide nalidixique (30 µg), streptomycine (10 µg), érythromycine (15 µg), tétracycline (30 µg), chloramphénicol (30 µg), rifampicine (30 µg) (Ouslim et al ,2019).

7.Étude de la tolérance des souches aux métaux lourds :

Le test est réalisé sur milieu solide YMA. Il permet d'étudier la capacité des souches isolées de *Vicia faba* à croître et à résister aux métaux lourds (Abou Shanab et al, 2007).Les métaux lourds utilisés ainsi que leurs concentrations sont choisis selon des études faites par Fatnassi et al, (2014). 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 (Fatnassi et al, 2014).

Sulfates de cuivre (Cu So₄, 5H₂O) : 0,25Mm et 2 Mm

Acétate de plomb (Pb (OOCCH₃)₂, 3H₂O): 3,35Mm et 3,6Mm et 4Mm

Sulfate de cadmium (3 CdSO₄, 8 H₂O): 0,8Mm et 1,8Mm et 4,5Mm

Sulfate de zinc (Zn SO₄, 7 H₂O): 1,2Mm et 1,75Mm

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, 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 (Abou Shanab et *al*, (2007)).

On préparer deux boîtes de Pétri du chaque concentration des métaux lourds et on fait ensemencement en spot à partir des isolats de *Vicia faba*. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, la présence ou l'absence de croissance est notée pour chaque concentration de métaux.

Chapitre IV:

Résultat et discussion

I. Partie réalisée :

1. Isolement du *rhizobium* :

Isolement des bactéries à partir des nodules racinaire récolté *in natura* nous permis d'obtenir un collecte 12 isolat issu de *Vicia faba* ont été récoltées en période de floraison (mois de Mars).à partir déchantions de plant provenons à wilaya de Biskra et on l'étale sur une boîte de Pétri contenant le milieu YMA dont la composition est celle donnée par (Somasegaran et Hoben (1994). Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à une température de 28°C et à l'obscurité.

2. Caractéristique morphologique :

2.1. Caractéristique macroscopiques :

Toutes les souches purifiées les caractéristiques morphologique des *rhizobia*. Elles forment sur milieu YMA gélose des colonies homogènes le long des stries, elles sont circulaires de 2 à 4 mm de diamètre, à contour régulier, de surface lisse, bombée, et d'une couleur blanchâtre a crème et marquées par une très forte mucosité qui augmente avec le temps d'incubation .qui en observe des caractéristiques similaires de *Rhizobium* isolés de la féverole (Ouslim ,2015).

La viscosité des colonies est due à une production massive d'exopolysaccharides qui peuvent avoir un rôle dans la tolérance des souches à la salinité.

2.2. Caractéristique microscopique :

L'aspect microscopique est visualisé après coloration de Gram : 12 isolat présentant une forme coccobacille négatif le reste des isolats sont à gram positif .Ces caractères morphologique observés sont en accord avec ceux d'écrits pour les *rhizobiums* (Ouslim ,2015) et ce sont les isolats que nous avons gardés pour la suite de travail.

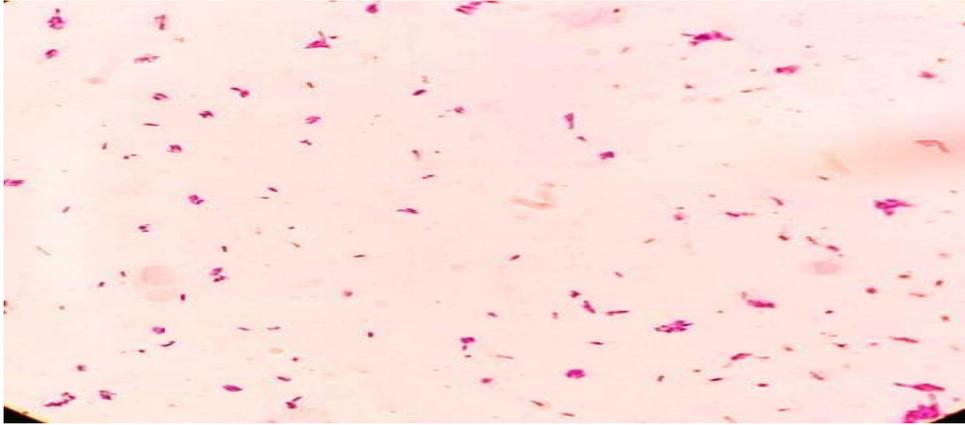


Figure1 : Aspect microscopique de la souche pp4 après coloration de Gram (Grossissement X1000)

3. Croissance sur YEM+ Rouge Congo :

Le test de croissance des souches sur milieu YEM gélose additionné de rouge Congo détectable après 48h d'incubation, suggère que les *rhizobia* sont pures car elles n'absorbent le colorant. Ces critères ont été observés depuis longtemps chez la majorité chez *rhizobia*. Nos résultats sont similaires à ceux décrits par Hajjam et al (2016) qui rapportent que tous les isolats de *V. faba* identifiés sur milieu YEM ont montré une réaction négative au rouge Congo et le même résultat dans l'étude d'Ouslim et al (2019).

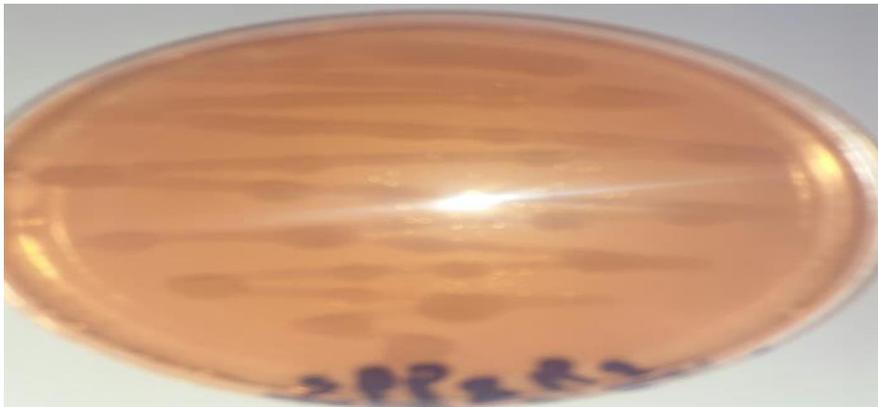


Figure2: Aspect macroscopique de la souche pp2R1 sur milieu YEM+RC après 48H d'incubation

4. Caractère biochimique :

4.1. Test des catalase et oxydase :

Il est à noter que l'ensemble des souches étudiées sont catalase positive alors il y a un dégagement d'oxygène issu de la dégradation de l'eau oxygénée (Abdlhafid ,2011).

Les résultats d'oxydase indiquent que les isolats testés sont oxydase positive, c'est-à-dire que ces bactéries possèdent une enzyme dans la chaîne respiratoire cytochromique bactérienne (Camille ,2006).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les *Rhizobia* sont des bactéries aérobies (Abdlhafid ,2011).

4.2 .Test de la mobilité :

Toutes les souches mobiles et dégradent préférentiellement et rapidement le mannitol (Abdlhafid ,2011 ; Mouafek ,2010).

4.3. Test BTB :

Permis les différences caractérisant les *Rhizobium* des *Bradyrhizobium* c'est la vitesse de croissance *in vitro* qui est beaucoup plus rapide pour les premiers (temps de génération de 3 à 4 heures) que celle des seconds (temps de génération de 6 à 8 heures) mais il existe d'autres caractéristiques qui permettent de les distinguer comme l'acidification ou l'alcalinisation du milieu de culture (Jordan, 1984).

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes .Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Ouslim, 2015).

Le plus part des souches de *vicia faba* à testées ont produit des réactions acide sur les YEM solide + BTB.

A l'exception de la souche de *Vicia faba* qui n'a produit aucune modification du pH du milieu. Ce caractère suggère que la majorité des souches peuvent donc appartenir au genre *Rhizobium*, Cette déduction reste à confirmer par des méthodes plus fiables notamment celle de biologie moléculaire (Ouslim, 2015).

II- partie non réalisée :

1 .Caractères symbiotiques (test de nodulation):

Tableaux 1 : Moyen de nombre de nodules par plante d'un quatre Région déférant.

L'auteur	Région d'étude	Moye de nombre de nodules/plante
Djellali et al ,2017	Bejaia (Onze site)	Cinquante huit
Benselama et al ,2018	Algérie	Vingt
Mostapha et al ,2020	Maroc (Deux région)	Soixante-seize
Ouslim et al ,2019	L'ouest Algérie	Quarante

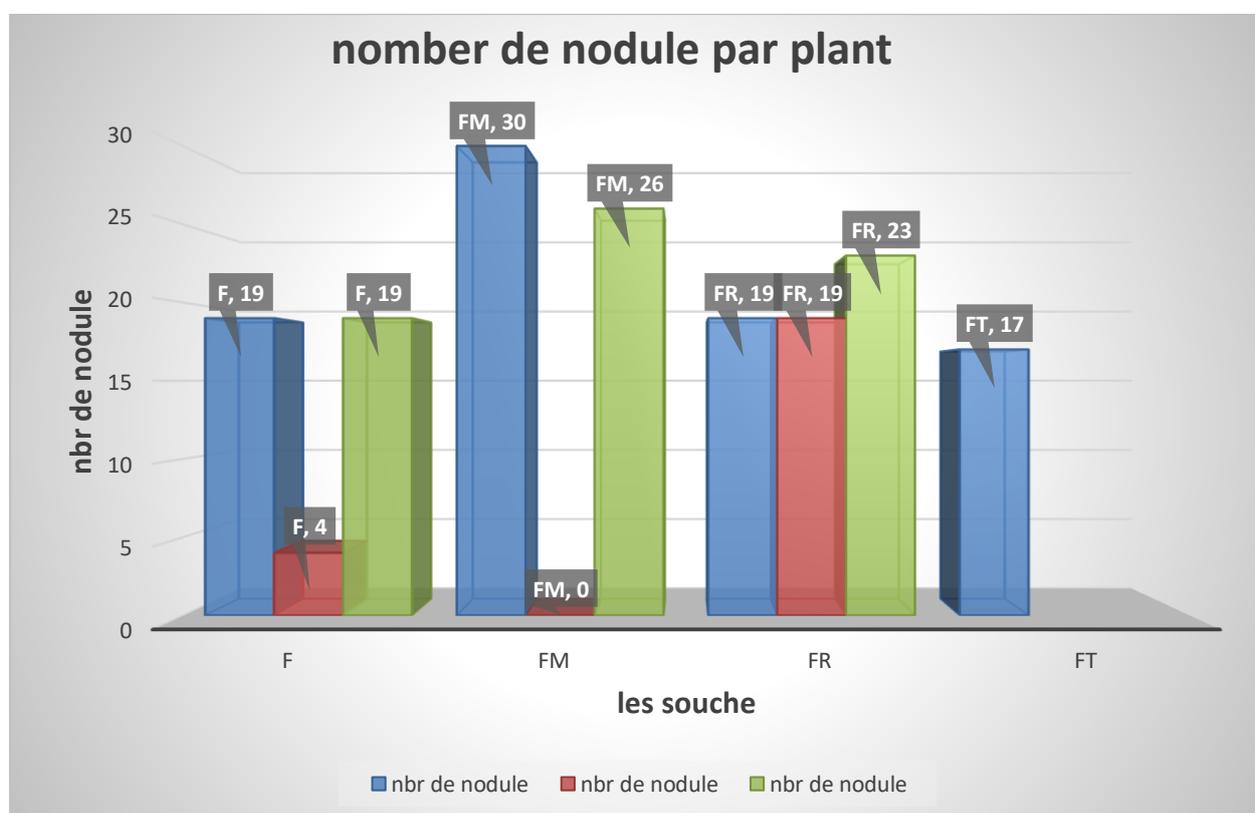


Figure 3 : Infectivité de nodule des souches *Vicia faba* (Benselama et al ,2018).

Selon Benselama et *al.* (2018) dans la région d'Algérie, toutes les souches isolées ont peu noduler leur plante hôte *Vicia faba*. Bien qu'aucun nodule n'ait été observé sur les plants de racines non inoculées. Le nombre moyen de nodules varie de 4 à 16 par plante. Le plus infectieux des souches sont F141 et 243 avec 19 nodules formés par plantes. Les souches F228 et F207 sont les moins infectieuses.

Selon Djellali et *al.* (2017) Cinquante-huit souches rhizobiennes ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Vicia faba* dans onze sites de la région de Bejaia. La plupart des souches partageaient une forte similarité de séquence du gène avec *Rhizobium leguminosarum* sv. *Viciae* ; le travail a montré que toutes les nouvelles souches étaient phylogénétiquement apparentées à celles décrites à partir de *V. faba* dans plusieurs pays africains, européens, américains et asiatiques.

Dans les régions arides et semi-arides de l'Haryana (Inde) une diversité génétique significative est remarquée parmi les *rhizobiums* naturels nodulant *V. faba*, en corrélation avec leur origine géographique et les caractéristiques du sol. Tous les sols de cette étude dans les régions arides et semi-arides de l'Haryana (Inde) contenaient des *rhizobiums*, bien que le *Vicia faba* cv *Minor* cultivar n'a pas nodulé dans le sol Akbou et le cultivar Equina n'a pas nodulé dans les sols Kherata et Amtik. Ça pourrait s'expliquer par la faible diversité des génotypes des *rhizobia* rencontrés dans ces sols.

Le résultat d'étude de Djilali et *al.* (2017) les nodules sont tous situés au secondaire au niveau des racines du haricot de même forme et de taille 2 à 3 mm.

Selon Ouslim et *al.* (2019), pour comparer l'efficacité des souches infectieuses dans la région ouest Algérie la hauteur des tiges, le nombre de nodules et la biomasse de la partie aérienne des plantes récoltées sont mesurés. Selon le nombre de nodules formés, une seule souche était la plus efficace (30 nodules enregistrés). Elle était originaire de la région de Mostaganem; suivie de trois souches (FR36, FR8.3 et FR14.2) de la wilaya de Mascara, et une souche (FT16) d'Ain Témouchent et une autre (FZ7.1) de la wilaya de Relizane avec respectivement 19, 19, 23, 17 et 24 nodules enregistrés. Deux souches (FM24.5 et FR26.4.2) ont montré le plus petit nombre de nodules.

En ce qui concerne la hauteur de la tige de la plante, *Vicia faba* inoculée avec la souche FM24 originaire de la wilaya de Mostaganem a présenté le meilleur développement avec une hauteur de plus de 90 cm suivie de FM19.4, FZ28.4 et FR14.2 avec environ 79 cm

de haut, tandis que la taille du contrôle était de 52 cm .Toutes les plantes ont augmenté la biomasse au-dessus du sol par rapport au témoin mis à part les deux souches FR31.4 et FM20.4 proviennent de Mascara et Mostaganem respectivement (Ouslim et al ,2019) .

La souche la plus efficace est la FM24 issue de Région de Mostaganem; avait le plus grand nombre des nodules et induit une meilleure croissance de la plante hôte révélée par la hauteur de la tige. Les souches n'a pas nodule ont montré des effets en poids sec des pousses et des racines des plantes comparant au contrôle. De nombreuses études ont montré que le poids sec est un bon indicateur de l'efficacité car il y a une relation entre la production de matière sèche et la capacité des légumineuses à fixer l'azote (Ouslim et al ,2019).

Selon Mostapha et al, (2020), après quarante jours de croissance des plantes *Vicia Faba* dans les régions Maroc (Deux région) aucune des trois souches formées des nodules F8Z1, F39D2 et F40D2.

2 .Tolérance à la salinité, à la température et au pH :

2 .1.La température :

Selon Ouslim et al. (2019), les résultats de l'analyse physiologique dans L'ouest Algérie ont révélé que la plupart des souches *Vicia faba* étaient mésophiles et croissaient à des températures variant de 15 à 40 ° C sauf pour deux souches (FC12.3.2 FR14.2.3) provenait respectivement de Tlemcen et de Mascara, les deux ont montré une bonne croissance sur YEM solide à 10 ° C.

Les résultats de l'analyse physiologique ont révélé que la plupart des souches étudiées ont peu tolérer des températures de 35 ° C avec une croissance optimale à 30 ° C pour toutes les souches, mais ils ont également peu croître à 5 ° C (tableau 2). Les résultats de ce test ont montré que les *rhizobiums* étaient mésophiles et pourrait croître à des températures comprises entre 10 C° et 37 ° C avec une température de croissance optimale de 28 ° C.

Le résultat d'étude de Hajjem et al (2016) des souches PSR (phosphate solubilization ability of *rhizobial*) aux différentes températures (32C°, 35C° ,38C°) représente que la plus part des souches PSR est résistant à la température (32C°et 35C°) sauf la température (38C°) quelque souche il est résistance.

Tableaux 2: Différent T° entre PSR et les bactéries *rhizobiennes* dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie

Température	5C°	10C°	15C°	32C°	35C°	38C°	40C°
PSR	-	-	-	++	++	+++	-
bactéries <i>rhizobiennes</i> (l'ouest d'Algérie)	+	++	++	-	+++	-	+

Croissance très significative (+++), croissance significative (++) , croissance moins abondante(+)

2.2 .Na Cl :

Les résultats obtenus par Ouslim et *al* (2019) montrent que les souches nodulant *Vicia faba* présentaient une grande variation de croissance aux différentes concentrations de sel. Toutes les souches avaient une bonne croissance sur YEMA complétée par 0,6M Na Cl et la moitié d'entre eux peuvent tolérer la présence de 1M Na Cl. Il a été rapporté que la concentration en sel pouvait diminuer l'efficacité de la symbiose *rhizobium* / légumineuse des événements précoces inhibiteurs symbiotiques tels que la chimiotaxie (Ouslim et *al*, 2019).

Trente pourcent des souches étaient tolérantes à 1 M Na Cl et les souches isolées de *Vicia faba* pourrait tolérer jusqu'à 5 M de Na Cl.

Hajjem et *al* (2016) rapporte quelles souches isolées des nodules *Vicia faba* en Égypte et en Italie n'ont pu croître qu'à 0,1 et 0,2 M de Na Cl. Les résultats de la tolérance des souches PSR à la présence du sel indiquent que la majorité de ces souches résiste à des concentrations de 3 à 6% Na Cl.

En revanche, les résultats de Mustapha et *al* (2020) indiquent que tous les souches isolées des nodules *Vicia faba* en Maroc sont très sensibles au sel car aucun souche poussé en présence de 0.0 85 M de Na Cl et tous ont poussé dans des milieux contenant 0.034 M de Na Cl, mais seulement trente pourcent ont poussé sur 0.068M. On sait que les conditions édaphiques et climatiques ont un grand impact sur la population bactérienne du sol.

Les souches isolées des nodules *Vicia faba* ne pouvaient pas tolérer des concentrations de sel supérieures à 0.0 80 M alcaline car les sols dans les deux régions étudiées au Maroc ne sont pas salins et neutres.

2.3. PH :

Tableau 3 : Tolérance au pH entre bactéries *rhizobiennes* dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie et PSR et bactéries *rhizobiennes* dans différentes régions de Maroc

PH Les souches	4	4,5	5	6	6,5	7,5	8	8,5	9
Les souches en l'ouest d'Algérie	/	+++	+++	/	/	/	/	/	+++
PSR	+++	/	/	/	+++	/	+++	/	/
Les souches en Maroc	/	++	/	--	+++	+++	--	--	-

Croissance très significative (+++), croissance significative (++) , croissance moins abondante(+)

D'après Ouslim *et al* (2019) les souches associées à *Vicia faba* étaient tolérantes à un pH variant de 5 à 9 et selon le tableau 3, les différents résultats indiquent que les rhizobiums pouvaient tolérer un pH de 4,5 à 9.

Par contre les résultats rapportés par Hajjem *et al* (2016) des souches PSR dans différentes régions géographiques du Maroc montrent que soixante-dix pourcent de ces dernières tolèrent des pH =4 jusqu'à pH=8. En plus, Mustapha *et al.* (2020) rapportent que tous les isolats dans deux régions au Maroc (Doukkala et Zaer) ont développé dans une gamme de pH de 6,5 à 7,5, mais aucun n'a poussé dans des milieux avec des valeurs de pH inférieures à 6 ; trente-cinq pourcent n'ont pas réussi à croître à pH 8 et quatre-vingt-dix-huit pourcent n'ont pas grandi à pH9.

La caractérisation phénotypique des isolats de *Vicia faba* a été étudiée afin de sélectionner les isolats les plus efficaces et résistants aux stress environnementaux. Certains isolats étaient tolérants à une acidité, une alcalinité, une salinité et une température extrêmes. Plusieurs études ont montré l'importance d'étudier la capacité des isolats de *Vicia faba* ainsi

que la tolérance aux contraintes environnementales. Ont rapporté que les souches de *Rhizobium leguminosarum* varient dans leurs résistances au stress. Cette fluctuation est un avantage pour une souche pour survivre sur l'autre dans un environnement de sol extrême (Hajjem et al ,2016).

3 .Caractère biochimique :

3.1. Test GPA :

Après un jour indiquant le caractère de *rhizobium* comme règle conventionnelle. La croissance des souches de *rhizobium* est pauvre sur les milieux GPA tandis que l'autre des bactéries se développe bien sur ce support (Sendeeep et al, 2015).

Selon Benslama et al. (2018) peu ou pas de croissance sur les milieux de GPA sans altérer le PH. Ce fait fournit une preuve supplémentaire de la pureté des isolats *rhizobiens* , une mauvaise croissance sur GPA peut s'expliquer comme telle que les *rhizobia* ne préfèrent pas la peptone comme source d'azote, de vitamine ou de facteur de croissance ou d'acides aminés (Benslama et al ,2018) .

3.2 .Test 3- cétolactose :

Une conformité supplémentaire des *rhizobia* à été réalisée sur la gélose au cétolactose à montrer que les 15 isolats étaient négatifs pour la production de 3-cétolactose à partir de lactose sans jaune zone de Cu₂O autour des colonies ont été observées qui était indicatif d'*Agrobacterium* .La production de 3- cétolactose à partir du lactose est limitée à espèce d'*Agrobacterium*. De même, isolé *Rhizobium japonicum* et Brady Colonies de *Rhizobium japonicum* (Sendeeep et al, 2015)

3.3 .Test de citrate :

Les isolats de nodules et de rhizosphère de *Vicia faba* ont montré un citrate négatif (Benslama et al ,2018).

4 .Résistance aux antibiotiques :

L'antibiogramme réalisé dans souche *Vicia faba* en L'ouest Algérie ont montré que soixante-dix pourcent des souches *Vicia faba* présentaient une résistance aux : tétracycline,

érythromycine et la rifampicine. Cinquante-six pourcent des souches étaient résistants à l'ampicilline, la streptomycine et le chloramphénicol et seulement trente-six pourcent des souches étaient résistantes à l'acide nalidixique, Dans cette étude, la résistance aux antibiotiques des souches isolées de *Vicia Faba* dans région d'Algérie occidentale à montrer un haut niveau de résistance à la streptomycine, à l'ampicilline, à l'érythromycine, au chloramphénicol et à l'acide nalidixique (Ouslim et al ,2019).

5.Étude de la croissance de souche *Vicia faba* en présence des métaux lourds :

Tableau 4 : Croissance des souches *Vicia faba* en présence des différentes concentrations de métaux lourds.

		L'élément métallique									
Métaux lourds		Cu		Zn		Pb			Cd		
	Mm	0,25	2	1,2	1,75	3, 35	3,6	4	0,8	1,8	4,5
	Souche										
	<i>Vicia Faba</i> %	–	6	–	8	–	–	16	–	–	3

Les effets des métaux Pb, Zn et Cu sur le développement dans sept souches de *Vicia faba* obtenus à partir de nodules sont illustrés dans le tableau 4. Le test de tolérance a montré que la LMR (maximal resistant level) de 8%, 16% et 8% des isolats de *Vicia faba* atteignait (Cu) 2 Mm, (Pb) 4,05Mm et (Zn) 1,75Mm, 9% des isolats de *Vicia faba* ont pu croître avec 4,5 Mm de (Cd) (Fatnassi et al, 2014).

Les souches ne présentent aucune croissance sur les différentes concentrations testées (Cu) 0,25Mm ; (Zn) 1,2Mm, (Pb) 3, 35Mm et 3,6Mm ;(Cd) 0,8Mm et 1,8Mm.

Tous les *rhizobiums* ont été étudiés pour leur capacité à croissent à des concentrations élevées de Zn, Cu et Pb. Cd les tests ont été réalisées sur des plaques de Pétri en tant que bactéries vivantes

Les éléments comme, 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 *rhizobium* aux métaux lourds peut varier entre les individus au sein d'une même espèce.

La teneur en métaux lourds de ces plantes était principalement associée à leur disponibilité dans le sol. Ce pendant, le cadmium disponible n'a pas montré de diminution significative dans le sol, mais son accumulation a été considérablement limitée dans la laitue. Ce la peut s'expliquer par l'échantillonnage du sol effectué avant la plantation de laitue (Omar et *al*, 2019).

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).

Conclusion

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des bactéries symbiotique de *Vicia faba*. Cette recherche a permis la caractérisation phénotypique et morphologique sur différentes milieux de culture (YMA, rouge Congo, bleu de Bromothymol) des isolats de plante de *Vicia faba* récolte des palmeraies de Biskra.

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 à montrer que nos isolats ont les caractères des *rhizobia* à croissance rapide en fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA

La majorité de ces isolats acidifient le milieu de culture et n'absorbe pas le rouge Congo.

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

Certains isolats étaient tolérants à l'acidité, l'alcalinité, la salinité et les températures extrêmes. Plusieurs travaux ont montré l'importance d'étudier la capacité des isolats à tolérer aux contraintes environnementales. En effet, il a été rapporté que les souches de *Rhizobium leguminosarum* (nodulant *V. faba*) varient dans leurs résistances au stress. Cette fluctuation est un avantage pour une souche pour survivre dans un environnement pédologique extrême. De plus, les souches tolérantes dans différents sols stressés peuvent améliorer la production et l'adaptation des légumineuses cultivées dans différentes zones.

Les différentes études montrent que la population *rhizobienne* des isolats de *Vicia faba* présente une diversité physiologique et symbiotique importante. Certaines des souches ont montré des caractéristiques physiologiques remarquables telles que la résistance aux antibiotiques. De plus, certains de ces isolats ont présenté des pourcentages élevés d'efficacité de la fixation symbiotique de l'azote.

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.
- Étudier le comportement des *rhizobia* en présence d'autre type des métaux lourds.

Référence Bibliographie

Abdlhafid L .2011. Effet de certains indicateurs de gènes nod (composé phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique .en vues de l'obtention du diplôme de doctorat –es- sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen, page 43.

Abou-Shanab, R.A.I .., P. van Berkum., J.S. Angle .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* 68(2): 361.

Beimnet A., Aregu A .A. Fassil A., Markku Y., Kristina L .2020. Genetically diverse lentil- and faba bean-nodulating *rhizobia* are present in soils across Central and Southern Ethiopia 96 (3): 015.

Benabdoun M., H. gherbi A.djekoun1, D. bogusz, C. franche, N. ykhlef .2012 .Fixation biologique de l'azote : la symbiose actinorhizienne *casuarina-frankia* 16 pp.15-19

Benselama A. 2015. Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* et études de partenaire symbiotique. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1, p.25.

Baba Arbi S. 2016. Étude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis Rhode* et *Melilotus indicus (L.) All.* présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat microbiologie appliquée, université badji mokhtar – Annaba, page 19.

Benselama A.,Tellah S., Ourem F., Ounane S. M. 2018. Characterization of *rhizobia* from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria 41(4): 624-628.

Chabbi R .2008 . Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella L.* (Légumineuses) poussant dans différents écosystème de l'est algérien. Biotechnologie végétale. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie, page 11 et 18.

Corinne. L.1985.étude de la modification des caractères de *rhizobium melllotl* après transformation génétique .thèse pour l'obtention du titre de docteur de troisième cycle ,Biochimie , l'université des sciences et techniques de lille .,Page 5.

Camille D.2006.Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 2ème édition, TEC et DOC, p.15

Dahbia CH .2016 .Étude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris L.*) fixatrices d'azote .Thèse Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat , microbiologie appliquée ,université badji mokhtar –Annaba, page 14.

Djouadi S. 2018 .Prévalence de la symbiose des *rhizobia* associés aux légumineuses d'Algérie. Thèse présenté pour l'obtention du grade de docteur en sciences biologique, écobiologie et amélioration végétal, université de la science et de la technologie houari boumedien , P 18.

Djellali B ., Philippe de Lajudie ., Nacer R ., Christine Le Roux ., Farida B ., Pierre T., Abdelghani B ., Amar B ., Yahia K ., Gisèle L .2017 . *Vicia faba L.* in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum sv.viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies 41(2):122–130.

Drevon J.J. et B. Sifi .2000 .Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. Les Colloques, n° 100, Carthage (Tunisie), Montpellier (France), p 11

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, p 82.

Frédéric Z., Philippe de Lajudie., 2001 .Taxonomy of *rhizobia* : 569–570.

Fassou K .2011. Diversité génétique des *rhizobia* associées à un champ de pois d'angle (*Cajanocajan .L*) Yamoussoukro (centre de la cote d'ivoire), Élève ingénieur agronome (41promotion, ENSA), en vue de l'obtention du diplôme d'agronomie approfondie (DAA), Institut national polytechnique.

Fatnassi C.I.,Manel Ch., Moez J., and Salwa H. J. 2014.Bacteria associated with different legume species grown in heavy-metal contaminated soils 2 (12): 460-467.

Hussain M., Ashraf M., Saleem M., Hafeez FY. 2002. Isolation and characterization of rhizobial strains from alfalfa (*Medicago sp.*). Pak. J. Agri. Sci 39:32-34.

Hajjam. Y., I.T. Alami ., S. M. Udupa ., S. Cherkaoui . 2016. Isolation and evaluation of phosphate solubilizing rhizobia from root nodules of faba bean (*Vicia faba L.*) in Morocco 7(11) : 4000-4010.

Jordan,D .C .1984. Family III. Rhizobiaceae .In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Krieg, N.R .and Holt, J. G. eds). The Williams and Wilkins, Baltimore, 1:234-254

Jean-Marc .2017.Légumineuse/Bactérie rhizobium= symbiose.

Kanouni L .2019 . Inhibition des champignons phytopathogènes par Rhizobium .microbiologie, Université Ferhat Abbas Sétif1Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Page24.

Latati M .2012 . Adaptation de la symbiose légumineuse haricot-rhizobium à la déficience en phosphore incidence sur la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences agronomique, Biotechnologie végétal, École nationale supérieur agronomique El-Harrach, Page 19.

Loubna B., Majida La., Khalid D., Zain el Abidine F., Ricardo G .C., Michael G., KhalidO.2017 .Phenotypic and genetic diversity of Moroccan *rhizobia* isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to bein volve dintheir osmotolerance 41(1):2-3.

Mustapha M. I ., Hanane L ., Omar B ., Mouad L ., Soufiane A ., Youssef J ., Meryeme B ., Eulogio J.B .2020.Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli* 43:126084.

Maynaud G .2012 .Adaptation aux métaux lourd de population 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 pour l'obtention du garde de docteur, Microbiologie, parasitologie ,Université Montpellier II école doctorale, Page 44.

Murray N.2004 .Biologie végétale : 6^oédition, p520.

Mouafek A .2010 .La symbiose à *rhizobia* chez la fève (*Vicia faba L.*) et La luzerne (*Medicago sativa L.*) dans la région de Biskra .Mémoire de magister ,Sciences Agronomiques ,Université de Mohamed khider Biskra ,p 6 et 37 .

Nassira R .2014 . Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Biochimie et Microbiologie Appliquée, thés Présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences, l'université Constantine 1, page 1.

Ouslim S.2015 .BNL associées aux légumineuses alimentaires (*Vicia faba L*) dans l'ouest Algérien « caractérisation et importance » .Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat (LMD), Université d'Oran, p31.

Odile D.2017 . Diversité fonctionnelle de *rhizobia* associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France. Thèse de doctorat, écologie microbienne, l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres PSL Research University, P 38.

Omar S ., Salwa H.J ., Imen Ch.F., Manel Ch., Khediri M., Imen Z., Moez J.2019.Effect of *Vicia faba L. var. minor* and *Sulla coronaria (L.) Medik* associated with plant growth-promoting bacteria on lettuce cropping system and heavy metal phytoremediation under field conditions 26 (8): 8125-8135.

Ouslim S., Merabet CH., Boukhatem Z., Bouchentouf L., Bekki A. 2019.Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating *Rhizobia* Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria 3(9): 2347-4289.

Pier-Anne B .2009 .Étude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *frankia spp.* et sa symbiose avec l'aulne noir (*alnusglutinosa (l.) gaertn*) .Mémoire présente au Département de biologie en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences (M .Sc.),faculté des sciences université de sherbrooke ,page 17.

Rabah CH .2009.Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella L.* (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie, p 6.

Roba Mohamad.2016.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.

Selami N .2017. Destine aux étudiant de deuxième année master en biotechnologie et génomique végétal, Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, polycopie de cours, université des sciences et de la technologie d'oran mohamed boudiaf, page 25.

Salah H .2018 .Étude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse Pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en sciences de la nature et de la vie, Microbiologie, Université "Ferhat ABBAS" - Sétif Faculté des Sciences Département de Biologie, Page 5.

Sandeep P. U., Navneet P., Gaurav M. 2015.Short Communication: Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar, India 7 (2):74-75.

Soussou S. 2013. Adaptation de la symbiose Fabacées-*rhizobium* aux sites miniers. Absorption du zinc par *Anthyllis vulnéraire* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse pour obtention du grade de doctorat de montpellier supagro, Microbiologie, Parasitologie, Agriculture Durable. Institut supérieur agronomique de chottmeriam, université de Sousse, Page 35.

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

Walid Z .2011 .Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*".Thèse de doctorat, École Doctorale: Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, université Tunis el Manar, Page 11 et 15.

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

Annexes

Annexe 1 :

Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l

YMB1000ml

Agar18

pH6, 8

Autoclavage120°C pendant 20 minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB 1000ml

Solution stock de rouge Congo 10ml

Agar 18

pH6, 8

Autoclavage120°C pendant 20 minutes

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

Annexe 2 :

Coloration de Gram :

Fait à partir des cultures sur YMA on prépare des lames bien étalées en couche mince, Séchée et fixée. Puis coloré selon les étapes suivantes :

- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- Chasser le violet avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30secondes.
- Décolorer au mélange alcool-acétone (v/v) jusqu'à la décoloration totale du Frottis.
- Laver à l'eau de robinet courante.
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1minute.
- Laver à l'eau, séché la lame et observer a immersion.

Annexe 3 : les articles utilisent.

Abou-Shanab, R.A.I .., P. van Berkum., J.S. Angle .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* 68(2): 361.

Benselama A.,Tellah S., Ourem F., Ounane S. M. 2018. Characterization of *rhizobia* from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria 41(4): 624-628.

Djellali B ., Philippe de Lajudie ., Nacer R ., Christine Le Roux ., Farida B ., Pierre T., Abdelghani B ., Amar B ., Yahia K ., Gisèle L .2017 . *Vicia faba* L.in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum sv.viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies 41(2):122–130.

Beimnet A., Aregu A .A. Fassil A., Markku Y., Kristina L .2020. Genetically diverse lentil- and faba bean-nodulating *rhizobia* are present in soils across Central and Southern Ethiopia 96 (3): 015.

Fatnassi C.I.,Manel Ch., Moez J., and Salwa H. J. 2014. Bacteria associated with different legume species grown in heavy-metal contaminated soils 2 (12): 460-467.

Loubna B., Majida La., Khalid D., Zain elAbidine F., Ricardo G .C ., Michael G ., Khalid O.2017 . Phenotypic and genetic diversity of Moroccan *rhizobia* isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to bein volve dintheir osmotolerance 41(1) :2-3.

Mustapha M. I ., Hanane L ., Omar B ., Mouad L ., Soufiane A ., Youssef J ., Meryeme B ., Eulogio J.B .2020. Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli* 43:126084.

Omar S., Salwa H .J., ImenCh.F., Manel Ch., Khediri M., Imen Z., Moez J.2019. Effect of *Vicia faba* L. var. minor and Sulla coronaria (L.) Medik associated with plant growth-promoting bacteria on lettuce cropping system and heavy metal phytoremediation under field conditions 26 (8): 8125-8135.

Ouslim S., Merabet CH., Boukhatem Z., Bouchentouf L., Bekki A. 2019. Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating *Rhizobia* Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria 3(9): 2347-4289.

Sandeep P. U., Navneet P., Gaurav M. 2015. Short Communication: Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar, India 7 (2):74-75.

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

Hajjam. Y., I.T. Alami ., S. M. Udupa ., S. Cherkaoui . 2016. Isolation and evaluation of phosphate solubilizing rhizobia from root nodules of faba bean (*Vicia faba L.*) in Morocco 7(11) : 4000-4010.

الملخص:

Rhizobiaceae. هو بقول يؤسس تفاعلاً تكافلياً مع بكتيريا التربة من عائلة *Vicia faba L* يؤدي هذا التفاعل إلى تكوين الأعضاء الجذرية لعضو جديد ، وهي العقدة التي يتم فيها إنشاء بيئة ميكروبية تفضل تمايز الجذور البكتيرية التي تثبت النيتروجين في الغلاف الجوي. وهذا فإن الأخير يقلل من النيتروجين في الغلاف الجوي إلى أمونيوم ، والذي يتم استيعابه بعد ذلك بواسطة النبات المضيف

تركز دراسة النمط الظاهري للسلاسل على الخصائص المورفولوجية والثقافية ؛ إن تحمل الملوحة ودرجات الحرارة المرتفعة ودرجة الحموضة الحمضية والقوية والجفاف ومقاومة المضادات الحيوية بالإضافة إلى الخصائص والثقافية جعلت من التكافلية التي تم اختبارها. للمعادن ثقيل بتركيزات في *V. faba* المقاومة الجوهرية الممكن وصف تنوع فسيولوجي كبير في عزلات وسط صلب في وجود تركيزات مختلفة من المعادن الثقيلة

الكلمات المفتاحية: الصفات المظهرية ، المعادن الثقيلة ، *Vicia faba* ، *rhizobia* .

Résumés :

Vicia faba L. est une légumineuse établissant une interaction symbiotique avec une bactérie tellurique de la famille des *Rhizobiacées*. Cette interaction induit l'organogénèse racinaire d'un nouvel organe, la nodosité dans laquelle s'établit un microenvironnement propice à la différenciation des *rhizobia* en bactéroïdes fixateurs du diazote atmosphérique. Ces derniers réduisent ainsi le N₂ atmosphérique en ammonium, assimilé ensuite par la plante hôte.

L'étude phénotypique des souches porte sur les caractères morphologiques et culturels ; la tolérance à la salinité, températures élevées, pH acides et alcalines, la sécheresse et la résistance aux antibiotiques ainsi que des caractéristiques symbiotiques et culturels a permis de décrire une grande diversité physiologique chez les isolats de *V. faba* testés. 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 : *Vicia faba*, *rhizobia*, caractères phénotypique, métaux lourds.

Abstract:

Vicia faba L. Is a legume establishing a symbiotic interaction with soil bacteria of the *Rhizobiaceae* family. This interaction induces the root organogenesis of a new organ, the nodosity in which a microenvironment is established favorable to the differentiation of *rhizobia* into atmospheric nitrogen-fixing bacteroids. The latter thus reduce the atmospheric N₂ to ammonium, which is then assimilated by the host plant.

The phenotypic study of the strains focuses on morphological and cultural characteristics; tolerance to salinity, high temperatures, acidic and alkaline pH, drought and resistance to antibiotics as well as symbiotic and cultural characteristics made it possible to describe a great physiological diversity in the isolates of *V. faba* tested. Intrinsic resistance to metals heavy at concentrations in solid medium in the presence of different concentrations of heavy metals. The results obtained show the resistance and sensitivity of the strains to heavy metals.

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