



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de sciences biologiques de l'Environnement

Option : Toxicologie Industrielle et Environnementale

Réf.....

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

Thème

**Etude de la croissance des rhizobia isolées des zones arides
sous l'effet de différents pH et teneurs en NaCl**

Présenté par :

MOUHOUS Fatima & ALIOUAT Sabiha

Soutenue le : 23 Juin 2018

Devant le jury composé de :

M RAMDANI Nacer

MAA Président

Mme BOULILA Farida

MCA Encadreur

M HAMLAT Mourad

MAA Examineur

Mme AHNIA Hadjira

Invité.

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

A la fin de ce travail réalisé au laboratoire écologie microbienne de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, j'aimerais réserver ses lignes en signe de gratitude et de reconnaissance pour tous ceux qui ont apporté une contribution scientifique, logistique ou morale à ce modeste travail.

Nous tenons d'abord à remercier sincèrement notre promotrice M^{me} Boulila Farida, professeur à l'Université de Bejaia, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de nous encadrer et pour sa patience et disponibilité.

Nos remerciements s'adressent également à notre Co-promotrice M^{me} Ahnia Hadjira pour son soutien, ses conseils et ses orientations ainsi que pour ses encouragements et son suivi durant notre travail

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, notre grand respect aux membres de jury :

Notre président du jury M Ramdani Nacer d'avoir accepté de juger notre travail.

M Hamlat Mourad d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci s'adresse aussi à Monsieur Belhadi Djellali et Bourebaba Yasmina pour leurs aides qu'ils nous apportés.

Nous n'oublions pas de remercier tout nos enseignants qui ont contribué à notre formation durant tous nos études à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Sabiha & Fatima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à Mes très chers parents, Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, merci pour votre confiance, votre amour et votre encouragement, votre soutien inconditionnel dans les moments importants de ma vie qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs, que dieu vous protège.

A mon cher oncle et sa femme pour leurs appuis et leurs encouragements

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes cousins, cousines, tantes et oncles.

A tous mes copines et mes amies pour les bons moments qu'on a passés.

A Ma binôme et sa famille.

A tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce travail.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fait de votre soutien infailible, Merci d'être toujours là pour moi.

Fatima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux, qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes aimables sœurs pour leurs encouragements et soutien moral.

A mon très cher frère chez le quelle j'avais trouvé aide.

A karim pour sa confiance et tous ces efforts pour moi je remercie dieu de l'avoir protégé pour être témoin de ma réussite.,

A tous mes amis qui ont été toujours présent par leurs conseils et aides en particulier Zina pour tout l'amitié et la confiance qu'elle m'a accordée

A mon binôme et sa famille.

A tout personnes qui portent les noms ALIOUAT & YANAT.

Sabiha.

SOMMAIRE

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I-1. Fixation biologique d'azote	02
I-2. Symbiose rhizobium légumineuse	03
I-2-1. Légumineuse	03
I-2-2. rhizobia	03
I-3. Processus de nodulation	04
I-3-1. Pré infection	05
I-3-2. Infection	05
I-3-3. Organogénèse	06
I-4. Facteurs influençant la fixation d'azote	06
I-4-1. pH du sol	06
I-4-2. Stress salin	06
I-4-3. Stress hydrique	06
I-4-4. Stress thermique	07
I-4-5. Métaux lourds	07
Chapitre II : Matériels et Méthodes	
I. Matériel biologique	08
II. Méthodes	08
II.1. Caractérisation culturelle des souches	08
II.2. Morphologie des bactéries	09
II.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes	10
II-3.1. Test API 20 NE	10
II-3.2. Test de Nitrate NO ₃	10
II-3.3. Test de Tryptophane TRP	11
II.4. Caractérisation physiologique	11
II.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne	11
II.4.2. Effet du Na Cl sur la croissance bactérienne	11
II.5. Analyse numérique	12
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1. Caractérisation culturelle	13
III.2. Caractérisation cellulaire	13
III-3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes	14
III.3.1. Résultat des tests conventionnels	16
III.3.2. Résultat des tests d'assimilation	16
III.4. Caractérisation physiologique	17
III.4.1. Effet du pH	17
III.4.2. Effet du Na Cl	18
III.5. Analyse numérique des données	20
Conclusion et perspectives	22

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Caractérisation morphologique des colonies.	13
II	Résultats de la caractérisation biochimique	15
III	Composition de la galerie API 20 NE.	Annexe III
VI	La moyenne des DO obtenue aux différents pH.	Annex VI
V	La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl.	Annexe VI
IV	Matrice des caractères phénotypiques.	Annexe VI

Liste des Figures

Numéro	Titre	Page
1	Le cycle de l'azote.	02
2	Processus de nodulation Rhizobium-légumineuses.	05
3	Méthode d'examen à l'état frais des souches étudiées.	08
4	Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'Etat frais.	14
5	Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif.	14
6	Effet du pH sur les souches étudiées.	18
7	Effet du NaCl sur les souches étudiées.	19
8	Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données.	21

Liste des photos

Numéro	Titre	Page
02	Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA.	13
03	Caractérisation biochimique sur galeries API 20 NE exemple de la souche S9 .	16

Liste des Abréviations

CPS : Polysaccharides capsulaires

LPS : Lipopolysaccharides

EPS : Exo polysaccharides

DO : Densité optique

NO₃: Nitrate

TRP: Tryptophane

GLU: Glucose

ADH : Arginine

URE : Urée

ESC : Esculine citrate de fer

GEL: Gelatin

ARA: Arabinose

MNE: Mannose

MAN: Mannitol

NAG: N-acétyl-glucosamine

MAL : Maltose

GNT : Potassium

CAP : Acide caprique

ADI : Acide adipique

MLT : Acide malique

CIT : Trisodium Citrate

PAC : Acide phénylacétique

INTRODUCTION

Introduction

L'azote est un constituant essentiel des acides aminés et des protéines et par conséquent un élément minéral nécessaire pour tout organisme vivant. Dans la nature, l'azote est très abondamment présent sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante. Il constitue le principale facteur limitant la croissance de la plante qui ne peut l'utiliser que sous forme combinée (nitrate, ammoniacque, ou urée), et par conséquent un facteur limitant majeur de la production agricole (Robert et *al.*, 2005).

La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'Homme, qu'elle soit alimentaire, industrielles ou médicinales. Cet intérêt réside dans leur relation symbiotique avec les bactéries du sol appelé rhizobia (Chen et *al.*, 1995).

Les bactéries telle que rhizobium, sont d'une importance considérable en agriculture et en forestières à cause de leur capacité d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols (Ndoy, 1999).

L'association symbiotique entre rhizobia et légumineuses à bénéfices réciproque fournit pour la bactérie, les ressources carbonées nécessaires à sa croissance, et pour la plante, la fixation d'azote atmosphérique essentielle à son développement (Pellerin, et *al.*, 2014).

En Algérie des rhizobia nodulant plusieurs légumineuses de la *tribu des Genisteeae* de différentes régions du pays ont fait l'objet de nombreuses études (Boulila et *al.* 2009 ; Ahnia 2014 ; Bourebaba et *al.*, 2016).

Cette étude a pour but d'étudier la croissance des rhizobia isolés des zones arides sous l'effet de différents pH et de différentes teneurs en NaCl et étudiée la caractérisation morphologique , biochimique , cellulaire .

Ce document est constitué de trois chapitres : une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les partenaires (rhizobia et légumineuses) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuses), chapitre matériel et méthodes. Le dernier chapitre comporte les résultats obtenus et leurs discussions.

Chapitre I : **synthèse bibliographique**

I-1. Fixation biologique d'azote

L'azote est l'élément chimique le plus abondant dans l'atmosphère terrestre. Il se trouve sous sa forme moléculaire normale diatomique N_2 non assimilable par les plantes (Duc et *al.*, 2010).

Le cycle de l'azote (figure 1) est l'un des cycles biogéochimiques les plus complexes (Bockman et *al.*, 1990).

Un processus essentiel de l'entrée d'azote dans le cycle est la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Doré et *al.*, 2006). C'est une étape très importante qui fournit de l'azote utilisable pour la nutrition des plantes (Modigan et Martinko, 2007, Pedro, 2007). En effet La fixation biologique de l'azote est capable de restituer à la biosphère l'azote combiné perdu par le processus de dénitrification (Doré et *al.*, 2016).

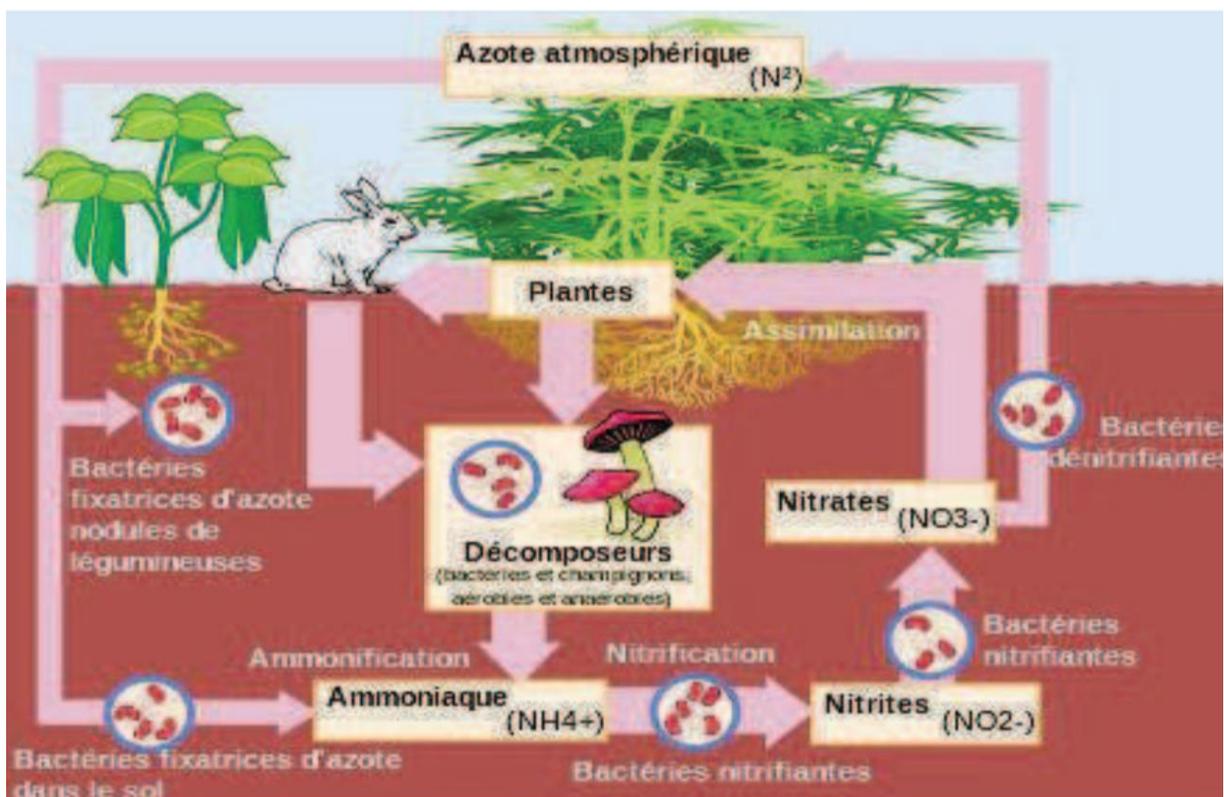


Figure 1 : cycle de l'azote. (<https://www.aquaportail.com/définition-3927-cycle-de-l-azote.html>).

I-2. Symbiose rhizobiums-légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat d'une interaction spécifique entre la plante et la bactérie du sol. Cette interaction commence par une communication entre ces deux partenaires grâce à des signaux moléculaires (Perret et *al.*, 2000). En effet, la bactérie induit chez la légumineuse la formation d'un organe spécialisé sur les racines ou des tiges appelé nodule à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bacteroides capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniac (Gibson et *al.*, 2008). Cette relation symbiotique continue à constituer le principal mécanisme biologique d'apport d'azote dans les écosystèmes de production agricole (Boddy et *al.*, 2000)

I-2-1. Légumineuse

Les légumineuses représentent la plus grande famille d'Angiosperme. Cette famille est divisée en trois sous-familles *Papilionoideae*, *Mimosoideae* et *Caesalpinioideae* (Andrews, 2016).

Taxonomie des légumineuses

Selon Quezel et Santa, (1962), la famille des légumineuses est classée comme suit :

Règne :	Eucaryote
Phylum :	<i>Planta</i>
Sous règne	Végétaux (phanérogame)
Embranchement :	Spermaphytes (plantes à graines)
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	<i>Rosida</i>
Ordre :	Fabales
Famille :	<i>Leguminosae</i>

I-2-2. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol, à Gram négatif, aérobies, non sporulantes, capables d'induire la formation des nodules chez les légumineuses. *In vitro*, les rhizobiums se présentent sous la forme de bâtonnets, mobiles (Duhoux et Nicole, 2004). Ces bactéries symbiotiques, échangent des signaux moléculaires avec la plante hôte, qui lui confère les sucres. En contrepartie et le partenaire bactérien lesquelles réduit l'azote atmosphérique en ammoniac (Yaw Boakye et *al.*, 2016).

Classification des rhizobia

Actuellement les rhizobia sont repartis en 13 genres et 481 espèces selon :

<https://www.rhizobia.co.nz/taxonom/rhizobia>

- *Rhizobium* qui contient 111 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 46 espèces
- *Ensifer* (formerly *Sinorhizobium*) contient 21 espèces.
- *Bradyrhizobium* contient 38 espèces.
- *Burkholderia* contient 120 espèces.
- *Azorhizobium* contient 3 espèces.
- *Microvirga* contient 16 espèces.
- *Phyllobacterium* contient 11 espèces.
- *Ochrobactrum* contient 18 espèces.
- *Methylobactérieum* contient 52 espèces.
- *Cupriavidus* contient 16 espèces.
- *Devosia* qui contient 22 espèces.
- *Shinella* qui contient 7 espèces.

I-3. Processus de nodulation

L'établissement de la symbiose (figure 2) entre les rhizobia et les légumineuses exige un contact moléculaire entre les deux partenaires (Baba Arbi, 2016). L'association symbiotique entre rhizobium et les légumineuses passe par plusieurs étapes : pré infection, infection, organogènes (Perry et al., 2004).

Le processus de nodulation est contrôlé par les gènes de la bactérie et de la plante légumineuse. Plusieurs phénomènes permettent l'expression des gènes : certains gènes sont activés qu'en présence de flavonoïdes synthétisée par la plante se processus passe par trois étapes (figure 2).

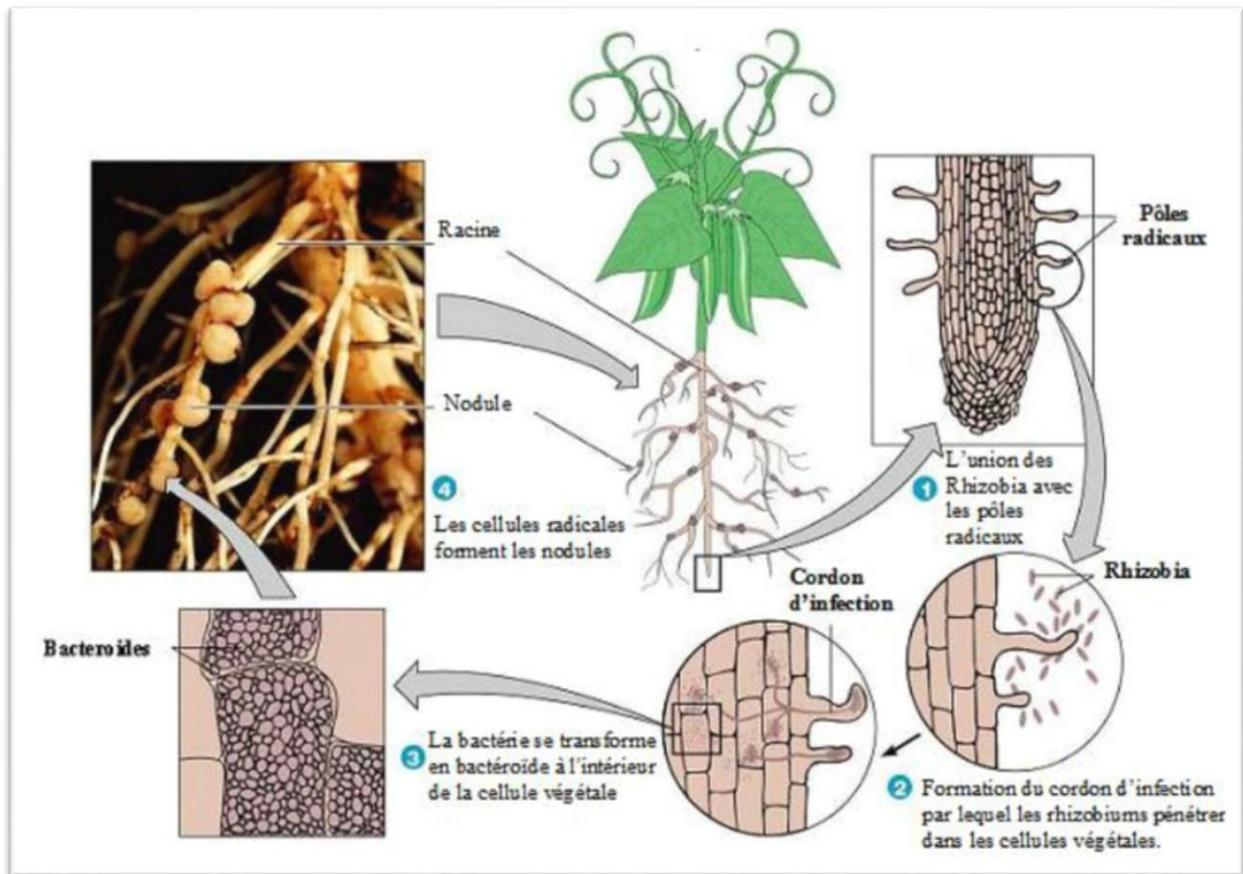


Figure 2 : Processus de nodulation rhizobium -légumineuses. (El-hilali, 2006).

I-3-1. Pré infection

L'interaction entre les légumineuses et le rhizobium commence dans la rhizosphère (Saoudi, 2008). En effet les rhizobiums sont attirés vers les poils racinaires par le phénomène de chimiotactisme par les flavonoïdes ou iso flavonoïdes (molécules signales). Ils produisent des facteurs nod, qui déclenchent le phénomène de nodogénèse. La reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante se fait à l'aide des facteurs de surface comme la protéine rchadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les exo polysaccharides (EPS) (Baba Arbi, 2016).

I-3-2. Infection

Cette étape se résume à la pénétration des rhizobiums en différents points du système racinaire. Suite à la pénétration dans les poils absorbant. Les bactéries sont entourées par un filament d'infection, donc il va y avoir la formation d'un méristème nodulaire dans lequel les rhizobiums entrent à travers le filament formé. Ce qui facilite la pénétration des rhizobiums aux couches les plus profondes (Baba arbi, 2016).

Deux types d'infection peuvent être distingués : soit elle commence entre les jonctions intercellulaires : Cas des nodules formés à la base des racines, soit elle démarre des

poils absorbants de la racine. Cas des légumineuses tempérées. Elle se passe en deux étapes : en premier lieu il va y avoir une initiation à l'infection et formation du cordon et en deuxième lieu la progression du cordon d'infection (Teillet, 2008).

I-3-3. Organogénèse

Chez les légumineuses deux types de nodules sont distingués selon la présence ou l'absence du méristème (Teillet, 2008). Les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologique et morphologique une fois qu'elles sont dans le symbiosome (Mergaert et *al.*, 2006)

La nitrogénase bactérienne est inhibée en présence de l'oxygène cependant , la le hémoglobine secrété autour des symbiosome , permet de protéger la nitrogénase vis-à-vis de l'effet toxique de l'O₂ . (Ott et *al.*, 2005).

I-4. Facteurs influençant la fixation d'azote

I-4-1. pH du sol

Les pH extrêmes influencent sur les deux partenaires (rhizobium et légumineuse). Cependant d'après Fitouri (2011), la majorité des légumineuses demande un pH neutre ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace.

La solubilité des éléments minéraux et les troubles dans la nutrition minérale est causés par l'acidité élevée du sol qui influence d'une part sur le développement de la plante hôte et d'autre part l'efficacité des rhizobiums qui provoque une diminution de la nodulation (Munns, 1977).

I-4-2. Stress salin

La salinité affecte le processus d'infection (Paye Kapay 2006), le développement et le fonctionnement des nodules (Rao et *al.*, 2002). En première lieu l'activité des nodules est plus sensible au stress salin que la nodulation (Payakapong et *al.*, 2006).

La réduction de l'activité de fixation d'azote consiste à :

- Une réduction de la respiration.
- Une déformation de la structure du nodule.
- Une réduction de l'activité photosynthétique.

I-4-3. Stress hydrique

Le stress hydrique est toujours présent lorsque la vitesse de transpiration de la plante dépasse celle de l'absorption en eau. Il se résume généralement par une réduction de la croissance, mais aussi des échanges gazeux et du métabolisme général de la plante (Tiliouine, 2008).

La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les légumineuses est très sensible au manque d'eau (Zahran,1999).

Le stress hydrique affecte la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux :
La formation et la croissance nodulaire ; le métabolisme du carbone et de l'azote ; l'activité de la nitrogénase et la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Aduirrealea et Sanchez-dgaz,1989 ; Sadowsky,2005).

I-4-4. Stress thermique

Des températures trop fortes au niveau de la rhizosphère affectent l'infection des racines par les bactéries et la fixation symbiotique de l'azote chez plusieurs légumineuses. Certains travaux ont montré que les températures élevées retardent la nodulation et réduisent l'activité de la nitrogénase et la fixation symbiotique (Zahran,1999).

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans le processus d'infection des poils racinaires. Elle peut également avoir un impact sur la survie des rhizobia dans le sol ainsi que sur la nodulation et la fixation d'azote (Graham et Yance2003).

I-4-5. Métaux lourds

De point de vue biologique, on distingue deux types de métaux lourds : les métaux essentiels et les métaux toxiques

Les métaux lourds influencent négativement sur les microorganismes en affectant leurs croissances, leurs morphologies et leurs activités (Gusmao-Lima *et al.*,2005). Ainsi, ils réduisent la taille des populations de rhizobiums et affecte irréversiblement leurs croissances et leurs performance symbiotiques (Koomen *et al.*,1990).

Le Cd (cadmium) par exemple est l'un des métaux qui présente une forte toxicité sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires (Pereira *et al.*,2006 ; Younis,2007). Il affecte la croissance et l'activité microbienne (Stan *et al.*,2011).

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

I-Matériel biologique

Dans ce travail, nous avons utilisé 9 souches de rhizobia isolées de nodules racinaires de légumineuses des zones arides d'Algérie. Ces souches appartiennent à la collection du Laboratoire d'écologie Microbienne de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia . *Bradyrhizobium cytisi* CWT11 été également utilisée à titre comparatif.

II- Méthodes

II-1. Caractérisation culturelle des souches

La forme, la couleur, la taille des souches étudiées sont déterminées sur milieu YMA (Annexe I). En effet à l'aide d'une anse de platine des souches de rhizobia étudiées sont ensemencés dans des boites Pétri contenant le milieu YMA. L'incubation se fait à 28°C pendant 6 jours.

II-2. Morphologie des bactéries

L'examen à l'état frais des souches permet de mettre en évidence leur forme ainsi que leur mobilité. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I), nous avons pris une suspension bactérienne et déposé sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10*40 (Figure3).

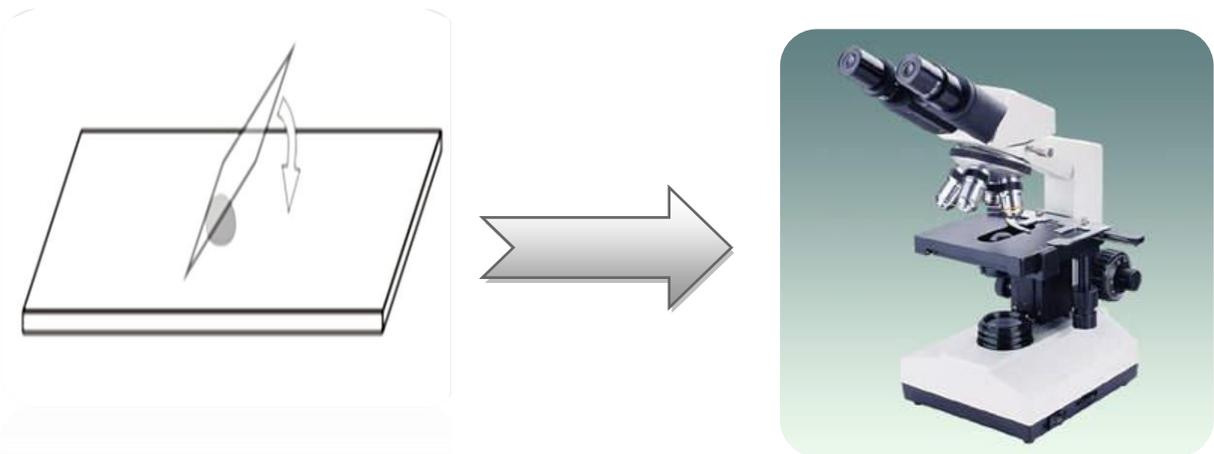


Figure 3 : méthodes d'examen à l'état frais des souches étudiées.

Coloration de Gram

Permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle est utile pour distinguer les bactéries dites Gram+ et des bactéries dite Gram – (Tortora et *al.*,2003).

Le test Gram a été effectué sur toutes les souches cultivées sur un milieu YMB et incubées à 28°C après l'apparition d'un trouble.

La technique consiste à :

- Préparer un frottis sur lame de verre ;
- Fixer un frottis à la chaleur ;
- Recouvrir la lame par un colorant basique (le violet de gentiane) et laisser agir pendant 1 minute ;
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes ;
- Rincer à l'alcool ;
- Laver soigneusement avec l'eau pour arrêter l'action de l'alcool ;
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1 minute ;
- Laver à l'eau distillée ;
- Egoutter la lame sur du papier absorbant ;
- Observer sous microscope optique (Grossissement 10*100) en ajoutant une goutte d'huile à immersion.

II-3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes par le test API 20 NE

La galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactérie et non fastidieux. Elle comporte 20 micro-tubes, 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation contenant des substances déshydratées. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau III (Annexe III).

Préparation et inoculation de la galerie

Après avoir préparé les cultures des dix souches sur un milieu YMB, nous avons appliqué le protocole comme suit :

D'abord la répartition de l'eau distillée dans les alvéoles pour reconstituer les milieux ;

Remplir les cupules de la galerie par une suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette en évitant les bulles d'air ;

Nous avons inoculé les cupules suivantes : GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou l'égerment convexe ;

Concernant les trois tests soulignées GLU, ADH, URE, un remplissage de l'huile de paraffine a été ajouté pour former un ménisque convexe.

Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Les galeries inoculées sont incubées à 28°C . La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe III).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests NO₃ et TRP :

II-3.1. Test de Nitrate NO₃

Ajoutée une goutte de chaque réactif Griess I (NIT1) et Griess II (NIT2) (Annexe II) dans la cupule . La lecture se fait après 5 minutes.

L'observation de la couleur rouge indique une réaction positive qui signifie la réduction de nitrate en nitrite. Le résultat incolore indique une réaction négative, ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu cela peut être dû à deux raisons : la bactérie n'a pas de nitrate réductase, ou elle a un nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote atmosphérique.

Pour distinguer ces deux cas, il suffit juste d'ajouter une pincée de poudre de zinc. Cette poudre très réductrice, réduit en quelques minutes les nitrates en nitrites et la coloration rouge apparait. Les bactéries sont donc (nitrate⁻). Si aucune coloration apparait, ceci veut dire qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc la bactérie est (nitrate⁺; réductrice de nitrites en azote).

II-3.2. Test de Tryptophane TRP

Ajouter une goutte de réactif de KOVACS (Annexe II), dans la cupule correspondante, la diffusion d'une couleur rose dans toute la cupule indiquant ainsi une réaction positive qui se traduit par la formation d'indole par la souche.

La fermentation de glucose se traduit par une couleur jaune, la même couleur est considérée positif concernant la présence de β galactosidase. L'orange, le rose ou le rouge est témoin d'une réaction positif dans le cas de l'arginine dihydrolase ainsi que l'uréase.

Concernant l'esculine qui est un hétéroside qui libère par hydrolyse, du glucose et de l'esculetine. Cette dernière produite lors de l'hydrolyse un précipité noir en présence du fer. Enfin le résultat positif dans le cas de la gélatine est révélé par la diffusion d'un pigment noir.

II-4. Caractérisation physiologique

Afin de caractériser les souches de rhizobia isolés des zones arides. Nous avons étudié l'effet du pH et du NaCl sur la croissance de ces souches.

II-4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Les souches étudiées sont mises en culture dans des tubes contenant 5 ml de milieu YMB ajusté à des différents pH (4,5,6,7,8,9,10).

La croissance bactérienne est évaluée par lecture de la densité optique (DO) à 630 nm, l'incubation sous agitation à 28°C pendant 6 jours.

II-4.2. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les souches bactériennes sont mises en culture dans des tubes contenant 5 ml du milieu YMB, additionné de quantités croissante de NaCl (100, 200, 400, 500 mM). La valeur de la croissance est obtenue par lecture de la densité optique (DO) à 630 nm, Après incubation sous agitation à 28°C pendant 6 jours.

II-5. Analyse numérique

Pour estimer le degré de liaison et de regroupement des souches entre elles , les résultats de tous les caractères phénotypiques ont été soumis à une analyse numérique . En outre dans cette analyse , nous avons réalisé une matrice Tableau IV (Annexe VI) dans laquelle les variables sont codées (1) pour les variables positives ou présentes et (0) pour les variables négatives ou absentes . Nous avons réalisé une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) , qui permet de calculer les distances de similarité par le logiciel XLSTAT (2018) .

Chapitre III :

Résultats et discussions

III-1. Caractérisation culturale

Le tableau I résume l'ensemble des résultats de la caractérisation culturale des souches étudiées .

Ces résultats montrent que toutes les souches bactériennes cultivées sur milieu YMA (photo 2) à 28°C forment des colonies de couleur blanche, de taille qui variée de 1 à 2 mm .

Certaines souches présentent des Exopolysaccharides comme les souches S2, S8, S9.

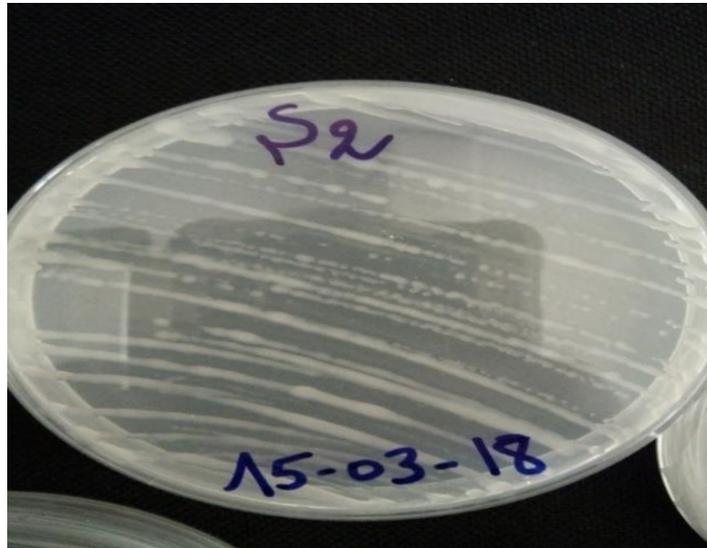


Photo2 : Aspect des colonies bactériennes étudiées sur milieu YMA

Tableau I : Caractérisation morphologique des colonies

Les souches	EPS	Couleur	Transparence
S1	Absence	Blanche	Translucide
S2	Présence	Blanche	Opaque
S3	Absence	Blanche	Translucide
S4	Absence	Blanche	Translucide
S5	Absence	Blanche	Translucide

S6	Absence	Blanche	Translucide
S7	Absence	Blanche	Translucide
S8	Présence	Blanche	Opaque
S9	Présence	Blanche	Opaque
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Absence	Blanche	Translucide

III-2. Caractères cellulaires

L'observation microscopique à l'état frais des suspensions bactériennes, montre des cellules qui ont une forme bâtonnets aux extrémités arrondies et mobiles (Figure 4). La coloration a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif (Figure 5). En effet ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly β -hydroxybutyrates confirmé par (Pedrosa, 1988). Ces critères correspondent à la description de rhizobia selon Jordan (1984).

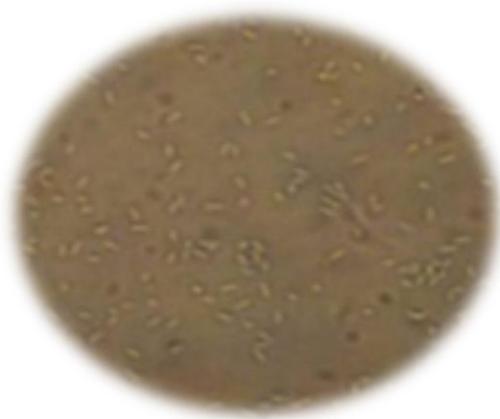


Figure4 : Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais (Grossissement 10*40).

Forme batônnets et mobiles



Figure5 : Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 10*100).

Coloration rose

III-3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Les résultats de 20 tests biochimiques réalisés sur neuf souches étudiées et une souche de référence *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11 sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Résultats de la caractérisation biochimique.

Tests souches	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PACS
S1	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
S2	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
S3	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
S4	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
S5	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S6	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
S7	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
S8	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
S9	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
B cytisi	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

- : Test négatif

+ : Test positif

III-3-1. Résultats des tests conventionnels

Après ensemencement et incubation des galeries API 20 NE à 28°C pendant 6 jours, deux réactifs de Griess nitrate I et nitrate II ont été ajoutés à la cupule de NO₃. Ces tests montrent que les neuf souches étudiées y compris *Bradyrhizobium Cytisi* CTAW11, possèdent la nitrate réductase et dépasse le stade nitrite.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées y compris la souche de référence ne produisent pas d'indole. Ce résultat confirme ceux obtenus par Boulila (2009).

Concernant le test de glucose, toutes les souches observées ne fermentent pas ce dernier ce qui confirme que les souches étudiées sont aérobies.

Le test de recherche d'enzyme Arginine dihydrolase est observé par toutes les souches y compris *Bradyrhizobium Cytisi* CTAW11.

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

La couleur noire du test Esculine est expliquée par l'hydrolyse de l'esculine par le β -glucosidase. Ceci a été observée pour toutes les souches sauf les souches S6, S7 et la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11.

Le test de la gélatine est négatif pour toutes les souches.

La couleur jaune observé par toutes les souches y compris la souche de référence indique que ces dernières possèdent la *B*-galactosidase, contrairement aux souches S1, S3, *Bradyrhizobium cytisi* qui donne un milieu incolore ce qui explique que tous les souches utilise la voie oxydative.

III-3-2. Résultats des tests d'assimilations

Six sucres ont été utilisé : D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acétyl-glucosamine et D-maltose. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches étudiées assimilent le D-mannitol , le glucose et l'arabinose . Concernant l'assimilation de N-acétyl-glucosamine, la majorité des souches l'assimile à l'exception des souches S1, S2, S7 et *Bradyrhizobium cytisi* CATW11.

Aucune assimilation d'acide caprique n'est observée par les souches à l'exception de la souche S1. L'absence d'assimilation d'acide adipique chez la majorité des souches y compris la souche de référence sauf les souches S7, S8, et S9. Toutes les souches n'assimilent pas l'acide phenylacétique.

Les tests biochimiques réalisés sur les souches de rhizobia isolées des régions arides montrent une diversité de réponse traduisant une variabilité importante de leur équipement enzymatique (Kedjar, 2001., Bensaid,2002).



Photo 3 : Caractérisation biochimique sur galeries API 20 NE (exemple de la souche S9).

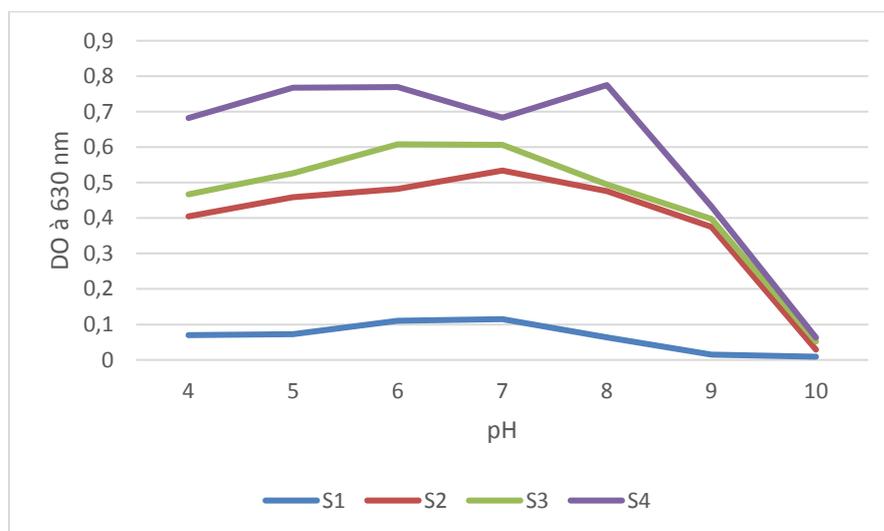
III-4. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet du NaCl et du pH sur la croissance des rhizobia isolés des zones arides. Les souches ont été incubées sur milieu YMB. Les valeurs données représentent la moyenne des trois répétitions pour chaque test.

III-4.1. Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées sont illustrés dans la figure 6. Ces résultats montrent que l'optimum de croissance de la plupart des souches testées se situe entre pH 6 et 8. Les souches 1,2 et la souche de référence *Brady rhizobium cytisi* présentent un optimum de croissance à pH 7.

En outre, toutes les souches étudiées ne présentent aucune croissance à pH 10. Ces résultats nous permettent de constater que les souches étudiées préfèrent un pH neutre ou légèrement acide.



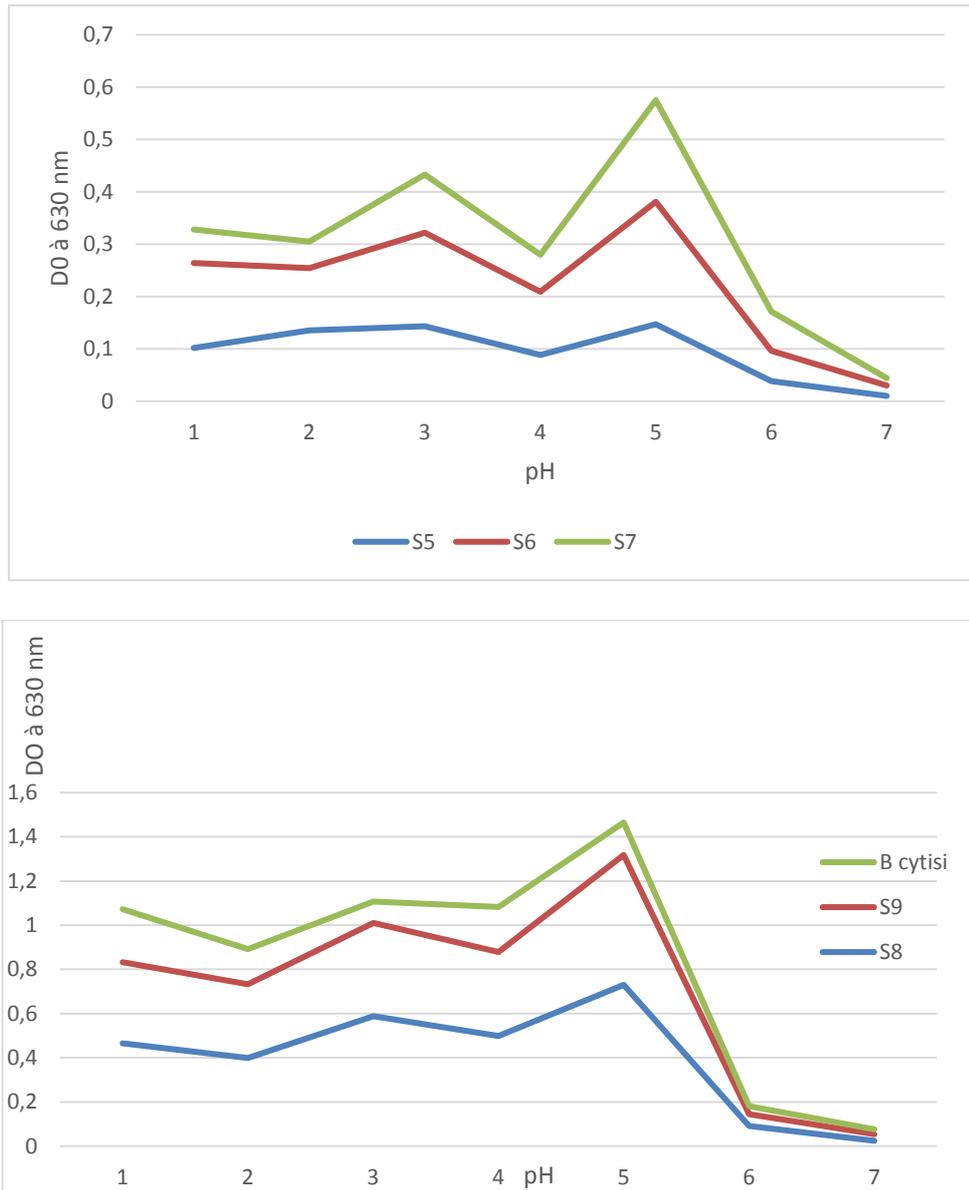


Figure 6 : Effet du pH sur les souches étudiées

Ces résultats sont en contradiction de ceux de El hilali (2006) qui a montré que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu' à 9. En outre les travaux d'Appunu et Dhar , (2006) ont montré que l'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie des rhizobia .

III-4.2. Effet du NaCl

Les résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia , comparés au B. cytisi , sont illustrés dans la figure 7

Ces résultats montrent une variabilité de réponse vis-à-vis du NaCl. En effet, les souches 1,2 et la souche *Bradyrhizobium cytisi* présentent un optimum de croissance à 100 mM de NaCl. Au-delà de cette concentration, la croissance des souches S1 et S2 diminue progressivement.

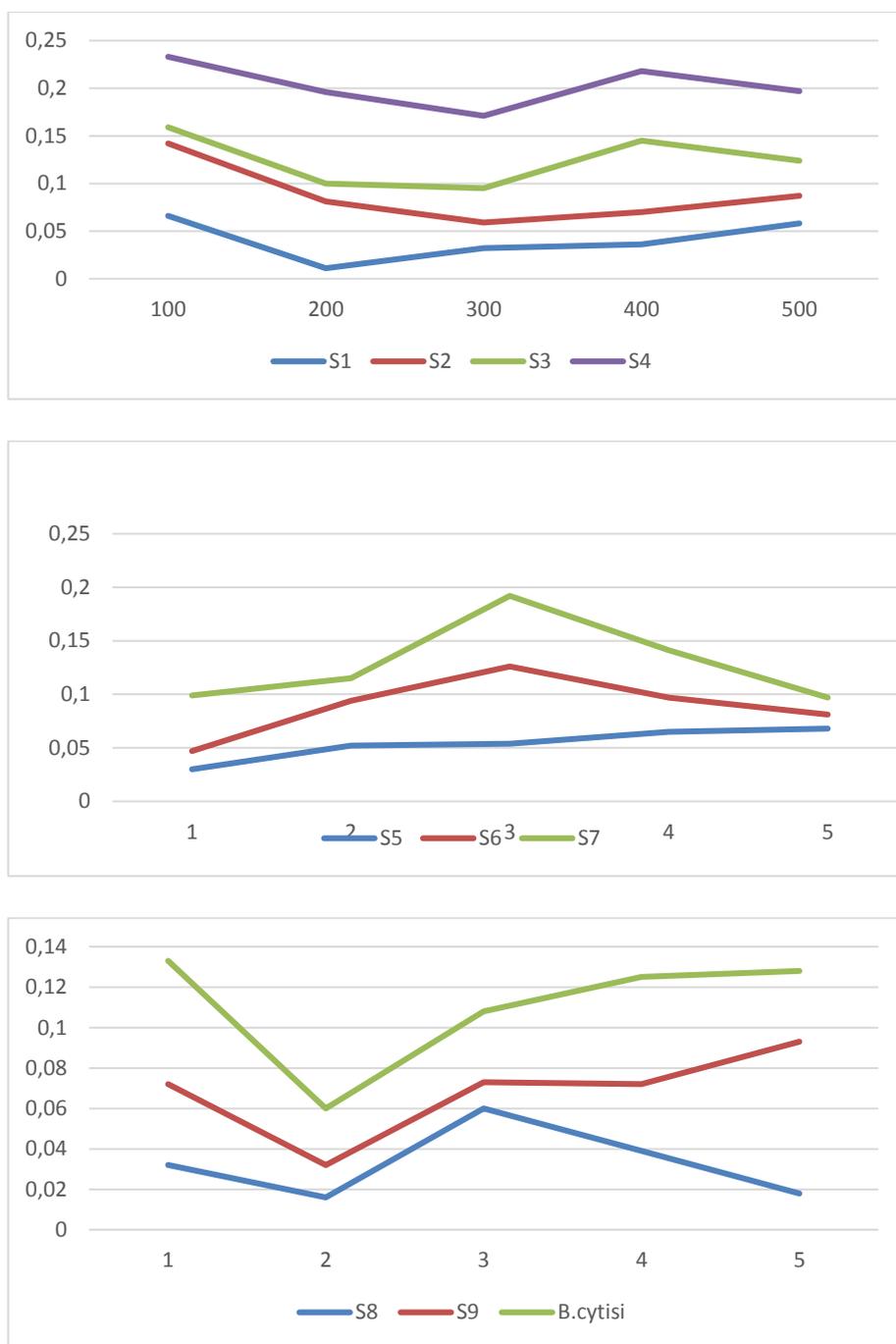


Figure 7 : Effet du NaCl sur les souches étudiées

Les souches 4,6 ,7 et 8 présentent un optimum de croissance à 300 mM de NaCl, au-delà de cette concentration les souches subissent une diminution de leur croissance. Concernant la souche S3 , l'optimum de sa croissance est à 400 mM .

La croissance de la souche S5 augmente avec l'augmentation de la teneur en NaCl.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les souches S3, S4, S5, S6, S7 et S8 supportant une salinité au-delà de 300 mM. Ce résultat est très intéressants . En effet, ces souches seraient de bons candidats pour le projet de restauration des sols dégradés et salines des régions arides.

Certains travaux ont montré que la tolérance à la salinité chez les rhizobiums varie d'une espèce à une autre (Mandal, 2014). Le stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exo polysaccharide des rhizobia qui sont utiles dans l'adaptation (Hung et al.,2005), d'autre rhizobia s'adaptent aux stress salins par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1999).

III-5. Analyse numérique des données

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes a été basée sur 38 caractères. Ces dernières ont été groupés et présentés dans le tableau IV (Annex VI). Le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (CAH) montre une diversité entre ces souches , ces souches sont réparties en deux principaux groupes A et B (figure 8).

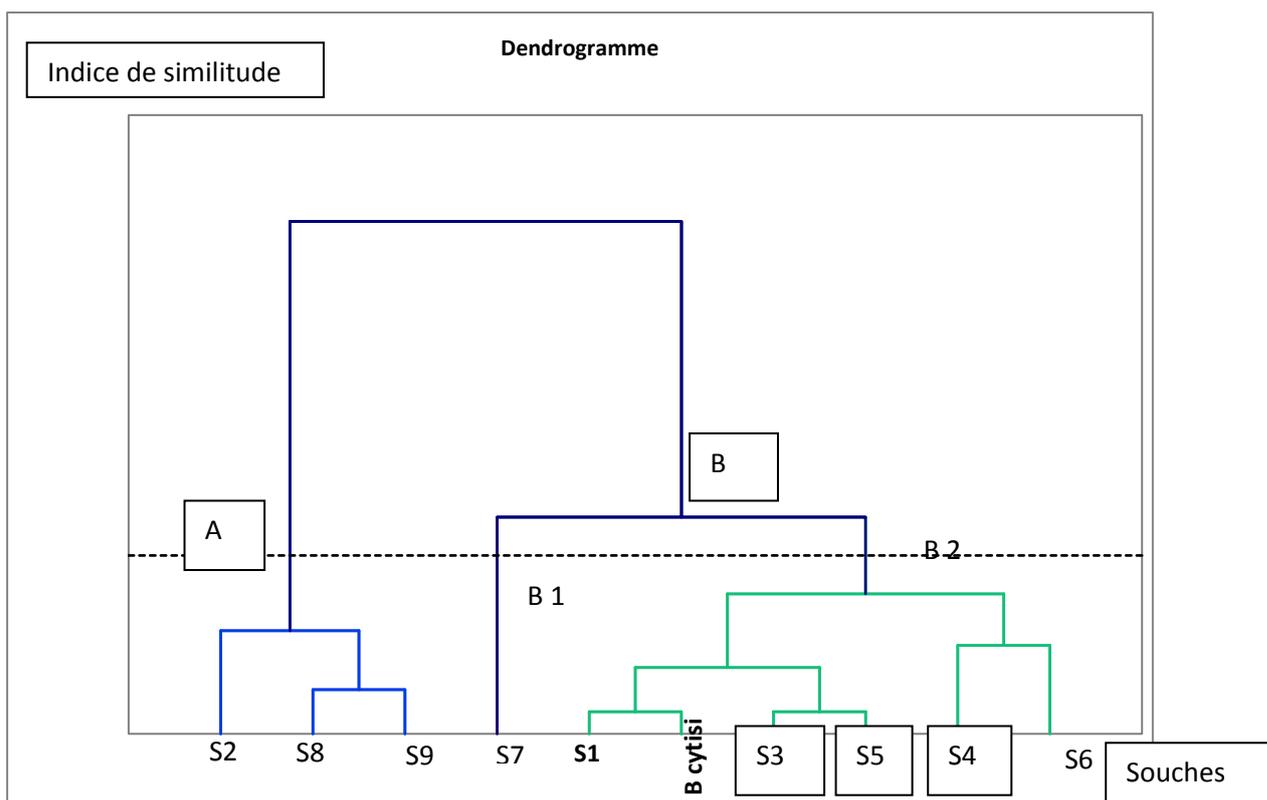


Figure 8 : Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données

Le groupe A est constitué des souches S2, S8, S9 qui partagent 14 caractères phénotypiques communs. En effet, elles se distinguent par leur capacité de réduire les nitrates et possèdent le ADH, URE, ESC, PNG, ARA et NAG.

Le groupe B est composé des souches S1, S3, S4, S5, S6, S7 incluant la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi*. Ce groupe est lui-même subdivisé en deux sous-groupe B1 et B2. Le sous-groupe B1 ne renferme qu'une seule souche c'est la S7.

Le sous-groupe B2 renferme les souches S1, S3, S4, S5, S6 et la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi*. La souche 1 très proche de la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi*.

Conclusion

Conclusion

L'étude phénotypique des souches basée sur les caractères morphologique, biochimiques et physiologiques, suivi par une analyse numérique a montré une diversité au sein de cette population.

La caractérisation culturale et cellulaire montre que toutes les souches sont des colonies blanches, opaques ou translucides. Ces souches sont de forme bâtonnée, mobiles, à Gram négatif. Ces critères correspondent à la description des rhizobia selon Jordan (1984).

La caractérisation biochimique montre une diversité parmi ces souches.

L'étude de l'effet du pH sur la croissance de ces souches montre que l'optimum de leur croissance se situe entre pH 6 et 8.

L'effet du NaCl sur la croissance de ces souches montre que certaines souches comme S3, S4, S5, S6, S7 et S8 pourraient être de bon candidat pour le projet de restauration des sols salins et ou dégradés des zones arides. En effet ces souches supportent une salinité de 300 mM voire même 400 mM pour S4.

L'analyse numérique des caractères phénotypiques permet de distinguer deux groupes. Le premier est constitué des souches S2, S8, S9, tandis que le deuxième renferme S1, S3, S4, S5, S6, S7 et *B. cytisi*.

En perspective, il est souhaitable :

- d'enrichir cette collection par d'autres souches provenant de différentes régions arides d'Algérie.
- d'élargir cette étude par d'autres paramètres.
- réaliser des tests sur la plante et sur champs.

Référence bibliographique

A

Ahnia H, Boulila F, Boulila A, Boucheffa K, Duran D, Bourebaba Y, Salmi A, Imperial J, Ruiz-Argueso T, Rey L, (2014) *Cytissus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* Strains, *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 1121-1129.

Aguirreolea J et Sanchez-dgaz., (1989). CO₂ Evolution by nodulated roots in *Medicago Sativa L.* under water stress. *Journal plant physiol.* 134:598-602

Appunu, C et Dhar, B. (2006). Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil Africa *Journal of Biotechnology.* 5(10).842-845

Andrews M., Andrews M. E (2016). Specificity in legume-rhizobia Symbiosis a realty agriculture and life science, 1. PP, 1-7.

B

Baba arbi S,(2016), Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotique des légumineuse spontanées *Medicago littoralis Rhode et Melilotus indicus (L)*. Présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (wilaya de Ouargla). Thèse de magister université Annaba, PP 26-27.

Berner E.F et Berner R.A, (1996). Global environment: water, air and geochemical cycles. Ed. Prentice. Hall. New Jersey. 286p.

Bensaid K. (2002). Caractérisation phénotypique des rhizobia isolées de *Medicago Polymorpha* de la région de Bejaia et étude de l'effet du NaCl sur leur symbiose. Mémoire de Magister en Biologie. Université d'Abderrahmane Mira-Bejaia Faculté des sciences de la nature et de la vie. PP :67

Bockman O.C., Kaarstad O., Lie O.H., Richard I., (1990). Agriculture et fertilisation : les engrais- leur avenir. Ed. Norsk Hydroa, Oslo, Norvège. 258p.

Boddy, R.M; Peoples, M. B, Palmer, B., Dart P J. (2000). The use of N natural abundance.

Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benellaoua S, Laguerre G (2009) *Retama* Species growing in different ecological-climatic areas of northeastern. Algeria have an arrow

range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. Syst Appl Microbiol 32: 245-255.

C

Chen, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., et Li, Y. (1995) Characteristics of *rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acide saline environment in X ingjiang . Poep'l's Republic of china Int. J. Syst.Bacterio., 45: 153-159.

D

Duhoux E.& Nicole M. (2004). Biologie végétale : association et interaction chez les plantes, Edition : Dunod. Paris. 166 p.

Duc G., Mignolet C., Carrouée B., Huyghe C. (2010). Importance économique passée et présentes de légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Ann. Agro.* **11.** 24p.

Doré T. LE Bail M., Martin P. Ney B., Roger .Estrade . J., (2006). L'agronomie aujourd'hui . Ed. Quae . Paris. 367p.

E

El-hilali. I,(2006), la symbiose *rhizobium-lupin* : Biodiversité des Micro symbiotes et mise en évidence d'une multi-infection Nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de doctorat université Mohammed Agdal Maroc, PP, 9.

F

Fitouri dhane S, Ben Jeddi F, Rezgui S, Mhandi R (2011) Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de *rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium L*) sous déficit hydrique. J. Appl Biosci :3642-3651

G

Gibson, K.E., Kobayashi, H.et Walker, G.C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Ann Rev of Genet. **42:** 413–441.

Graham P. et C. Vance (2003). Legumes: importance and contraintes to greater use. Plant
physiol.131,872-877.

Gusmao-Lima, A.I., Figueira, E., de Almeida, M.P., Pereira. S.I.A. (2005). Cadmium
tolerance plasticity in *rhizobium leguminosarum* I bv. *Viciae*: Glutathione as a detoxifying
agent. Can. J. Microbiol. 51,7-14.

J

Jordan D. C., (1984). Family III: rhizoiaceae. In :Kreig N.R. et Holt J.C (EdS): Bergeys
manual of systematic bacteriology . Williams et Wilkins. Baltimore. USA. PP, 234 – 244.

K

Kadjar.F.(2001). Caractérisation phénotypique analyse des protéines en SDS/PAGE de
souches de *rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaia. Thèse de magister Université de
Bejaia PP, 82.

Koomen, I, Mc grath, S.P., Giller, K.E. (1990). Mycoorhizol infection of clover is delayed
in soils contaminated with heavy metals from past Sewage Sludye application. Soil.Biolo.
&Biochem.22,871-873.

M

**Margaert p., Uchiumi T., AlunniB., EvannoG., CatriceO., Mausset AE., Barlog-hubler
F., GalibertF., Kondorosi A.,(2006).** Eukargotic control on bacterial cell cycle and
differentiation in the rhizobium-legume symbiosis. Proceeding of the National Academy of
scientificia of the united states of America .103:5230-5235.

Mandal HK, (2014). Isolation of salt tolerant strains of rhizobium trifoli. International.
Journal of Agriculture and Food technology 5(4):325-332.

Modigan M, Martinko et Pedro ,(2007). Biologie des Microorganismes.Ed poarsen paris
1047 p.

Munns D.N.,1977. Madigan M., Martink J. (2007). Brock Biologie des microorganismes.
Edition : Person Education France. PP, 599-601.cidity and related factors. Bose (Ed). PP, 211-
236.

N

Ndoye, I., (1999). Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *Acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France). PP,1

O

Ott T., Van Dongen J.T., Gunther.C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Zechouski T., Geigenberger P., Udvardi M.K., (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* .15:531-535.

P

Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., Borthakur D., (2006). Identification of two clusters of genes Involved in salt Tolerance in *Sino rhizobium* Sp. Strain BLB. *Symbiosis*. 41:47-51.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S.,(2004). *Microbiology*. ED. Dunod, paris .889 P.

Perret X., Stachelin C., Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity.*Microbiol.Molec.Biol.Rev.*64(1). PP,180-201.

Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M. (2006). Heavy metal toxicity in rhizobium leguminosarum *biovar viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy metal contamination: effet on protein expression. *Appl.Soil. Ecolo.*33,286-293.

Pellerin S., Bulter F., Guiard-Van L.G., (2014). Fertilisation et environnement. Quelles pistes pour l'aide à la décision. Ed. Quae et Acta. France. 194p.

Q

Quinto C., Sanche F. (2016). An Autography-Related kina essential for the symbiotique relationship between *Phaseolus Vulgaris* and both rhizobia and *arbuscular mycorrhizal* fungi the plant cell. **28**. 2326p.

Quezel P. Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. Centre National de Recherche Scientifique. Paris. 15-474

R

Rae D., Giller K. E., Yea A. R., Flowers T.J., (2002). The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). Ann.Bot.89 :563-570.

Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005). Ecologie. Ed. De Boeck. Paris. 214p

S

Sadousky M.J., (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE(Ed) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment springer. The Netherlands. PP, 89-112.

Saoudi. M, (2008), Les Bactéries nodulants les légumineuses (BNLP) caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuses *Astragalus armatus*, UNV Mentouri de Constantine, PP, 21-22.

Sanchez-Conizaresa C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sanchez-Jiméneza P., Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli B., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A. (2010). Caractérisation des bactéries isolées a partir des nodules des espèces de légumineuses du genre Hédysarum : *H. pallidum* des f., *H. spinosissimum* subs. *Capitatum*, *M. cornosum* des f.et *H. naudinianum* *cos.* Scien. Technol. C-N°32. PP, 43-44.

Stan, V., Gament, E., Cornea, C.P., Voaides, C., Dusa, M. (2011). Effete of heavy metal from polluted soils on the rhizobium diversity. Notul.Botan. Horti.Agrobot. Cluj-Napoca.39,88-95.

T

Teillet A, (2008), Caractérisation de deux déterminants moléculaire impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuses modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium mélioti*. Thèse de doctorat, univ de Toulouse, PP, 11.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., (2003). Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc. 945p.

Y

Yaw Boakeye E., Dotse Lawson I.Y., Akyea Danso S.K., Kwame offei S. (2016). Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*.**69**. 89p.

Younis, M., (2007). Response of lablab perpureus-rhizobium symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. *J. Agro.Sci.*3, 111-112.

Z

Zahran H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and Nitrogen Fixation under severe conditions and in an Arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63.(4),968-989.

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

Site web

[https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.](https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia)

[https://www.aquaportail.com/definition-3927-cycle-de-l-azote.html.](https://www.aquaportail.com/definition-3927-cycle-de-l-azote.html)

ANNEXES

Annexes**Annexe I : Composition des Milieux de Cultures.****Yaest – Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970).**

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH ajusté à 6,8	

Yaest – Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970).

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH ajusté à 6,8	

Annexe II : Composition des réactifs**Réactif de Griess I (Nitrate I)**

Acide parasulfanilique.....	8 g
Acide acétique 5N.....	11

Réactif de Griess II (Nitrate II) α -naphthylamine6 g

Acide acétique 5N.....11

Réactif de Kovacs

Alcool amylique.....5 g

Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....75 ml

HCl Pur.....25 ml

Annexe III :**Tableau III :** Composition de la galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSITION ACTIFS	QTE (Mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO₃	Potassium nitrate	0,136	Réduction des Nitrates en Nitrites	Incolore	Rose - Rouge
			Réduction des Nitrates en Azote	Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	Formation d'indole (TRyptophane)	Incolore Vert pale / jaun	Rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1,92	Fermentation (GLUcose)	Bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,92	Arginine DiHdrolase	Jaune	Jaune
<u>URE</u>	Urée	0,76	UREase	Jaune	Orange /rose/
ESC	Esculine	0,56	Hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Orange/rose/ rouge
	Citrate de fer	0,072			
GEL	Gélatine (Origine bovine)	0,6	Hydrolyse(protéase)(GELa tine)	Pas de diffusion	Gris/marron / noir
PNPG	4-nitrophényl- β D galacopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para- NitroPhényl- β D- Galactophyranosidase)	Incolore	Diffusion du pigment noir
<u>GLU</u>	D-glucose	1,56	Assimilation (GLUcose)	Transparence	Jaune

<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>MNE</u>	D-mannose	1,4	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl- glucosamine	1,28	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1,4	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>GNT</u>	Potassium gluconate	1,84	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>CAP</u>	Acide caprique	0,78	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>ADI</u>	Acide adipique	1,12	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>MLT</u>	Acide malique	1,56	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>CIT</u>	Trisodium citrate	2,28	Assimilation	Transparence	Trouble
<u>PAC</u>	Acide phénylacétique	0,8	Assimilation	Transparence	Trouble

Annexe VI :

La moyennes des différents tests effectués

Tableau VI : La moyenne des DO obtenue aux différents pH

Souches	4	5	6	7	8	9	10
S1	0,070	0,073	0,110	0,115	0,064	0,015	0,009
S2	0,335	0,386	0,372	0,419	0,412	0,360	0,020
S3	0,062	0,067	0,126	0,072	0,019	0,023	0,023
S4	0,215	0,242	0,161	0,077	0,282	0,035	0,011
S5	0,102	0,135	0,143	0,088	0,147	0,038	0,010
S6	0,162	0,119	0,179	0,121	0,234	0,058	0,020
S7	0,064	0,051	0,111	0,071	0,194	0,075	0,014
S8	0,465	0,399	0,588	0,449	0,730	0,091	0,027
S9	0,367	0,334	0,422	0,379	0,588	0,054	0,030
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	0,240	0,158	0,097	0,204	0,147	0,036	0,022

Forme	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mobilité	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gram n	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelle	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EPS	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

Résumé

9 souches bactériennes ont été isolées des légumineuses des zones arides ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers une étude morphologique, biochimique et physiologique suivie d'une analyse numérique. Les résultats montrent que toutes les souches sont mobiles, Gram -. Les tests biochimiques montrent une diversité de ces souches . Les 9 souches étudiées ainsi la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi* présentent un optimum de croissance entre pH 7 et 8 . Ces également montrent que les souches S3 , S4 , S5 , S6 , S7 et S8 supportent une salinité allant jusqu'à 300 mM . L'analyse numérique montre la présence de deux groupes ou le premier possède des souches S2, S8, S9 et le deuxième composé des souches S1, S3, S4, S5, S6, S7.

Mots-clés : Zones arides, caractérisation phénotypique, croissance, tolérance, *bradyrhizobium cytisi*.

Abstract

9 bacterial strains isolated from an arid zones legume were subjected a phenotypic characterization through a morphological, biochemical and physiological study followed by a numerical analysis. The results show that all strains are mobile, Gram -. Biochemical tests show a diversity of these strains . the strains studied thus the reference strain *Bradyrhizobium cytisi* present on optimum of growth between pH 7 and 8 , these also show that strains S3 , S4 , S5 , S6 , S7 and S8 supporting salinity up to 300 mM . Numerical analyses shoe the presence of two groups where the first one possesses strains S2, S8, S9 and the second consists of strains S1, S3, S4, S6, S7.

Key words: Arid zones, phenotypic characterization, growth, tolerance, *Bradyrhizobium cytisi*