

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Science Biologique de l'Environnement
Filière : Santé et Environnement
Option : Environnement et Santé Publique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Caractérisation phénotypique et étude de
l'effet des antibiotiques et des
métaux lourds sur la croissance des bactéries
nodulantes *Genista numidica***

Présenté par :

OUBRAHAM Syla

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M. RAMDANI Nacer	MAA	President
M. HAMLAT Mourad	MAA	Examineur
Mme. BOULILA Farida	MCA	Promotrice
Mme. AHNIA Hadjira	Magister	Invitée

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Au terme de ce modeste travail je tiens à remercier les membres du jury :

Mr RAMDANI Nacer, d'avoir accepté d'évaluer et de présider ce jury.

Mr HAMLAT Mourad qui a bien voulu examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme BOULLILA Farida et Mme AHNIA Hadjira, de m'avoir suivi et dirigé tout le long de ce travail.

J'aimerais remercier également tous les membres du laboratoire d'écologie microbienne, Mr BELHADI Djillali et Mlle BOURBABA Yasmina, Pour leur aide et leurs conseils et encouragements répétés.

J'adresse mes sincères remerciements au personnel du soutien Sabrina et Tassadit de m'avoir aidée à chaque fois que j'en avais besoins.

Tout comme j'exprime les mêmes sentiments de gratitude à tous les enseignants qui m'ont compté parmi leurs étudiants tout le long de ces années.

Enfin je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



Dédicaces

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

Aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents, Djoudi et Dalila, moteur de mon avancé, de m'avoir écouté, soutenu et guidé vers la réussite. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à vous.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime et ma reconnaissance. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, et ce que vous faites jusqu'à présent.

À mes aimables sœurs Sassaï et Ninouche pour leurs soutien moral et mon frère chéri Farouk que dieu le protège pour nous, et mon bien aimer Hocine que dieu l'accueil dans son vaste paradis, sans oublier mon adorable Félix.

À Fares, pour sa confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je lui porte et je remercie dieu de l'avoir protégé pour être témoin de ma réussite.

À ma chère tante Jako et dada Azzedine et leurs enfants, Hamza, Slimane et Cerine, pour leurs soutien moral et encouragements permanents.

Je dédie ce travail à mes grands-parents mamy Ghenima, Hadj el Hadî et Mama Ouiza, ainsi que mes oncles, tantes et leurs familles, mes beaux-parents dada Saïd et nana Djamila, mes belles sœurs, Belinda et ses filles Alycia, Melissa et Emma, Dalila et Lyliane, Sonia, Souhila, beau-frère Mohand et ma sœur Salima ainsi que les jumeaux Assil et Arris.

À tous mes amies, Lydia, Mounia et Sarah pour leur présence, compréhension et bonne humeur de tous les jours.

Enfin, à toutes les familles qui portes les noms OUBRAHAM, MAZOUZ et BELLACHE et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

 *Sylia*

Sommaire

Liste d'abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Photos

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Fixation biologique de l'azote 2

II. Symbiose rhizobiums-légumineuses 2

I.1. Légumineuses 3

I.2 Rhizobiums 5

III. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums- légumineuses 5

III.1 Stress hydrique 6

III.2 Stress thermique 6

III.3 Antibiotiques 6

III.3.1 Généralités 6

III.3.2 Impact des antibiotiques sur la santé et l'environnement. 7

III.4 Métaux lourds 8

III.4.1 Généralités 8

III.4.2 Impact des métaux lourds sur l'environnement et l'Homme 9

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique 11

II. Méthodes 12

II.1 Caractères cellulaires 12

II.2 Caractères culturaux 12

II.3 Caractères biochimiques 13

II.3.1 Test de Bleu de Bromothymol (BTB) 13

II.3.2 Fermentation du lactose, saccharose et du glucose, production du gaz et H₂S 13

II.3.3 Test d'API 20 NE 13

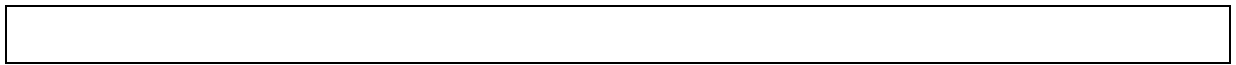
II.4 Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques	14
II.5 Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds	15

Chapitre III : Résultats et Discussions

I. Caractères cellulaires	17
II Caractères culturaux	17
III Caractères biochimiques.....	18
III.1 Test de Bleu de Bromothymol (BTB)	18
III.2 Fermentation du lactose, saccharose et du glucose, production du gaz et H ₂ S.....	19
III.3 Test d'API 20 NE.....	19
IV Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques.....	24
V Effet des métaux lourds sur la croissance des souches	26
VI Détermination des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis les métaux lourds	30
VII. Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds	32
VIII. Résistance combinée des souches aux antibiotiques et aux métaux lourds.....	34
Conclusion et perspectives	35
Références bibliographiques	37
Annexes	

Liste des abréviations et symboles chimiques

API	Système d'identification des bacilles gram négatif	OX	Oxacilline
ATB	Antibiotiques	Pb(OOCH₃)₂, 3H₂O	Acétate de plomb
Atm	Unité de pression	PHB	Polyhydroxybutyrate
B	<i>Bradyrhizobium</i>	PLP	Protéines de liaison à la pénicilline
BTB	Bleu de Bromothymol	ppm	Partie pour millions
CA-SFM	Comité française de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	pSym	Plasmide symbiotique
CdSO₄	sulfate de cadmium	qsp	Quantité suffisante pour
CMI	Concentration minimale inhibitrice	QTE	Quantité
cup	Cupule	R	<i>Rhizobium</i>
CuSO₄	sulfate de cuivre	R	Résistant
E	Erythromycine	S	Sensible
Gen	Gentamicine	TE	Tétracycline
H₂S	Sulfate d'hydrogène	TSI	Triple Sugar Iron.
H₂SO₄	Acide sulfurique	UFC	Unité formant colonies
HCl	Acide chlorhydrique	w/v	Poids par volume
HcP	Heat shock proteins	YMA	Yeast Mannitol Agar
K₂HPO₄	Hydrogénophosphate de potassium	YMB	Yeast Mannitol Both
LPS	Lipopolysaccharide	ZnSO₄	Sulfate de zinc
MgSO₄	Sulfate de magnésium		
N	Azote		
N₂	Nitrogène		
N1-N2	Réactifs de nitrate		
NaCl	Chlorure de sodium		
NaOH	Hydroxyde de sodium		
NCBI	National Center for Biotechnology Information		
NE	Non entérobactéries		
NH₃	Azote ammoniacal		
NO₂	Nitrite		
NO₃⁻	Nitrate		
Nod	Nodulation		



Liste de Tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Liste des souches utilisées.	11
II	Les charges et diamètres critiques des antibiotiques testés	14
III	Volumes et concentrations des métaux utilisées.	15
IV	Les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds	16
V	Résultats des souches au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S.	19
VI	Résultats de galerie API 20 NE	20
VII	Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisées.	24
VIII	Sensibilité et résistance des souches étudiées aux antibiotiques	24
IX	Croissance des souches testées en présence de différentes concentrations aux métaux lourds (µg/ml).	27
X	Concentrations minimales inhibitrices des souches testées vis-à-vis des métaux lourds.	31
XI	Sensibilité et résistances des souches étudiées aux métaux lourds.	33
XII	Phénotypes de résistance des souches aux antibiotiques et aux métaux lourds.	34

Listes de Figures

Figure	Titre	Page
1	Processus de nodulation.	3
2	Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.	12
3	Pourcentage de résistance des souches testées vis-à-vis les antibiotiques.	25
4	Taux de résistance de souches testées au zinc (Zn).	28
5	Taux de résistance des souches testés au Plomb (Pb).	28
6	Taux de résistance des souches testées au cuivre (Cu).	28
7	Pourcentage de résistances des souches étudiées aux différents métaux lourds.	32

Liste des Photos

Photo	Titre	Page
1	<i>Genista numidica</i>	4
2	Observation microscopique de la souche S4, prise comme exemple, sous microscope optique à l'état frais (Grossissement 10 ×40).	17
3	Résultats de la coloration de Gram de la souche S4, prise comme exemple, (Grossissement 10 ×100).	17
4	Aspect des colonies, exemple des souches S9 et S2, obtenues sur milieu YMA.	18
5	Résultats de réaction des souches S9 et S3 en milieu YMA+BTB.	18
6	Réaction négative des souches (exemple S1) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S.	19
7	Résultats de la souche S4, prise comme exemple, au test API 20 NE système en présence d'un témoin négatif.	23
8	Résistance et sensibilité de certaines souches vis-à-vis les antibiotiques (S1, S2, <i>B. japonicum</i> USDA6, <i>B. canariense</i> BTA-1).	25
9	Croissance de certaines souches en présence de différents métaux lourds.	29

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 s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobiums (El hilali, 2006).

Les rhizobiums sont des microorganismes très importants de point de vue scientifique et agronomique en raison de leur aptitude à réaliser la fixation symbiotique de l'azote avec les légumineuses, qui sont d'une importance majeure en maintien de la fertilité des sols.

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui compte le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

La tribu des *Genisteeae*, famille des *Fabaceae*, est essentiellement méditerranéenne (Polhill, 1976). Elle possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées et de dominer de nombreuses communautés végétales (López González, 2001).

Le sol algérien compte 23 espèces de *Genista* dont 11 endémiques (Maire, 1987), cependant, aucune recherche concernant le symbiote n'a été effectuée à notre connaissance, ce qui nous a encouragés à réaliser cette étude.

L'objectif de notre étude est la caractérisation phénotypique des bactéries endosymbiotes de *Genista numidica*, à travers des caractères morpho-culturels, des tests biochimiques et de l'étude de la sensibilité et de la résistance des souches de rhizobiums vis-à-vis les antibiotiques, ainsi que la sensibilité et la résistance des rhizobiums vis-à-vis les métaux lourds.

Cette étude rentre dans le cadre de projet de recherche CNEPRU animé par l'équipe plante-microorganisme du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Fixation biologique de l'azote

L'azote atmosphérique, représentant les 80% de l'air sec, est la principale source d'azote de la planète. Il constitue après l'eau, l'un des facteurs limitant de la production végétale (Peret, 2007). La molécule de l'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes, il est un constituant important dans l'élaboration de nombreuses molécules tels que : les protéines des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et divers composés primaires et secondaires des plantes (Hopkins, 2003)

C'est le processus de la fixation biologique de l'azote qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est une réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3) ; cette forme d'azote combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné.

Ce processus de la fixation biologique de l'azote se fait par des microorganismes qui peuvent être libres ou symbiotiques. En effet, les fixateurs libres vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, qui sont principalement les bactéries aérobies (*Azotobacter*, *Azomonas*), et les bactéries anaérobies (*Clostridium...*etc). D'autre part les fixateurs symbiotiques qui vivent en symbiose avec les plantes, qui sont économiquement importantes, telles que les rhizobiums, qui vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses

II. Symbiose rhizobiums-légumineuses

La symbiose rhizobiums-légumineuses est le résultat d'une interaction spécifique entre la plante et la bactérie. À la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes (Figure 1), via un dialogue moléculaire, la bactérie induit chez la légumineuse la formation d'un organe spécialisé sur les racines appelé « nodule » à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en « bactéroïde » capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Gibson *et al.*, 2008).

Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés « nodules caulinaires » (Giraud et Fleischman, 2004).

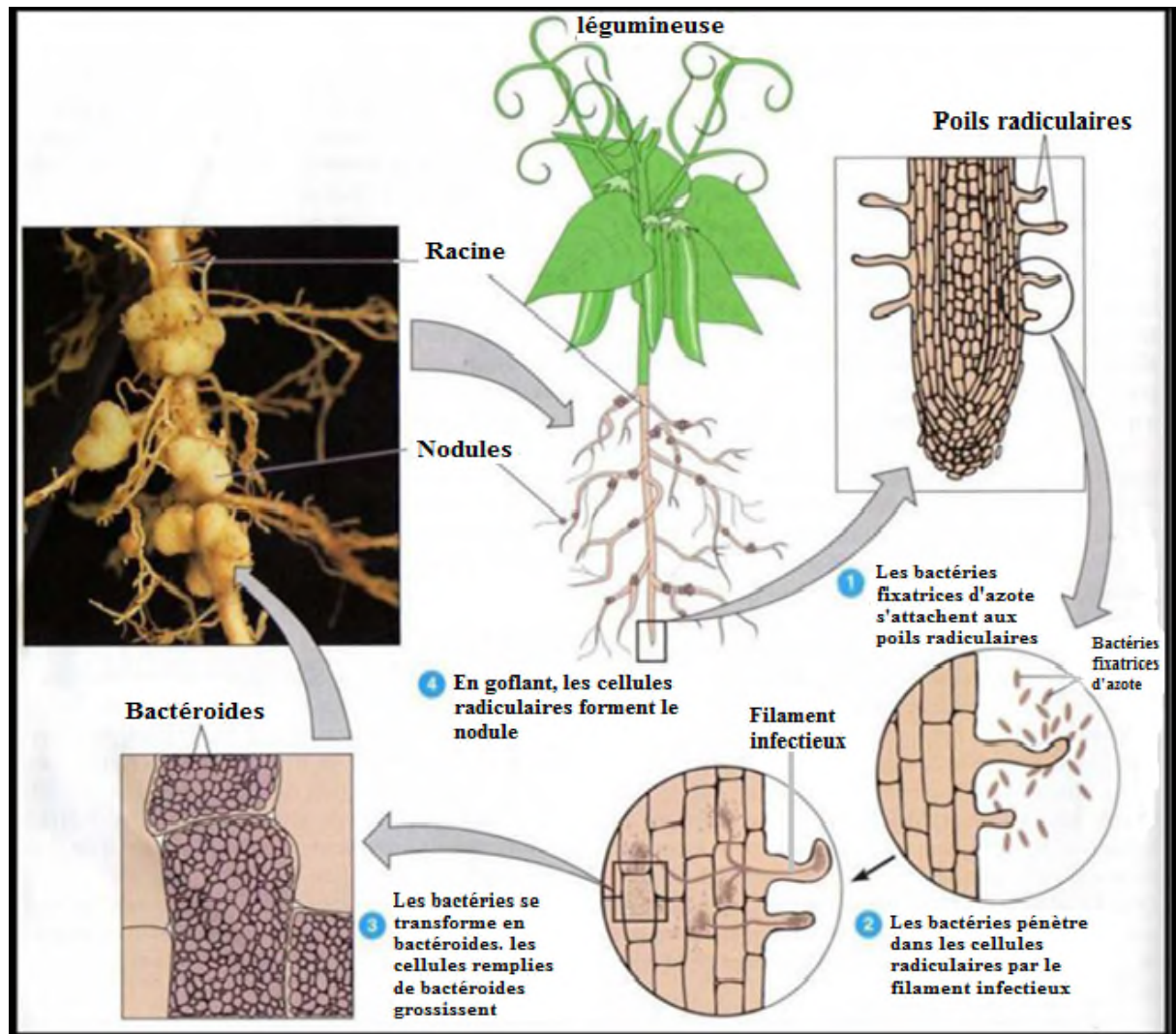


Figure 1: Processus de nodulation (Tortora *et al.*, 2003).

II.1 Légumineuses

Les légumineuses (Fabacées) constituent la troisième superfamille par ordre d'importance chez les angiospermes. Elles comprennent plus de 750 genres et environ 20 000 espèces de formes et types de croissance très diversifiés. Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles : *mimosoideae*, *caesalpinioideae* et *papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003).

De nombreux taxons de la famille des légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique tel que la famille des *Bradyrhizobiaceae*. La proportion de ces taxons varie d'une sous-famille à l'autre, elle est de 90% pour les *Mimosoideae*, 20% pour les *Caesalpinioideae* et 97% pour les *Papilionoideae* (Merabet, 2007).

Genre *Genista*

Le genre *Genista* L, comportant 87 espèces, est constitué d'arbustes épineux et non-épineux, la plupart des espèces de ce genre forment des maquis sclérophylles ou des matorrals (Martins et *al.*, 2005). Ce genre est représenté en Europe occidentale et centrale, il est également présent en Turquie, en Syrie et en Afrique du Nord.

En Algérie on trouve 23 espèces dont 11 endémiques (Maire, 1987). Il pousse dans les régions Nord et Sud et au grand Sahara.

Genista numidica est une plante endémique au Nord- Est Algérien. Elle fleurie du mois de Mai au mois Juillet (Photo 1). Cette plante endémique algérienne, est commune sur les collines du littoral de Cap Aokas jusqu'à Annaba, colonise les sols dégradés des forêts de Chêne liège et préférant une exposition Nord sur les côtes littorales en bénéficiant d'un taux élevé d'humidité (Lograda, 2010).

Genista numidica est une plante qui possède des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent son application dans divers domaines à savoir la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture.

L'infusion et l'extrait flavonoïde de *Genista numidica* est utilisé dans le traitement des maladies provoquées par les bactéries (*Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ; *Pseudomonas* sp ; *Acinetobacter*), ainsi que les infections des voies respiratoires, urinaires, des parties molles et les infections cutanées. L'extrait de saponine est particulièrement utilisé aux infections nosocomiales (Ati, 2010).



Photo 1 : *Genista numidica*

II.2. Rhizobiums

Les rhizobiums ou les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote. En 1889 Franck était le premier à proposer le nom de *Rhizobium*.

D'un point de vue morphologique, les rhizobiums possèdent une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et 1,2 à 3 μm de longueur (Jordan, 1984). Ils sont à Gram négatif strictement aérobies et non sporulant (Laranjo et al., 2002).

Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992). Ils prolifèrent facilement lorsque des milieux naturels contiennent du mannitol comme source de carbone et de l'extrait de levure. Sur milieu Yeast Mannitol (YM) solide, les rhizobia à croissance rapide forment des colonies circulaires, convexes, translucides, avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours d'incubation. Par contre les rhizobia à croissance lente forment des colonies circulaires, opaques et tendent à avoir une texture granuleuse. Ces colonies ne dépassent pas 1 mm de diamètre après 5 à 7 jours d'incubation (Jordan 1984).

Les rhizobia comprennent 13 genres et 98 espèces, tous classés dans les Protéobactéries, la plupart appartiennent à la subdivision alpha-Protéobactéries dans les genres : *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982); *Ensifer* (Chen et al., 1988) ; *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) ; *Rhizobium* (Frank, 1889) ; *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Metylobacterium* (Sy et al., 2001) ; *Devosia* (Rivas et al., 2003) ; *Ochrobactrum* (Ngom et al., 2004) ; *Phyllobacterium* (Mantelin et al., 2006) et *Microvirga* (Ardley et al., 2012). D'autres rhizobia ont été découverts dans des bêta-Protéobactéries, dans les genres *Burkholderia sp* (Moulin et al., 2001) ; *Cupriavidus* (Vandamme et Coenye, 2004) et *Shinella* (Lin et al., 2008).

III. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums - légumineuses

Plusieurs conditions de l'environnement sont considérées comme étant des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobiums légumineuses.

Le processus de la fixation de N_2 est fortement lié à l'état physiologique de la plante hôte. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce qu'une souche rhizobienne concurrente et persistante exprime sa pleine capacité pour la fixation de l'azote si certains facteurs (salinité, pH, insuffisance nutritive, toxicité minérale, températures, humidité insuffisante ou excessive du sol, métaux et certains antibiotiques...etc.) imposent des limitations à la vigueur de la légumineuse hôte (Zahran, 1999).

III.1 Stress hydrique

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les réponses des plantes à cet effet seront par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires pour l'adaptation à ce stress. Il exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige. Le principale résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate à cause de dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture du stroma (Zhang *et al.*, 1996).

III.2 Stress thermique

Le stress thermique induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins), qui assurent la protection des enzymes clefs de la physiologie microbienne (Cloutier *et al.*, 1992). L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées (Prévost *et al.*, 1987). Il a été rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang *et al.*, 1996). A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce.

III.3 Antibiotiques

III.3.1 Généralités

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte.

Plusieurs antibiotiques sont d'origine naturelle, produites par des micro-organismes tels que des β -lactamines, streptomycines, les aminosides produits par des bactéries et leur présence massive dans le sol peuvent présenter des effets néfastes sur l'environnement. Concernant l'origine anthropique, la contamination des sols par les antibiotiques peut avoir comme origine les excréments des animaux à l'intérieur du pâturage ou le fumier utilisé comme engrais pour les plantes cultivées, la pulvérisation des cultures telles que l'utilisation

de la streptomycine et la tétracycline sur les arbres fruitiers pour éviter la pourriture des fruits (Gould, 2005).

Parmi les sources de contaminations des antibiotiques on peut distinguer deux types de sources :

- les sources d'**émissions diffuses** consécutives aux rejets de substances médicamenteuses et de leurs dérivés dans les urines et les fécès de la population humaine et des animaux de compagnie et d'élevage ou aux déchets des usagers.
- les sources d'**émissions ponctuelles** liées aux rejets de l'industrie chimique fine, de l'industrie pharmaceutique, élevages industriels des animaux et piscicoles et rejets des établissements de soins.

Comme mode d'action, les antibiotiques agissent généralement sur les enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) et sur la synthèse des protéines et d'acides nucléiques par des mécanismes spécifiques. Leur mode d'action varie en fonction du type et concentration de l'antibiotique (El hilali, 2006).

III.4.2 Impact des antibiotiques sur la santé et l'environnement

a. Impact sur la santé

Comme tous médicaments, les antibiotiques comportent quelques effets indésirables, variables selon les molécules. La plupart sont bénins, mais quelques-uns peuvent être sérieux, voire graves. Les effets indésirables varient selon les familles d'antibiotiques, mais deux types d'effets indésirables sont communs (www.eurekasante.fr):

- Réaction allergique qui se définit comme réaction exagérée de l'organisme contre la substance médicamenteuse qu'il identifie comme étrangère. Cette réaction peut toucher tous les organes, en se manifestant de différentes manières : démangeaisons, urticaire, éruption de boutons, et plus rarement, éruption bulleuse potentiellement grave (des cloques se forment, la peau se décolle).

- Les troubles digestifs, dont les antibiotiques peuvent agir de deux façons sur ce dernier. D'une part, certains d'entre eux ont un effet direct sur son fonctionnement, en provoquant des nausées, des vomissements ou des diarrhées. D'autre part, tous les antibiotiques perturbent la flore intestinale, qu'ils détruisent de manière plus ou moins accentuée. L'équilibre de cette flore étant modifié, la digestion et le fonctionnement de l'intestin sont perturbés. Cela peut provoquer des maux de ventre, des diarrhées ou des ballonnements.

b. Impact sur l'environnement

Après l'application excessive des antibiotiques, dans la médecine humaine et le domaine vétérinaire, certains résidus excrétés de l'organisme sous forme inchangée peuvent rester actifs et perdurent plusieurs mois dans le milieu naturel ce qui présente des risques pour l'environnement. Avec les pluies, une partie des antibiotiques emmagasinés dans le sol peut être transférée dans le milieu aquatique.

La présence d'antibiotiques peut aussi affecter la qualité des eaux par contaminations des eaux de mer, souterraine et potable, en perturbant la communauté bactérienne par leurs activités antibiotiques, échanges de gènes de résistance entre bactéries de l'environnement des fermes piscicoles et bactéries de l'environnement terrestre. Ex *Aeromonas*, pathogènes pour les poissons, peuvent transmettre et partager des déterminants de résistance aux antibiotiques avec des *Escherichia coli* isolés chez l'homme. Les antibiotiques se concentrent dans les chaînes environnementales par le facteur de bioconcentration (Jones *et al.*, 2002).

L'omniprésence des antibiotiques dans le sol affecte la symbiose rhizobiums-légumineuses, par leurs effets antimicrobiens, tels que la famille des cyclines (Tétracycline) et des aminosides (Gentamycine) qui inhibe la synthèse des protéines et de la membrane plasmique (Zomahoun, 2004).

III.4 Métaux lourds

III.4.1 Généralités

Les éléments traces, appelés abusivement métaux lourds, comprennent non seulement les métaux présents à l'état de trace (cadmium, cuivre, mercure, plomb...etc), mais aussi des éléments non-métalliques, comme l'arsenic, le fluor...etc. La plupart d'entre eux sont des oligo-éléments nécessaires à la vie en faible dose. Ils peuvent cependant se révéler très nocifs en quantités importantes, comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le chrome (Cr)...etc. D'autres n'ont aucune fonction biologique ou physiologique et sont considérés toxiques même à très faible concentration, comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg)...etc (Kurlaze, 2007; Liu, 2008).

Le cheminement pris par les métaux lourds dans l'environnement dépend de leur mode d'introduction (rejets directs dans les rivières, dans l'atmosphère ou sur le sol) ainsi que de leur forme physique : solide, liquide ou gazeuse.

Les métaux sont présents de façon naturelle dans les sols, ils peuvent également être d'origine naturelle via les volcans, les feux de forêts, l'activité des sources thermales, l'érosion et par sédimentation des roches mères.

Les activités anthropiques sont considérées comme la source principale de nombreux polluants disséminés dans l'environnement. Ce sont des éléments très toxiques et non dégradables. Ces sources principales sont :

- Mines et fonderies de métaux, exemple du traitement des métaux.
- Industries de textiles, plastiques et raffineries.
- Retombés atmosphérique issus de l'incinération et élimination de déchets, combustions des carburants fossiles et gaz d'échappement automobiles.
- Utilisation des engrais, lisiers des porcs et volailles, chaulage et pesticides.
- Dépôt d'ordures dans les sols tels que les boues d'épuration, tas de ferrailles et percolât de décharges.

Les métaux lourds relèvent divers mécanismes, altération de la structure des acides nucléiques par fixation de cations métalliques sur les groupements phosphates entraînant des modifications de structure, empêchant la transcription ou la traduction des gènes (Monchy, 2007), interaction avec des espèces oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires, ce qui entraîne la formation de radicaux libres qui peuvent endommager l'ADN (mutations), les protéines ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire (Untereiner, 2008) ainsi que l'inhibition des activités enzymatiques par fixation des cations métalliques sur des résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique qui font partie du site actif de plusieurs enzymes (Monchy, 2007).

III.4.2 Impact des métaux lourds sur l'environnement et l'Homme

a. Impact sur l'environnement

Les surfaces concernées par la pollution métallique sont à proximité des sites industriels. Les métaux peuvent être soit fixés dans les roches et les sédiments, soit mobiles. Dans le premier cas, les quantités disponibles sont infimes et ils n'ont aucune signification sur l'environnement. Mais lorsque les conditions changent de telle manière que les métaux redeviennent solubles, l'augmentation de la concentration devient alors une menace directe pour l'environnement du fait de l'augmentation de leur disponibilité pour les plantes. En outre, depuis quelques années, les pluies acides augmentent la mobilité des métaux dans le sol

et causent donc une augmentation de leur concentration dans les produits agricoles (Sam, 1997).

De nombreux éléments se trouvent à l'état de traces dans des particules atmosphériques provenant de combustions à haute température, de fusions métallurgiques, des incinérateurs municipaux, des véhicules, etc. Les effets biologiques, physiques et chimiques de ces particules sont fonction de la taille des particules, de leur concentration et de leur composition. Dans l'air ambiant, on trouve de nombreux éléments, comme le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre, etc., dont la concentration est d'autant plus élevée que les particules sont fines.

Les principales sources de contamination de l'eau sont les eaux usées domestiques et industrielles, la production agricole, les polluants atmosphériques, les anciennes décharges, l'utilisation de substances dangereuses pour l'eau, la navigation...etc.

Les espèces aquatiques, les algues et poissons, accumulent les métaux lourds par le processus de bioaccumulation, en rentrant dans la chaîne alimentaire de l'homme tels que le mercure et le plomb, qui est due à la consommation excessive des pêcheurs aux poissons des eaux contaminées.

La présence des métaux lourds dans le sol perturbe le processus de la fixation biologique de l'azote en inhibant la croissance des bactéries symbiotiques, exemple du plomb, qui inhibe les réactions métaboliques telles que les réactions enzymatiques catalysées par les amylases, cellulases et uréases (Doelman et Haanstra, 1979a).

b. Impact sur la santé de l'Homme

L'omniprésence des métaux lourds dans l'environnement, engendrent un risque sur la santé de l'Homme. Ces polluants peuvent atteindre l'Homme par passage **cutané** en provoquant des cancers de peau, par **ingestion** (diffusion par gradient de concentration jusqu'à la circulation sanguine; le plomb et le cadmium peuvent prendre la place du calcium et de la vitamine D) ou par **inhalation** (les vapeurs peuvent se dissoudre dans les muqueuses du système respiratoire ou arriver dans la circulation sanguine par l'intermédiaire des alvéoles pulmonaires). Exemple de quelques infections causées par certains métaux :

Le plomb provoque des troubles du système nerveux, affection du foie et des reins ; le cadmium provoque des affections respiratoires, troubles rénaux ; le mercure cause des troubles du système nerveux (mémoire, fonctions sensorielles de coordination) ; le nickel provoque des maladies respiratoires, asthme, malformations congénitales, cancers et le chrome qui cause des cancers, troubles dermatologiques, anémie.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé dix (10) souches bactériennes endosymbiotes de *Genista numidica*. Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire d'Ecologie Microbienne. Une analyse géotypique, en cours, a permis de les identifier comme appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Quatre (04) souches de références ont été également utilisées (Tableau I).

Tableau I: Liste des souches utilisées

Souches	Plante hôte	Origine	Source
<i>S1</i>	<i>Genista numidica</i>	Algérie	Collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne
<i>S2</i>			
<i>S3</i>			
<i>S4</i>			
<i>S5</i>			
<i>S6</i>			
<i>S7</i>			
<i>S8</i>			
<i>S9</i>			
<i>S10</i>			
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	Japon	Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA76	<i>Glycine max</i>	Japon	Kuykendall et al., 1992
<i>Bradyrhizobium canariense</i> BTA-1	<i>Chamae cytiscus</i>	Iles canaries	Vinuesa et al., 2005
<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11	<i>Cytisus villosus</i>	Maroc	Chahboune et al., 2011b

II. Méthodes

II.1 Caractères cellulaires

L'examen à l'état frais des suspensions bactériennes permet de mettre en évidence, la forme ainsi que la mobilité des souches étudiées. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I) contenant les bactéries jeunes, nous avons pris une suspension bactérienne et déposée sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10×40 (Figure 3).

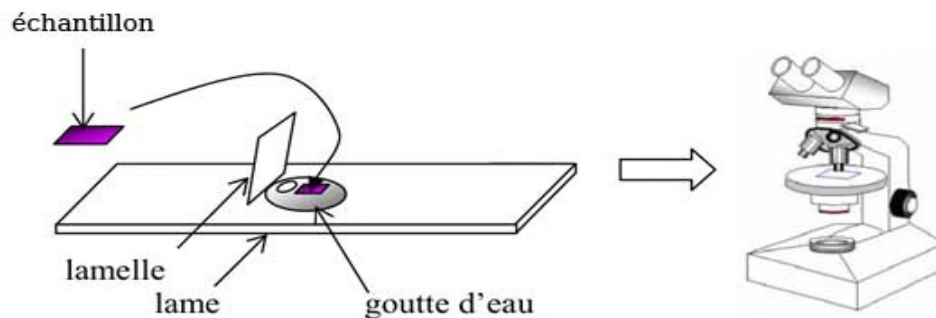


Figure 2 : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.

Coloration de Gram

Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet d'identifier les bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Tortora et *al.*, 2003). Le protocole suivi est ci-dessous :

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

II.2 Caractères cultureux

Les souches étudiées sont cultivées sur boîtes de Petri contenant le milieu de culture solide YMA (Annexe I). Après incubation à 28°C pendant 10 jours, nous avons étudié la couleur, la forme, l'aspect et la production d'exopolysaccharides de ces souches.

II.3 Caractères biochimiques

III.3.1 Test de Bleu de Bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré Bleu de Bromothymol à une concentration de 0,0025% (w/v) (Annexe I). Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C pendant 6 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncé indique une réaction basique.

II.3.2 Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron), nous renseigne sur la dégradation des sucres par les souches étudiées, qui est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique devient rouge et en milieu acide devient jaune. La pente de la gélose estensemencée par stries serrés, puis le culot par piqûre profonde et centrale. L'incubation se fait à 28°C pendant 6 jours. La lecture se fait comme suit :

- **Fermentation de glucose**
 - Culot rouge : glucose non fermenté
 - Culot jaune : glucose fermenté
- **Fermentation du lactose et/ou du saccharose**
 - Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
 - Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)
- **Production de gaz**
 - Apparition de gaz dans le culot sous forme de bulles.
- **Formation d'H₂S**
 - Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

II.3.3 Test d'API 20 NE:

API 20 NE (BioMérieux SA) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, combinant (08) tests conventionnels et douze (12) tests d'assimilation. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau (Annexe III).

Ensemencement de la galerie

Après avoir préparé les cultures bactériennes des quatorze (14) souches sur milieu YMB, nous avons appliqué le protocole comme suit :

- Remplir les cupules de suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur en évitant les bulles d'air.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT et PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe.
- Enfin remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte et incuber à 28°C pendant 6 jours.

II.4 Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques

La sensibilité et la résistance des souches de rhizobia aux antibiotiques sont évaluées par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose YMA. Les boîtes sont ensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions des pré-cultures préparées précédemment à raison de 10^8 cellules bactériennes/ml déterminé par comptage à la cellule de Malassez. Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince.

La sensibilité des souches étudiées aux quatre (04) antibiotiques testés (Tableau II) est déterminée selon les recommandations établies par le Comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Beaucaire, 2002).

Tableau II : Les charges et diamètres critiques des antibiotiques testés

Antibiotiques	Symboles	Charges	Diamètres critiques (mm)		Familles
			Sensible (S)	Résistant (R)	
Gentamycine	Gen	10 µg	≥18	<16	Aminosides
Oxacilline	Ox	5 µg	≥20	<18	Tétracyclines
Tétracycline	TE	30UI	≥19	<17	Tétracyclines
Erythromycine	E	15µg	≥22	<19	Macrolides

II.5 Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister aux métaux lourds. Quatre (04) métaux lourds ont été testés (Tableau III) sous forme de sels hydrosolubles sont : le zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$), le plomb ($\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$), le cadmium ($3\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}$) et le cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$).

Les concentrations ont été choisies selon les études faites par Abou-Shanab et *al.*, (2007).

Tableau III : Volumes et concentrations des métaux utilisés.

Concentrations et volumes Métaux lourds	C_f ($\mu\text{g/ml}$)	V_0 (ml)	V_m (ml)	V_f (ml)	C_0 ($\mu\text{g/ml}$)
Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	50	0.075	149.925	150	100×10^3
	100	0.15	149.85		
	200	0.30	149.70		
	400	0.60	149.40		
Acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$)	50	0.25	149.75	150	30×10^3
	100	0.5	149.50		
	200	1	149		
	400	2	148		
Sulfate de cadmium ($3\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}$)	25	0.375	149.963	150	10×10^3
	50	0.75	149.925		
	100	1.5	149.85		
	200	3	147		
Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	12.25	0.0375	149.963	150	50×10^3
	25	0.075	149.925		
	50	0.15	149.85		
	100	0.30	149.70		

C_f = Concentration finale du métal. V_0 = volume de la solution mère (métal). V_m = volume du milieu. V_f = Volume finale du milieu. C_0 = Concentration des solutions mère.

A partir des solutions initiales de métaux lourds, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés à un volume de gélose YMA, afin d'avoir un volume final de 150 ml. Les boîtes sontensemencées en spot à raison de $10\mu\text{l}$ (10^8 cellules bactériennes/ml déterminé par comptage à la cellule de Malassez) sur les différents milieux.

Après incubation à 28°C pendant 6 jours. La présence ou absence de croissance est notée pour chaque souche et pour chaque concentration de métaux.

Pour déterminer et évaluer la sensibilité des souches, nous avons calculé les concentrations minimales inhibitrices en tenant compte des travaux fait par Abou-Shanab et *al.*, (2007), présenté dans le Tableau IV.

Nous considérons que les souches étudiées qui poussent à des concentrations supérieures aux valeurs critiques sont résistantes.

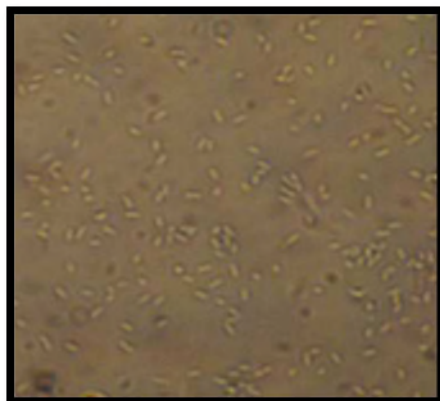
Tableau IV : Les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds (Abou-Shanab et *al.*, 2007).

Métaux	Concentration (µg/ml)
Cd	112,41
Zn	65,38
Cu	63,50
Pb	207,20

Chapitre III : Résultats et Discussions

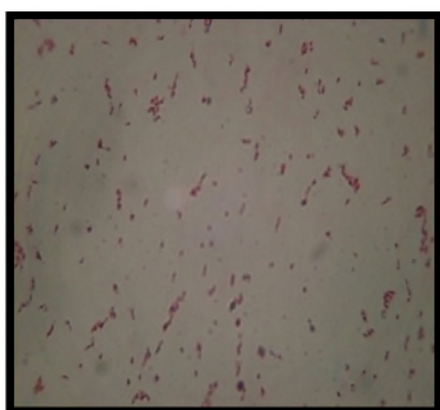
I. Caractères cellulaires

L'observation microscopique des suspensions bactériennes, âgées de 6 jours, montre que les souches sont des bâtonnets aux extrémités arrondies et mobiles (Photo 2). La coloration de Gram a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif (Photo 3).



S4

Photo 2 : Observation microscopique de la souche S4, prise comme exemple, sous microscope optique à l'état frais (Grossissement 10 ×40).



S4

Photo 3 : Résultats de la coloration de Gram de la souche S4, prise comme exemple, (Grossissement 10 ×100).

II. Caractères cultureux

Après ensemencement et incubation des souches à 28°C pendant 6 jours, nous avons obtenu des colonies de formes arrondies, de couleur beige, opaques, dépourvues d'exopolysaccharides et d'un aspect lisse et bombé (Photo 4).

L'apparition des colonies après 6 jours d'incubation suggère que ces bactéries sont à croissance lente (Jordan 1982, 1984). Ceci confirme les résultats préliminaires de l'analyse génotypique en cours.

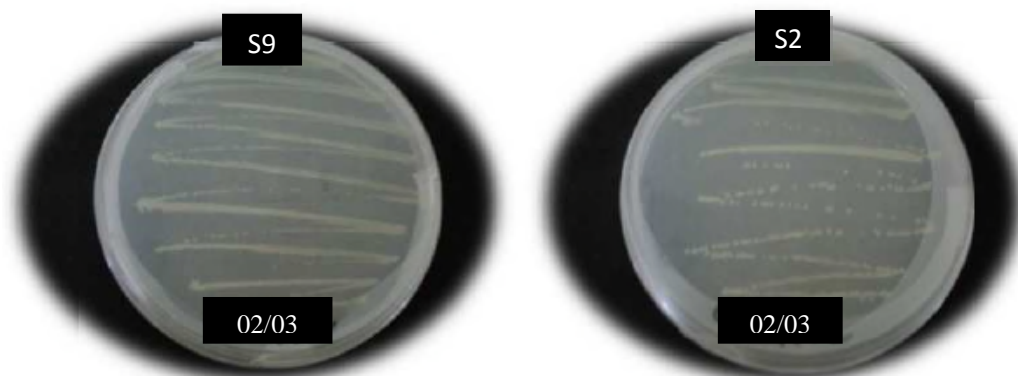


Photo 4 : Aspect des colonies, exemple des souches S9 et S2, obtenues sur milieu YMA.

III. Caractères biochimiques

III.1 Test du Bleu de Bromothymol (BTB)

Le bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers au jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue.

Dans notre cas toutes les souches testées alcalinisent le milieu à l'exception de la souche S9 qui a acidifié le milieu YMA additionné de BTB (Photo 5).

Cette alcalinisation du milieu suggère l'appartenance de ces souches au genre *Bradyrhizobium* à croissance lente. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira *et al.*, (1993).

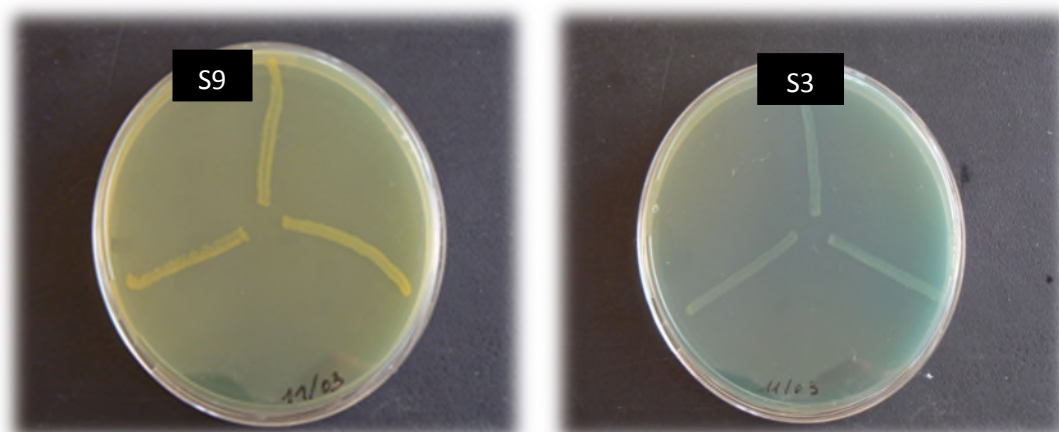


Photo 5 : Résultats de réaction des souches S9 et S3 en milieu YMA+BTB.

III.2 Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Après ensemencement et incubation des souches sur milieu TSI, aucune souche y compris les souches de références ne fermente ni le lactose, ni le saccharose, ni le glucose et aucune production du gaz et de H₂S ne s'est produite (Tableau V et Photo 6).

Tableau V : Résultats des souches au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S.

Les souches	Pente		Culot		H ₂ S
	Lactose/Saccharose	Glucose	Gaz		
S1	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-
S8	-	+	-	-	-
S9	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-
<i>B.japonicum</i> USDA6	-	-	-	-	-
<i>B.canariense</i> BTA-1	-	-	-	-	-
<i>B. cytisi</i> CTAW11	-	-	-	-	-
<i>B. elkanii</i> USDA76	-	-	-	-	-



Photo 6 : montrant la réaction négative des souches (exemple S1) au test de fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S.

III.3 Test d'API 20 NE

Les résultats obtenus des galeries API 20 NE sont présentés dans le Tableau VI.

Tests conventionnels

Après ensemencement et incubation à 28°C pendant 6 jours, deux réactifs nitrate I et nitrate II (Annexe II) ont été ajoutés à la cupule de NO₃. Toutes les souches y compris les souches de références possèdent le nitrate réductase.

Aucune production d'indole à partir du tryptophane pour toutes les souches testées y compris les souches de références. Ce résultat confirme les résultats obtenus par Boulila (2002).

Concernant la fermentation du glucose, elle est observée uniquement pour la S8 indiqué par la couleur jaune sur le milieu.

Le test de recherche d'enzyme arginine dihydrolase montre que toutes les souches la possèdent, sauf S7, *B. cytisi* CTAW11 et *B. elkanii* USDA76.

Toutes les souches testées y compris les souches de références possèdent l'uréase en diffusant la couleur rose.

La couleur noir du test ESC est expliqué par l'hydrolyse de l'esculine par les β -glucosidase, a été observée pour toutes les souches y compris les souches de références, à l'exception de *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11.

Le test de recherche de la protéase, montre que les souches S1, S2, S3, S4, S5, S9, S10, *B. canariense* BTA-1 et *B. elkanii* USDA76 possèdent cette enzyme par la diffusion de pigments noir. Cependant elle est absente chez les souches S7, S8, *B. japonicum* USDA6 et *B. cytisi* CTAW11.

Toutes les souches testées y compris les souches de références ne possèdent pas la β -galactosidase, contrairement aux souches S4, S6, *B. canariense* BTA-1 et *B. elkanii* USDA76 qui le possèdent en donnant une couleur jaune (Photo 7).

Tests d'assimilations

Le test d'assimilation des sucres montre une bonne assimilation du glucose, mannose, mannitol, et potassium gluconate (Photo 7).

Concernant les autres sucres, une variabilité de résultats est observée chez la plupart des souches. En effet, l'arabinose est assimilé par toutes les souches à l'exception de *B. canariense* BTA-1. Alors que le glucose, le mannitol et le mannose sont assimilés par toutes les souches. Le maltose est assimilé par toutes les souches, à l'exception des souches S6, *B. cytisi* CTAW11 et *B. canariense* BTA-1.

Concernant l'assimilation de N-acétyl- glucosamine, la majorité des souches y compris la souche de référence l'assimile à l'exception de S7, *B. cytisi* CTAW11, *B. japonicum* USDA6 et *B. canariense* BTA-1.

Aucune assimilation d'acide caprique n'est observée chez toutes les souches testées y compris les souches de références.

Absence d'assimilation d'acide adipique chez la majorité des souches y compris celles de références, sauf chez les souches S7, *B. japonicum* USDA6 et *B. elkanii* USDA76.

Nous constatons également absence de l'assimilation d'acide phénylacétique, sauf pour les souches S6, S8 et *B. elkanii* USDA76.

IV. Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques

Après incubation des cultures bactériennes, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus sont mesurés autour des disques d'antibiotiques (Tableau VII).

La lecture des tests est faite selon les critères définis par le comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

Tableau VII : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisées en (mm).

Souches ATB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	B. j	B. c	B. cy	B. el
Tétracycline	38	25	30	50	40	20	38	0	40	30	30	30	0	5
Erythromycine	25	10	0	30	0	0	25	5	0	0	0	10	0	0
Oxacilline	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	40	0
Gentamycine	20	22	20	24	22	15	20	20	16	20	15	28	20	14

Les résultats d'antibiogramme réalisés sur quatorze (14) souches avec quatre (04) antibiotiques montrent une résistance variable d'une souche à une autre (Tableau VIII et Photo 8).

Tableau VIII : Sensibilité et résistance des souches étudiées aux antibiotiques.

Souches ATB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	B. j	B. c	B. cy	B. el
Tétracycline	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
Erythromycine	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Oxacilline	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Gentamicine	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S	S	R

R : Résistant

S : Sensible

I : Intermédiaire

En effet, les souches isolées de *Genista numidica* y compris les souches de références, présentent une résistance bien marquée à la oxacilline (92,85%) et érythromycine (85,71%). La tétracycline qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines et de la membrane plasmique présente une action très importante puisque seulement (21,42%) des souches lui sont résistantes. Il est de même pour la gentamycine uniquement (28,57%) des souches lui sont résistantes (Figure 3).

Il a été rapporté que les antibiotiques de la famille des aminosides tel que gentamycine inhibent la synthèse protéiques des bactéries (Zomahoun, 2004).

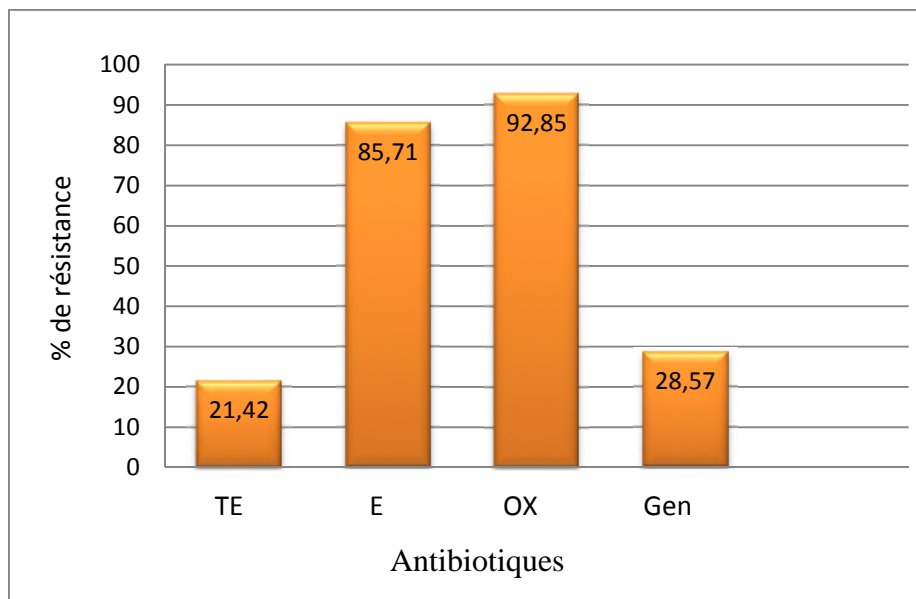


Figure 3 : Pourcentage de résistance des souches testées vis-à-vis les antibiotiques.

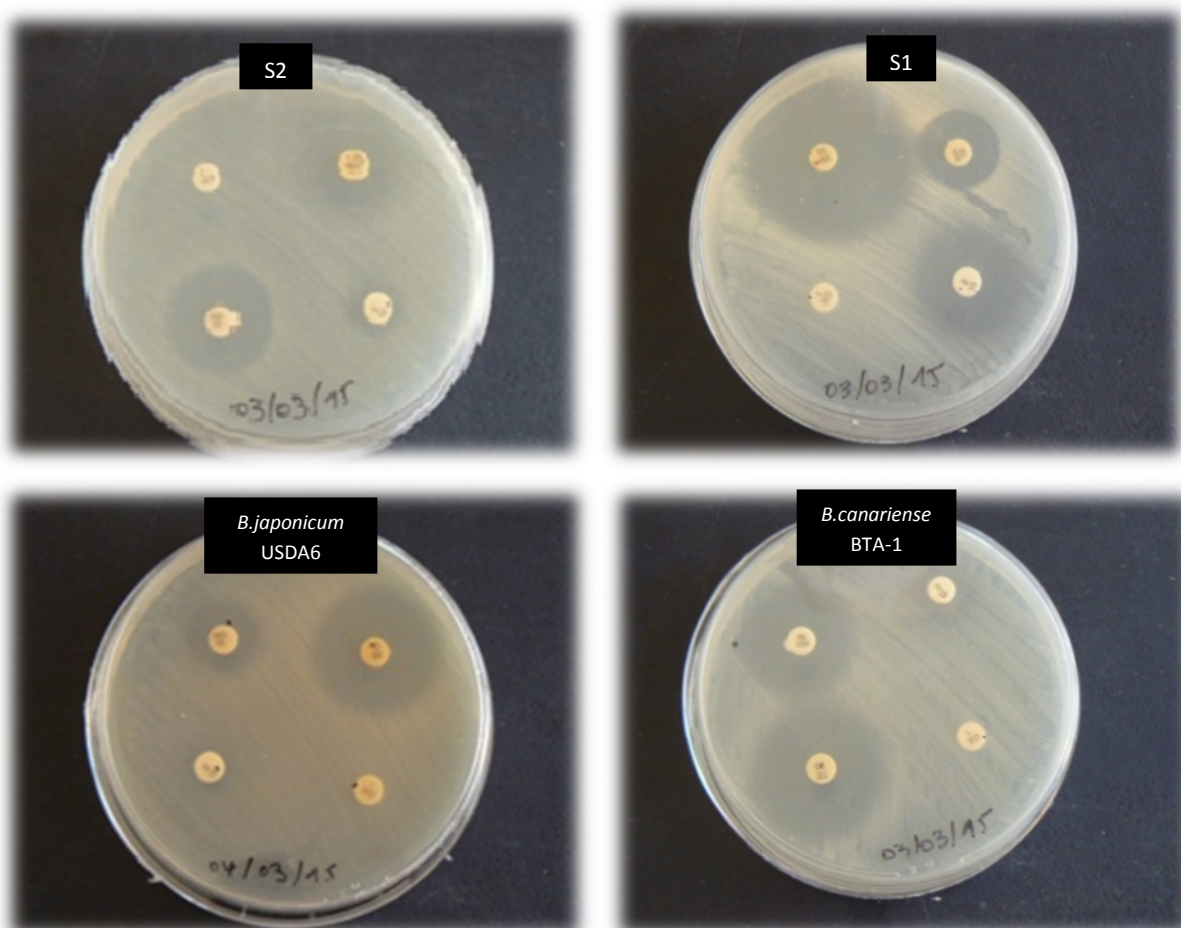


Photo 8 : Résistance et sensibilité de certaines souches vis-à-vis les antibiotiques (S1, S2, *B. japonicum* USDA6, *B. canariense* BTA-1).

V. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches

Les résultats obtenus (Tableau IX) montrent une hétérogénéité de réponse des souches vis-à-vis des métaux lourds étudiés (Photo 9, p29). Toutefois la croissance diffère en fonction de la souche, du métal et de la concentration considérée.

Dans le cas du zinc, nous remarquons que (50 %) des souches ne croissent pas à partir des concentrations de l'ordre de 50 µg/ml (Figure 4, p28). Seules les souches S3, S4, S5, S8 et *B. canariense* BTA-1 sont capables de croître à 50 µg/ml, cependant leur croissance diminue en fonction de l'augmentation des concentrations. *B. japonicum* USDA6 est la seule souche qui pousse dans toutes les concentrations testées du zinc.

En ce qui concerne le plomb, seulement (42.85%) des souches se développent sur un milieu contenant 50 µg/ml de ce métal (Figure 5, p28). Cependant *B. japonicum* USDA6 est, là aussi, la souche qui pousse d'une façon très importante en sa présence.

Aucune croissance n'a été possible pour toutes les souches testées en présence du cadmium.

Pour le cuivre, la plupart des souches poussent à toutes les concentrations testées (Figure 6, p28), à l'exception des souches S7, S9, S10 et *B. cytisi* CTAW11.

Tableau IX : Croissance des souches testées en présence de différentes concentrations aux métaux lourds ($\mu\text{g/ml}$).

Métaux	Concentrations											<i>B.japonicum</i> USDA6	<i>B.canariense</i> (BTA-1)	<i>B.cytisi</i> CTAW1	<i>B.elkanii</i> USDA76
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10					
Zinc (Zn)	50	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+/-
	100	-	-	+	+	+	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-
	200	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Plomb (Pb)	50	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+/-
	100	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	200	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cadmium (Cd)	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuivre (Cu)	12.25	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
	50	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	-
	100	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	-

(+) : croissance

(+/-) faible croissance

(-) : absence de croissance.

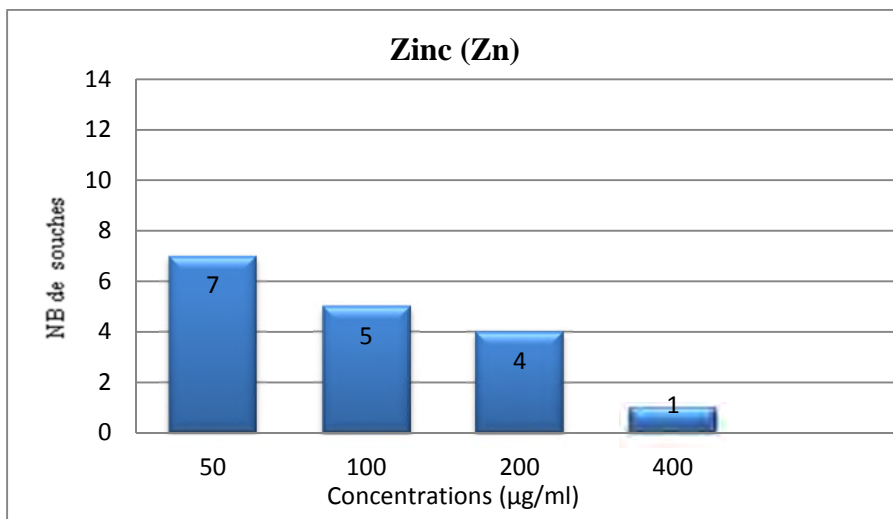


Figure 4 : Taux de croissance de souches testées au zinc (Zn).

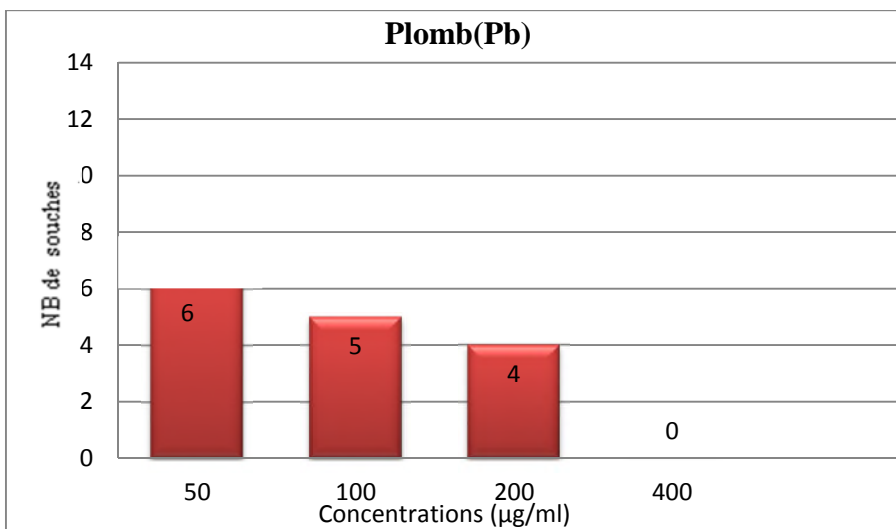


Figure 5: Taux de croissance des souches testés au Plomb (Pb).

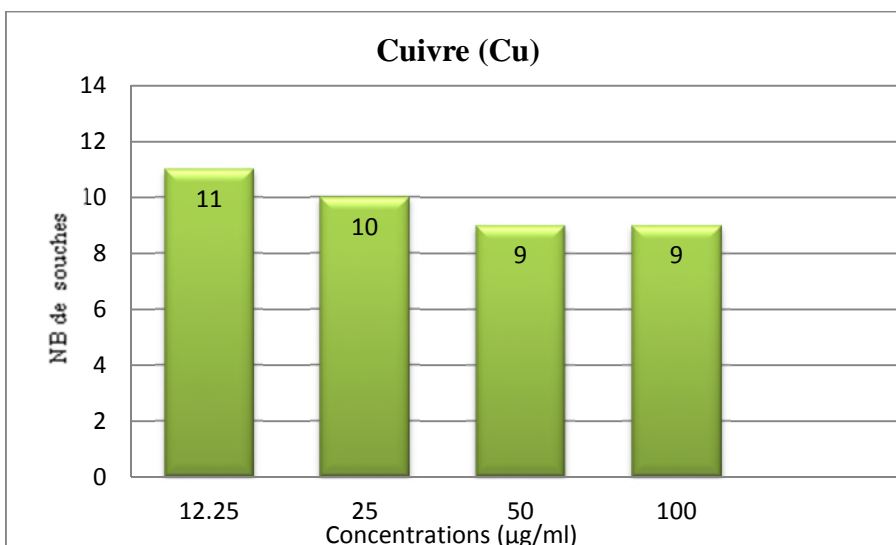


Figure 6 : Taux de croissance des souches testées au cuivre (Cu).

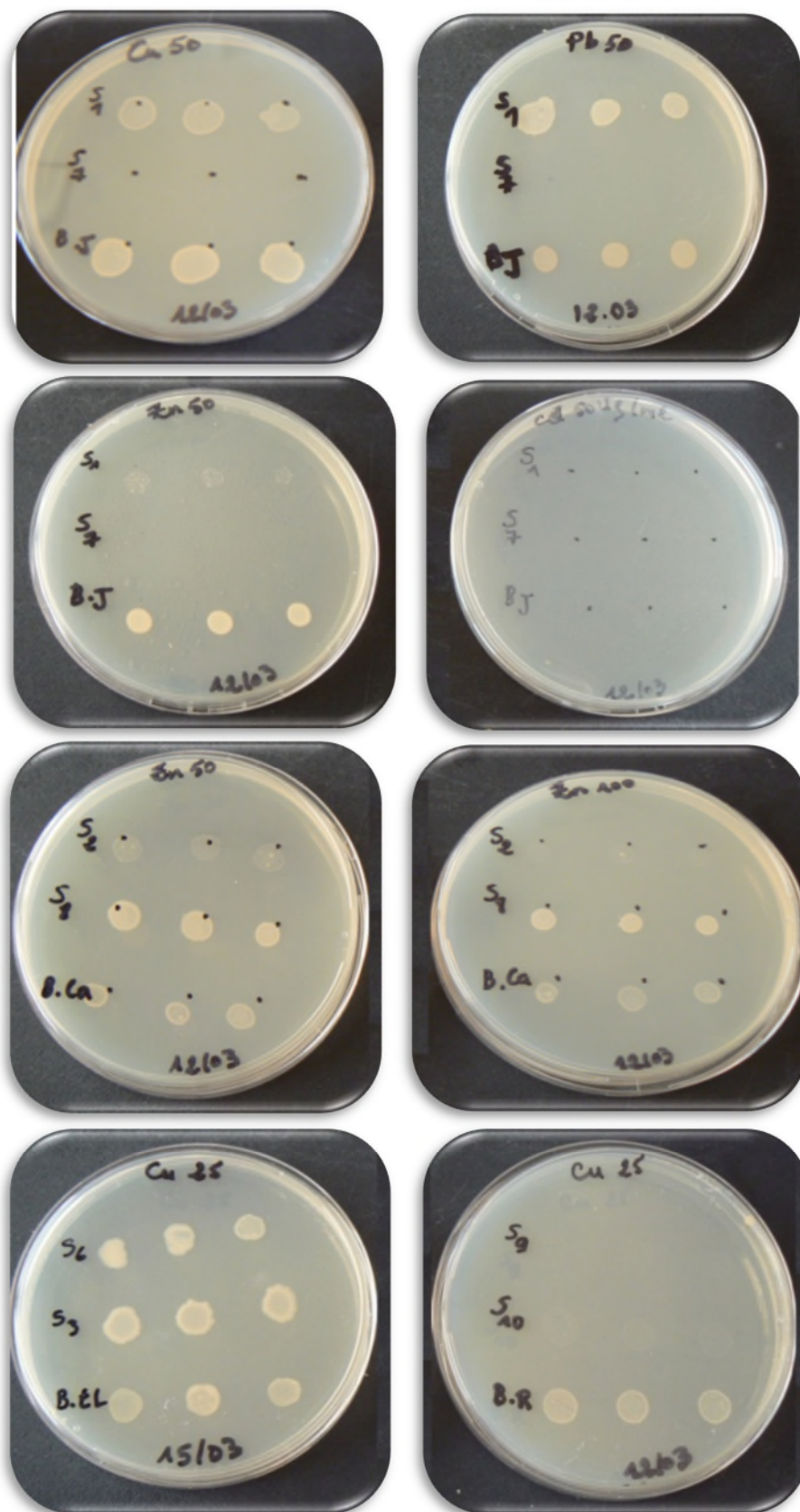


Photo 9: Croissance de certaines souches en présence de différents métaux lourds.

VI. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds

Les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices sont présentés dans le tableau X.

La plupart des souches isolées de *Genista numidica* présentent une CMI inférieure à 50 µg/ml pour le zinc et le plomb, à l'exception des souches S3, S4, S5 et *B. japonicum* USDA6. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues par Abou-Shanab et *al.*, (2007) avec des CMI respectivement de 65.38 µg/ml et 207.20 µg/ml.

Les valeurs de CMI de cadmium sont inférieures à 25 µg/ml pour toutes les souches étudiées y compris les souches de références. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par Abou-Shanab et *al.*, (2007) qui avait donné une CMI de 112.41 µg/ml.

Dans le cas du cuivre, la plupart des souches ont une CMI supérieure à 100 µg/ml comme *B. japonicum* USDA6 et *B. canariense* BTA-1. Seules les souches S7, S9 et S10 sont très sensibles au cuivre avec une CMI inférieure à 12.25 µg/ml. Cette valeur est supérieure à celle trouvée par Abou-Shanab et *al.*, (2007) avec une CMI de 63.50 µg/ml.

Un excès de zinc et de plomb exercent un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des rhizobia mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Giller *et al.*, 1998).

Le cadmium et le cuivre sont connus comme étant néfastes aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Gusmao-lima et *al.*, 2005).

Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices des souches testées vis-à-vis des métaux lourds

Métaux Souches	Zn	Pb	Cd	Cu
S1	< 50	200	< 25	> 100
S2	< 50	50	< 25	> 100
S3	400	400	< 25	> 100
S4	400	400	< 25	> 100
S5	400	400	< 25	> 100
S6	< 50	100	< 25	> 100
S7	< 50	< 50	< 25	< 12.25
S8	200	< 50	< 25	> 100
S9	< 50	< 50	< 25	< 12.25
S10	< 50	< 50	< 25	< 12.25
<i>B. japonicum</i> <i>USDA6</i>	> 400	400	< 25	> 100
<i>B. canariense</i> <i>BTA-1</i>	100	< 50	< 25	> 100
<i>B. cytisi</i> <i>CTAW11</i>	< 50	< 50	< 25	25
<i>B. elkanii</i> <i>USDA76</i>	100	100	< 25	50

Les concentrations sont exprimées en µg/ml. **Zn** : Zinc, **Pb** : Plomb, **Cd** : Cadmium, **Cu** : Cuivre.

VII. Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds

Les résultats de la sensibilité et de la résistance sont présentés dans le tableau XI et figure 7.

Dans le cas du zinc (50%) des souches lui sont résistantes, ce taux de résistance est inférieur à celui obtenu (100%) par Abou-Shanab et *al.*, (2007).

En ce qui concerne le plomb, seulement (28.57%) des souches résistent à ce métal.

Le cadmium est le métal le plus toxique inhibant (100%) des souches étudiées y compris celles de référence.

La plus forte résistance est observée dans le cas du cuivre dont (64.28 %) des souches lui sont résistantes, ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Abou-Shanab et *al.*, (2007) et qui est de (98%). L'ordre de toxicité des métaux a été jugé selon les résultats obtenus comme suit : Cd > Pb > Zn > Cu.

Angel et *al.*, (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de rhizobia sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'elles ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (Kinkle et *al.*, 1987).

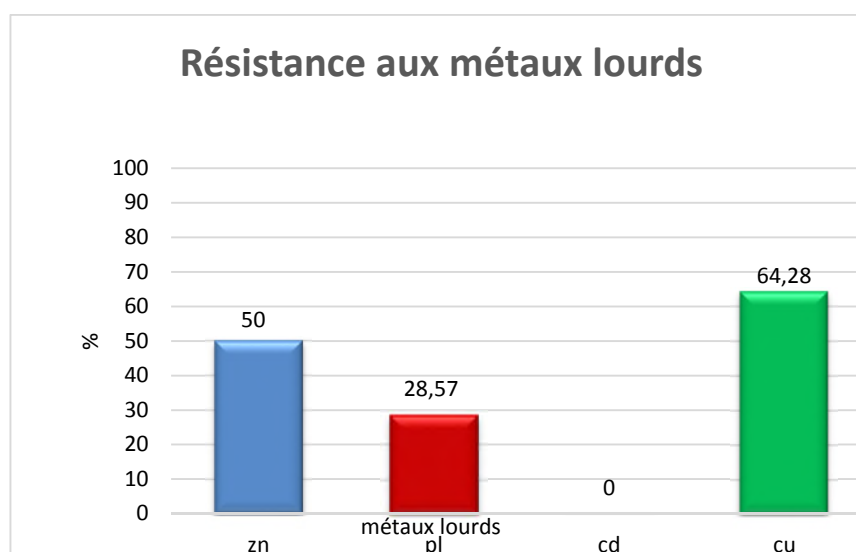


Figure 7 : Pourcentage de résistances des souches étudiées aux différents métaux lourds.

Tableau XI : Sensibilité et résistances des souches étudiées aux métaux lourds

Métaux Souches	Zn	Pb	Cd	Cu
S1	S	S	S	R
S2	S	S	S	R
S3	R	R	S	R
S4	R	R	S	R
S5	R	R	S	R
S6	S	S	S	R
S7	S	S	S	S
S8	R	S	S	R
S9	S	S	S	S
S10	S	S	S	S
<i>B. japonicum</i> USDA6	R	R	S	R
<i>B. canariense</i> BTA-1	R	S	S	R
<i>B. cytisi</i> CTAW11	S	S	S	S
<i>B. elkanii</i> USDA76	R	S	S	S

VIII. Résistance combinée des rhizobiums aux antibiotiques et aux métaux lourds

Les résultats de la combinaison de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds sont présentés dans le tableau XII. Ces résultats montrent que la plupart des souches sont résistantes au même temps aux antibiotiques et aux métaux lourds. Cependant S7, S9, S10 et *B. cytisi* CTAW11 présentent une résistance uniquement aux antibiotiques.

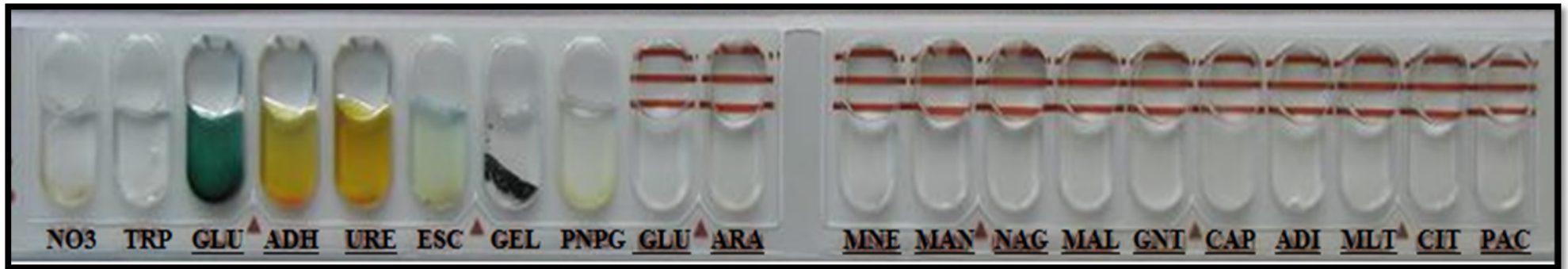
Les souches S3, S4, S5, isolées de *Genista numidica* sont celles qui présentent un profil le plus important de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Ces souches pourraient être intéressantes pour un éventuel projet de bioremédiation des sols.

Tableau XII : Phénotypes de résistance des souches aux antibiotiques et aux métaux lourds.

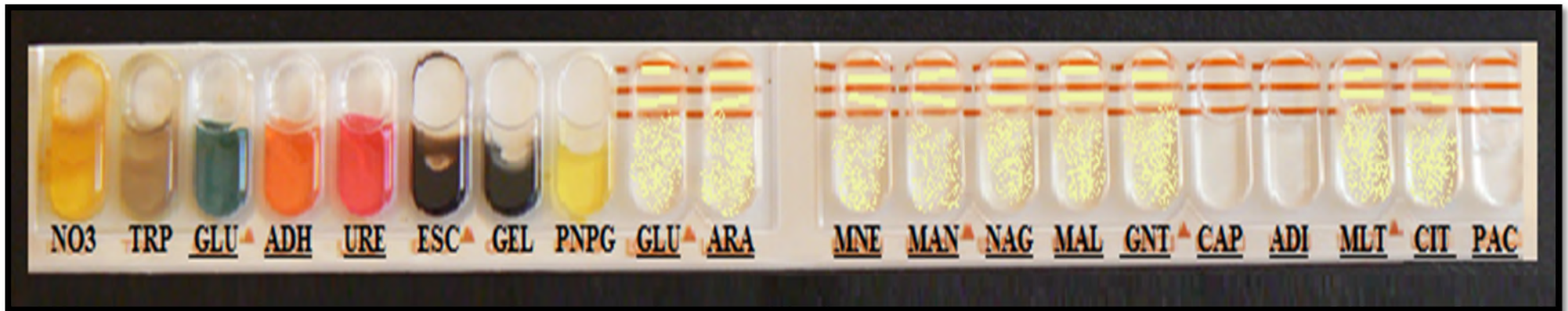
Souches	Antibiotiques	Métaux lourds
S1	OX	Pb, Cu
S2	E, OX	Cu
S3	E, OX	Zn, Cu, Pb
S4	E, OX	Zn, Cu, Pb
S5	E, OX	Zn, Cu, Pb
S6	E, OX, Gen	Cu
S7	OX	0
S8	E, OX, TE	Zn, Cu
S9	E, OX	0
S10	E, OX	0
<i>B. japonicum</i> USDA6	E, OX, Gen	Zn, Cu, Pb
<i>B. canariense</i> BTA-1	E, OX	Cu
<i>B. cytisi</i> CTAW11	E, TE	0
<i>B. elkanii</i> USDA76	E, OX, TE, Gen	Cu

Tableau VI : Résultats de galerie API 20 NE

Tests	Souches										<i>B.japonicum</i> USDA6	<i>B.canariense</i> BTA-1	<i>B.cytisi</i> CTAW11	<i>B.elkanii</i> USDA76
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10				
NO₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
URE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GEL	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-
PNPG	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-	-	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
MAL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADI	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
MLT	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CIT	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
PAC	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+



A



B

Photo 7: Résultats de la souche S4, prise comme exemple, au test API 20 NE système en présence d'un témoin négatif.

A : Avant le test B : Après le test

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué la caractérisation phénotypique de dix (10) souches nodulant *Genista numidica* et quatre (04) souches de références à travers plusieurs caractères cellulaires, culturels, physiologiques et biochimiques.

L'apparition des colonies des souches étudiées après 6 jours d'incubation à 28°C, suggère leur appartenance au rhizobia à croissance lente. Les caractéristiques morphologiques et cellulaires répondent aux critères des rhizobia connus dans la littérature.

Les résultats de la caractérisation biochimique montrent que tous les isolats produisent une réaction d'alcalinisation sauf pour la souche S9 qui a montré une réaction d'acidification en milieu YMA+ BTB. Concernant le test de la fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S, les isolats testés ont révélé des résultats négatifs.

L'évaluation de la résistance des souches étudiées aux antibiotiques montre une résistance vis-à-vis de l'oxacilline (92,85%) et l'érythromycine (85,71%), contrairement à la gentamycine et tétracycline d'un taux de résistance respectivement (28.57%) et (21.42%).

Concernant la résistance aux métaux lourds les résultats montrent différents niveaux de résistance chez les souches étudiées vis-à-vis du zinc (50%), du plomb (28.57%), du cadmium (0%) et du cuivre (64.28%).

L'ordre de la toxicité des métaux a été jugé selon les résultats que nous avons obtenus comme suit : Cd > Pb > Zn > Cu.

Les souches S3, S4, S5 isolées des nodules racinaires de *Genista numidica* présentent le profil le plus important dans la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Ces dernières pourraient être intéressantes pour un éventuel projet de bioremédiation des sols contaminés.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Etudier le comportement de résistance des rhizobiums en présence d'autres antibiotiques et d'autres métaux lourds.

- Etudier le comportement de ces souches vis-à-vis de différents facteurs abiotiques tels que le stress hydrique, stress salin, stress thermique et acidité et alcalinité du sol.
- Caractériser la nature des gènes de résistance afin d'acquérir des informations sur le patrimoine génétique de la résistance aux antimicrobiens dans les sols.
- Faire une étude sur le mécanisme de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les rhizobiums afin d'évaluer leur utilisation potentielle dans la fertilisation des écosystèmes pollués.

Références Bibliographiques

- Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum P et Angel J.S. (2007).** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. **68** : 360-367.
- Angel, J.S., Mc Grath, S.P., Chaudri, A.M., Chaney, R.L et Giller, K. E. (1993).** Inocuation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. *S Biol Biochem*. **25**, 575-580.
- Ardley J.K., Parker M.A., De Meyer S.E., Trengove R.D., O'hara G.W., Reeve W.G., Yates R.J., Dilworth M.J., Willems, A et Howieson JG. (2012).** *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial rootnodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 2579-2588.
- Ati, S. (2010).** Cartographie de la répartition de l'espèce *Genista numidica* et sa valeur biologique dans l'EST algérien. Mémoire de Magister en Ecologie Végétale. Université Badji- Mokhtar- Annaba. p 24.
- Boulila, F. (2002).** Contribution de la diversité des rhizobia isolés de *Medicago minima* de la région de Bejaïa. Thèse de Magister. Université Abderrahmane Mira. Bejaïa. 85p.
- Chahboune R., Carro, L., Peix, A., Barrjal, S., Velazquez, E., Bedmar, E.J. (2011b).** *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. Isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Sys Appl Microbiol.* **61** : 2922-2927.
- Chen, W.X., Yan, G.H., et Li, J.L. (1988).** Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 392- 397.
- Cloutier, J., D. Prévost, P. Nadeau, et H. Antoun. (1992).** Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2846-2853.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L et Gillis, M. (1988).** Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.
- Doyle, J.J. et Luckow, MA. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900–10.
- 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 Microbiol et Biol Molécul. Université de Rabat. 206 p.

- Frank, B. (1889).** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7, 332-346.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H. et Walker, G.C. (2008).** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Ann Rev of Genet.* 42: 413–441.
- Giller, E.K., Witter, E et Mc Grath, S.P. (1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30 : 1389-1414.
- Giraud, E et Fleischman, D. (2004).** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research.* 82: 115–130.
- Gould, I.M. (2005).** Antibiotic use-ecological issues and required actions. Department of Medical Microbiology, Aberdeen Royal Infirmary, Foresterhill, Aberdeen, Scotland AB25 2ZN, UK. 15 :701-715.
- Gusmão-Lima, A. I., Figueira, E., De Almeida, M. P. et Pereira, S.I.A. (2005).** Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* 51 : 7-14.
- Hopkins, W.G. (2003).** Physiologie végétale. 1er édition. Edition de Boeck. Paris. 514p.
- Jarvis, B. D. W., van Berkum, P.W.X., Chen, S., Nour, M. P., Fernandez, Cleyet- Marrel, J. C. et M. Gillis. (1997).** Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 895-898.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. et Lester, J.N. (2002).** Aquatic environmental assessment of the top 25 english prescription pharmaceuticals, *Water Res.* 36, 5013-502.
- 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, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 136-139.
- Jordan, D.C. (1984).** Family III. Rhizobiaceae, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p.234-242.
- Kinkele, B. K., Angel, J. S. et Keyser, H.H. (1987).** Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *J of Appl Microbiol.* 53, 315-319.
- Kurlaze, G. V. (2007).** Environmental Microbiology Research Trends. Nova Science Publishers. Inc. pp : 239-245.
- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E. et Udell S.E. (1992).** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp nov. *Can. J. Microbiol.* 38 : 501-505.

- Laranjo, M., Branco, C., Soares, R., Alho, L., Carvalho, M.D.E. et liveira, S. (2002).** Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. J of Appl Microbiol. Volume **92** Issue 6 Page 1043.
- Liu, T-X. (2008).** Soil ecology research developments. Nova Science Publishers, Inc. p 139-145
- Lograda, T., (2010).** Etude Caryologique et Phytochimique de Six Espèces Endémiques du genre *Genista* L. en Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences Biologie Végétale. Université Ferhat ABBAS de Sétif. 150 p.
- Lopez Gonzalez G. (2001).** Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Ed. Mundi Prensa, Madrid, Spain.
- Maire., R. (1987).** La flore de l'Afrique du Nord, les légumineuses. Le chevalier edition Paris XVI.
- Martins A., Wink M., Tei A., Brum-Bousquet M., Tillequin F. et Rauter AP. (2005).** A Phytochemical Study of the Quinolizidine Alkaloids. 144 from *Genista tenera* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry., Phytochem. Anal. **16**: 264-266.
- Mantelin S., Marion F., Zakhia, F., Gilles, B., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P. et Cleyet-Marel, J.C. (2006).** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. **56** (4): 827.
- Merabet, C. (2007).** Diversité et rôle des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- Moreira, F.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., et Franco, A. A. (1993).** Characterisation of rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Syst. Appl. Microbiol. **16** : 135-146.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. et Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the β - subclass of *Proteobacteria*. Nature N° 411 pp 948-950.
- Monchy S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles.99p.
- Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., kotepong, s., Suzuki, A., Higashi, S. et Abe, M. (2004).** a novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobacterium* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. J. gen. Appl. Microbiol. **50**, 17- 27.

- Pedrosa F.O. (1988).** Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated nitrogen-fixing bacteria. C.R.P. Science. **6** :345-384.
- Peret B. (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat en Physiologie végétale. Université Montpellier II. France. 70p.
- Prévost, D., H. Antoun, and L. M. Bordeleau. (1987).** Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. FEMS Microbiol. Ecol. **45** : 205-210.
- Polhill R.M. (1976).** *Genisteeae* (Adans.) Bentham and related tribes (*Leguminosae*)., Bot. Syst., **1**: 143-368.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Gillis, M. et Velazquez, E. (2003).** Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. Syst. Appl. Microbiol. **26**, 47-53.
- Sam, 1997.** Dossier les métaux lourds. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. P12.
- Sy, A., Girau, E., Jordan, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. et Dreyfus, B. (2001).** Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J.Bacteriol. **183**, 214-220.
- Tortora, GJ., Funk, B.R. et Case, C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Eddition Renouveau Pédagogique Inc. 945 p.
- Untereiner G. (2008).** Etude de l'impact des bactéries environnementales sur la spéciation de l'Uranium en vue de processus de bioremédiation. Thèse de Doctorat de microbiologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). 296p.
- Vandamme, P. et Coenye, T. (2004).** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int J of Syst and Evol Microbiol. **54**: 2285–2289.
- Vinuesa P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez- Galdona, R., Werner, D. et Martinez-Romero, E. (2005).** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov. an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55** : 569-575.
- Werner, D. (1992).** Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Acad Sin: 39.

Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol and Molec Biol Rev.* **63**: 968-989.

Zhang, F., Charles, T.C., Pan, B. et Smith, D.L. (1996). Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1579-1583.

Zomahoun C. et Irédé N. P. (2004). Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier. Thèse de doctorat en Pharmacie, Faculté de médecine, de Pharmacie et d'Ondoto – Stomalogie. Université du Mali. 107p.

References électroniques

- www.biokar-diagnostics.fr (code document Code document : BK059/F/2003-06 : 6).
- <http://www.eurekasante.fr/medicaments/antibiotiques/effets-indesirables.html>
- http://plantillustrations.org/species.php?id_specie=457655:
- <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.

Annexes

Annexe I : Composition des Milieux de Cultures

Yeast – Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH ajusté à 6,8

Yeast – Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970)

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl	0,1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée,	1000 ml

pH ajusté à 6,8

b - Milieux utilisés pour la caractérisation biochimiques

Préparation de la solution du BTB

Mélanger 0,5g de BTB dans 100ml d'éthanol, puis stériliser le mélange par filtration. Conserver cette solution à 4°C. Ajoutez 5ml de la solution dans 1 litre de YEM préalablement stérilisé. La concentration finale du BTB dans le milieu est de 25ppm (El hilali, 2006).

Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf.....	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone tryptique	20 g

Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,05 g
Agar	12 g

pH ajusté à 7,4

Annexe II : Composition des réactifs

Réactif de Griess I (Nitrate I)

Acide parasulfanilique.....	8 g
Acide acétique 5N	1 l

Réactif de Griess II (Nitrate II)

α -naphtylamine.....	6 g
Acide acétique 5N	1 l

Réactif de Kovacs

Alcool amylique	5 g
Paradiméthylamino-benzaldéhyde	75 ml
HCl Pur.....	25 ml

Annexe III : Composition de la galerie API 20 NE

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup)	Réactions/Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
NO ₃	Potassium nitrate	0.136	Réduction de Nitrates en nitrites	N1+N2/5min	
			Réduction de Nitrites en azote	Incolore	Rose-jaune
				Zn/5min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0.2	Formation d'indole (Tryptophane)	JAMES/immédiat	
				Incolore vert pâle/jaune	Rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUcose)	Bleu à vert	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
<u>URE</u>	Urée	0.76	UREase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56	Hydrolyse (β -glucosidase) (ESCulline)	Jaune	Gris/maron/noir
		0.072			
GEL	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D- galactopyranoside	0.22	β -galactosidase (Para-Nitro-Phényl- β D- Galactopyranosidase)	Incolore	jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
<u>MNE</u>	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acétyl Glucosamine)	transparence	trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1.4	assimilation (Maltose)	transparence	trouble
<u>GNT</u>	Potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GlucoNate)	transparence	trouble
<u>CAP</u>	Acide caprique	0.78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	Acide adipique	1.12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
<u>MLT</u>	Acide malique	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
<u>CIT</u>	Trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
<u>PAC</u>	Acide phénylacétique	0.8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble

Résumé

Dix souches bactériennes endosymbiotes de *Genista numidica* ont été étudiées d'un point de vue phénotypique à savoir, caractères cellulaires, culturels et tests biochimiques, ainsi que la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Quatre (04) souches de références ont été prises en considération à titre de comparaison, ce sont *Bradyrhizobium japonicum* USDA6, *Bradyrhizobium canariense* BTA-1, *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11 et *Bradyrhizobium elkanii* USDA76.

La caractérisation cellulaire, culturelle et biochimique répond aux critères fondamentaux des Bactéries Nodulantes des légumineuses (BNL). L'évaluation de la résistance des isolats aux antibiotiques montre une résistance vis-à-vis de l'oxacilline (92.85%) et l'érythromycine (85.7%). Quant à la résistance des souches aux métaux lourds l'évaluation montre différents niveaux de résistance chez les souches étudiées vis-à-vis du cuivre (64.28%), du zinc (50%), du plomb (28.57%) et du cadmium (0%).

Les souches S3, S4 et S5 représentent le profil le plus important de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds étudiées. Ces dernières pourraient jouer un rôle dans la bioremédiation et le maintien de la fertilité des sols.

Mots clés : *Genista numidica*, caractérisation, rhizobia, bioremédiation, antibiotiques, métaux lourds.

Abstract

Ten bacterial strains endosymbiotes of *Genista numidica* were studied for phenotypical cellular characters, cultural and tests biochemical, as well as resistance to antibiotics and heavy metals. Four (04) bacterial strains of references were used as comparison, they are *Bradyrhizobium japonicum* USDA6, *Bradyrhizobium canariense* BTA-1, *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11 and *Bradyrhizobium elkanii* USDA76.

The cellular, cultural and biochemical characterization revealed a fundamental criteria of the nodulant bacteria. The evaluation of the resistance of the isolates to antibiotics shows a resistance for oxacilline (92.85%) and érythromycine (85.7%). As for the resistance of the bacterial strains to heavy metals the evaluation shows various levels of resistance at the bacterial strains studied with respect to copper (64.28%), of zinc (50%), lead (28.57%) and cadmium (0%).

The bacterial strains S3, S4 and S5 represent the most important profile of resistance to antibiotics and heavy metals. These last could play a role in the bioremediation and the maintenance of the fertility of the soils.

Key words: *Genista numidica*, characterization, rhizobia, bioremediation, antibiotics, heavy metals.