

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de microbiologie  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Ecologie Microbienne



Réf :.....

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

**MASTER**

*Thème*

**Isolement et caractérisation des  
endosymbiotes de *Medicago polymorpha***

Présenté par :

**ZAIDI Farah et KARED Yasmine**

Soutenu le : **18 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mr. Adjebli A.	MCB	Président
Mr. Belhadi D.	MAA	Encadreur
Mme. Saidani K.	MAA	Examinatrice
Mlle. Boudehouche W.	Doctorante	Invité

**Année universitaire : 2016 / 2017**

## *Remerciements*

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

*Mr ADJEBLI, d'avoir accepté d'évaluer et de présider ce jury*

*Mme SAIDANI, qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Nos vifs remerciement s'adressent à Mr BELHADI Djellali  
et Mlle BOUDEHOUCHE Wafa, de nous avoir suivi et  
dirigé tout le long de ce travail.*

*On aimerait remercier également tous les membres du  
laboratoire d'écologie microbienne, plus précisément, Mme  
BOULILA directrice du laboratoire.*

*Tout comme on s'exprime les mêmes sentiments de gratitude à  
tous les enseignants qui nous ont comptés parmi leurs  
étudiants tout en long de ces années.*

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

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*À tous ceux qui même avec de bon souhait ont contribué à la réalisation de ce travail, à tous ceux qui on cru en moi et m'ont soutenu :*

*Mes chers parents qui ont d'un pas à pas marché ma vie pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affectation.*

*À ma petite famille, mon cher et unique fils Raouf et mon mari Amirouche*

*À mes adorables frères ainsi que leurs femmes Samir et Chahinez, Farid et Iness*

*À ma belle famille, à mes tentes est oncles cousines et cousin*

*À mes amis : Nadine, Syla, Sabrina. Faiza*

*À ma binôme Farah ainsi qu'à sa famille*

**YASMINE**

## *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie le Dieu tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents, que je ne cesse de remercier pour tout. Qui ont toujours cru en moi et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.*

*Vous l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi puisse dieu, le tout puissant, vous préserver et accorder santé, longue vie et bonheur.*

*Tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte, que ce travail leur apporte joie fierté et qu'il soit le fruit de leur l'éducation.*

*A mes deux chères sœurs : Amel et Nesrine, que dieu vous garde et vous ouvre les portes de la réussite et du bonheur.*

*A mes chers et adorables ami(e)s : Fawzi, Selma et Narimane.*

*A la mémoire de mon cher ami Badadou*

*A ma binôme Yasmine et sa famille*

***Farah***

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

## Synthèse Bibliographique

1- Fixation de l'azote.....	3
2- Les micro-organismes fixateurs d'azote.....	3
3- Les légumineuses.....	4
4- Importance des légumineuses.....	4
4-1- Economique.....	4
4-2- Ecologique et agronomique.....	5
5- Rhizobium.....	5
6- Symbiose légumineuses – Rhizobium.....	5
7- Intérêt de la symbiose Rizobiums-légumineuses .....	6
8- Facteurs limitants la symbiose Rhizobia-legumineuse. ....	6
9- <i>Medicago polymorpha</i> .....	7
9-1- Origine et distribution géographique de <i>Medicago polymorpha</i> .....	7
9-2- Morphologie de <i>Medicago polymorpha</i> .....	7
9-3- Intérêt de <i>Medicago polymorpha</i> .....	8

## Matériel et Méthodes

1- Echantillonnage.....	9
2- Stérilisation des nodules.....	10
3- Isolement des rhizobia à partir des nodules.....	10
4- Purification et conservation des souches bactériennes.....	10
5- Caractérisation phénotypique.....	11
5-1- Caractères cultureux et cellulaires.....	11

5-2- Caractères biochimiques.....	11
5-2-1- Test au bleu de bromothymol (BTB).....	11
5-2-2- Test d'oxydase.....	11
5-2-3- Production d'indole.....	11
5-2-4- Recherche de la catalase.....	12
5-2-5- Identification par la galerie API20NE.....	12
6- Caractères nutritionnels .....	12
6-1- Utilisation des substrats carbonés .....	12
7- Paramètres physiologiques .....	13
7-1- Sensibilité aux métaux lourds.....	13
7-2- Résistance aux antibiotiques.....	13
7-3- Tolérance au Na Cl.....	13
7-4- Détermination des paramètres de croissances .....	14
7-5- Tolérance au pH.....	14
7-6- Tolérance à la température.....	14
8- Test de nodulation.....	14
8-1- Préparation des plantes axéniques.....	15
8-3- Transfert des plantules et inoculation.....	15

## **Résultat et Discussion**

1- Isolement des souches.....	16
2- Caractères cultureux .....	16
3- Caractères cellulaires.....	17
4- Caractères biochimiques.....	17
4-1- Test au bleu de bromothymol (BTB).....	17
4-2- Test d'oxydase.....	18
4-3- Production d'indole.....	18
4-4- Recherche de la catalase .....	19
4-5- Galerie API 20 NE.....	19
5- Caractères nutritionnels.....	20

5-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone.....	20
6- Caractérisation physiologique.....	21
6-1- Métaux lourds.....	21
6-2- Résistances aux antibiotiques.....	23
6-3-Tolérance au NaCl.....	23
6-4- Croissance bactériennes .....	24
6-5- Tolérance au pH.....	26
6-6- Effet de la température sur la croissance .....	27
7-Test de nodulation.....	28
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>30</b>
Références bibliographiques	
Annexes	

## Liste des abréviations

<b>ADH</b>	L-arginine
<b>AK</b>	Amikacie
<b>API</b>	Système d'identification des bacilles Gram négatif
<b>CAZ</b>	Ceftazidime
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CX</b>	Cefuroxime
<b>DO</b>	Densité optique
<b>E</b>	Erythromycine
<b>ESC</b>	Esculine Citrate de fer
<b>FOX</b>	Cefoxitine
<b>GEL</b>	Gélatine (origine bovine)
<b>GEN</b>	Gentamicine
<b>GLU</b>	D-glucose
<b>K</b>	Kanamycine
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>N</b>	Néomycine
<b>NO3</b>	potassium nitrate
<b>OX</b>	Oxacilline
<b>PNPG</b>	4-nitrophényl- $\beta$ Dgalactopyranoside
<b>TE</b>	Tétracycline
<b>TRP</b>	L-tryptophane
<b>URE</b>	Urée
<b>YMA</b>	Yeast Mannitol Agar
<b>YMB</b>	Yeast Manitol Agar



## Liste de figures

<b>Figure 1 :</b> Photo <i>Medicago polymorpha</i> .....	9
<b>Figure 2 :</b> Nodules de <i>Medicago polymorpha</i> .....	9
<b>Figure 3 :</b> Nodules après stérilisation.....	10
<b>Figure 4 :</b> Galerie API 20 NE.....	12
<b>Figure 5 :</b> Dispositif de nodulation.....	15
<b>Figure 6 :</b> Exemple de résistance au BTB.....	17
<b>Figure 7 :</b> Résultats du test d'oxydase.....	18
<b>Figure 8 :</b> Mise en évidence de la production d'indole.....	19
<b>Figure 9 :</b> Tolérance aux métaux lourds .....	22
<b>Figure 10 :</b> Effet du NaCl sur la croissance des souches isolées de <i>Medicago polymorpha</i> .....	24
<b>Figure11 :</b> Courbes de croissance des souches isolées de <i>Medicago polymorpha</i> .....	25
<b>Figure 12 :</b> Effet du pH sur la croissance des souches isolées de <i>Medicago polymorpha</i> .....	26
<b>Figure 13 :</b> Effet de la température sur la croissance des souches isolées de <i>Medicago polymorpha</i> .....	27
<b>Figure 14 :</b> Racines de <i>Medicago polymorpha</i> nondulées par les souches MP13, MP16 et MP18.....	29

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Concentrations des métaux lourds.....	13
<b>Tableau II</b> : Résumé des caractères culturaux des isolats après observation.....	16
<b>Tableau III</b> : Résultats de la galerie API 20 NE.....	20
<b>Tableau IV</b> : Assimilation des sucres par les rhizobia isolés de <i>Medicago polymorpha</i> .....	21
<b>Tableau V</b> : Concentrations minimales inhibitrices des souches <i>vis à vis</i> des métaux lourds.....	22
<b>Tableau VI</b> : Résultats de l'antibiogramme des rhizobia isolés de <i>Medicago polymorpha</i> .....	23
<b>Tableau VII</b> : Résultats de la croissance bactérienne.....	26
<b>Tableau VIII</b> : Résultats du test de nodulation .....	28

## Introduction

Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme gazeuse  $N_2$  dans l'air dont il présente près de 3/4 de l'atmosphère ou sous la forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante. Les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire ( $N_2$ ) est une molécule très stable (Merigout, 2006).

Il existe des bactéries libres qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit seules, soit en symbiose avec d'autres bactéries. D'autres bactéries vivent en symbiose avec des plantes. La plupart des espèces économiquement importantes, telles que les *Rhizobium*, vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses (Moulin, 2002).

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique qui est capable de réduire l'azote moléculaire, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux (Moulin, 2002).

L'association symbiotique entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires (Hopkins, 2003).

La symbiose rhizobia-légumineuses représente donc une alternative à l'utilisation des engrais azotés minéraux. En effet les légumineuses par leurs aptitudes de s'associer aux BNL (Bactéries nodulant les légumineuses) et de fixer des quantités très importantes d'azote atteignant des proportions de 150 à 400 kg / ha / an et permet ainsi d'améliorer la fertilité des sols agricoles (Zhang, 2014).

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, par leurs intérêts agronomique, alimentaire et écologique, se trouvent actuellement au centre des préoccupations des instances internationales (Copeland and *al.*, 1991).

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, 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 (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les études dans le milieu méditerranéen ont été jusqu'à présent principalement focalisées sur les légumineuses cultivées et leurs symbiotes. Alors que l'avancée de recherche dans la connaissance des BNL associées aux légumineuses spontanées est lente (Morot Gaudry. 1997).

Dans le but de valoriser les ressources naturelles en Algérie, la connaissance des espèces à intérêt fourrager et pastoral représente une préoccupation essentielle. C'est le cas des espèces appartenant au genre *Medicago*, plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui sont capables de résister aux conditions de sécheresse.

Les espèces du genre *Medicago* possèdent un intérêt agronomique grâce à leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, permettant une production abondante en protéines végétales (Etienne et *al.*, 2001), et grâce à leur capacité d'enrichissement des sols en azote organique, ils sont souvent utilisés dans les systèmes de rotation avec les céréales (Yahia et Fyad-Lameche, 2003).

Afin d'étudier les caractéristiques des bactéries associées aux nodules des racines des espèces de légumineuses fourragères du genre *Medicago* (particulièrement *Medicago polymorpha*), les isolats sont caractérisés par une étude phénotypique.

## **Synthèse bibliographique**

### **1- Fixation de l'azote**

Les sols contiennent des réserves importantes en éléments azotés mais ces derniers ne sont pas en général directement assimilables par les plantes (Jensen and *al.*, 2002).

L'azote est un nutriment essentiel aux plantes. C'est le nutriment le plus souvent déficient, ce qui contribue à la réduction des rendements agricoles à travers le monde (Péret, 2007). Il est disponible pour certaines espèces de microorganismes par fixation biologique de l'azote (BNF) dans laquelle l'azote atmosphérique est converti en ammoniac par l'enzyme nitrogénase. Les microorganismes qui fixent l'azote sont appelés diazotrophes (Rees et Howard, 2000).

### **2- Les microorganismes fixateurs d'azote**

Les plantes ne peuvent pas utiliser l'azote dans notre atmosphère sans l'aide de ces bactéries fixatrices d'azote. Elles réduisent le nitrogène atmosphérique en ammoniac, qui peut être utilisé pour fabriquer d'autres composés biologiques. Elles n'utilisent pas l'ammoniac directement, mais c'est un produit des déchets (Morot Gandry, 1997).

De nombreux organismes appartenant aux archées, aux bactéries et aux cyanobactéries synthétisent la nitrogénase et ont la possibilité de fixer de l'azote, en association ou non avec des plantes. Lorsque les microorganismes ne sont pas associés avec des plantes mais vivent et agissent de manière « libre », ils tirent l'énergie nécessaire à la réaction de leur propre métabolisme hétérotrophe cas des bactéries des genres *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium* ou autotrophe cas des cyanobactéries (Chaintreuil, 2000).

Lorsque les microorganismes sont associés à des plantes pour réaliser la réaction, on parle de fixation symbiotique : dans ce cas, l'énergie est fournie par la plante hôte. Cette dernière option permet une grande entrée d'énergie, et donc une fixation d'azote très accélérée par rapport à celle des organismes non symbiotiques (Meeks, 1998).

### **3- Les légumineuses**

Les légumineuses sont des plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobiums, elles appartiennent toutes à la superfamille des *Fabaceae* (appelées aussi Légumineuses), à l'exception d'une seule non-légumineuse, le genre *Parasponia* de la famille des *Ulmacées* (Amrani, 2009).

Les légumineuses forment une famille importante et variée des Angiospermes, et constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes. C'est l'un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié (Faria, 1984) Cette famille englobe 700 genres et plus de 20000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les Poaceae, en termes de diversité (Polhill et al., 1981). Elle est subdivisée en trois sous-familles d'importance inégale : Les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoideae*.

Chez la grande majorité des légumineuses, les nodules fixateurs d'azote sont localisés dans le système racinaire (*Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogea*, *Medicago polymorpha*,...). Cependant, quelques espèces appartenant aux genres *Aeschynomene*, *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1991), *Discolobium* (Loureiro et al., 1994) ont la particularité de présenter des nodules sur les racines et tiges.

### **4- Importance des légumineuses**

#### **4-1- Economique**

En termes d'importance économique, la Leguminosae est la famille la plus importante des Dicotylédones (Harborne et al., 1981). En effet, de nombreuses espèces de Césalpiniacées et de Mimosacées constituent une importante ressource de fourrage et de bois à usage domestique ; elles sont aussi utilisées pour leurs fruits comestibles, leurs propriétés médicinales ou leurs production de gomme arabique (Somda et al., 2004). La sous famille des papilionacées comporte surtout des légumineuses fourragères (luzerne, trèfle) et des légumineuses cultivées pour leurs valeurs nutritionnelle (arachide, soja, pois, fève, haricot...)

En plus de ces légumineuses cultivées pour la consommation humaine, beaucoup donnent d'importants fourrages, engrais verts et fourrages, et engrais verts, c'est le cas de *Lupinus* (Lupin), *Medicago* (luzerne) et *Trifolium* (Trèfle) (Selami, 2014).

## **4-2- Ecologique et agronomique**

Il se manifeste sur la conservation du sol et de fertilité, sur la durabilité des systèmes fourragers qui la comprennent et sur la limitation des intrants chimiques et de labour en conséquence de sa pérennité.

Utilisées aussi en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique (Badri et *al.*, 2008).

Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Lafond, et pageau, 2009).

## **5- Rhizobium**

Phylogénétiquement, les rhizobia appartiennent à la famille des Rhizobiaceae, sous classe Alpha-protéobactéries (Stackebrandt et *al.*, 1988). Ils comprennent 13 genres et 98 espèces.

Les rhizobiums sont capables d'entretenir une symbiose avec les plantes de la famille des légumineuses afin d'amorcer la fixation de l'azote atmosphérique et sa réduction en ammonium. A quelques exceptions près, les rhizobiums sont tous quasiment des symbiotes obligatoires, car sont incapables de fixer l'azote atmosphérique à l'état libre dans le sol (Somasegaran et Hoben, 1994).

## **6- Symbiose légumineuses -rhizobium**

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

Les plantes capables d'utiliser l'azote atmosphérique sont des *Fabaceae* qui s'associent à des bactéries classiquement et collectivement dénommées rhizobium ou des plantes à actinorhizes qui s'associent avec des bactéries appartenant au genre Frankia. La nutrition azotée des légumineuses et des plantes à actinorhizes est donc assurée par deux

voies : la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et l'absorption de l'azote minéral du sol (El-hilal, 2006).

Le mutualisme entre les Fabacées et les rhizobiums ou les plantes à actinorhizes et les Frankia, aboutit à la formation d'un organe particulier sur les racines ou les tiges, appelée nodosité. Ces nodosités représentent de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur de cet organe, les microsymbiotes transforment l'azote atmosphérique en ammonium, sous une forme biologique qu'elles échangent avec la plante contre des photosynthétats (substrats carbonés) (Benabdoun et *al.*, 2012).

## **7- Intérêt de la symbiose rhizobiums légumineuses**

Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote. A titre d'exemple, le pois d'Angole (*Cajanus cajan*) qui est cultivé sous les tropiques incluant les régions semi-arides peut satisfaire jusqu'à 96% de ses besoins azotés par le biais de celle-ci (Wai et *al.*, 1995). De ce fait, cette symbiose est indubitablement le facteur majeur à l'origine du grand succès de la famille des Légumineuses parmi les végétaux (Noel et *al.*, 2013).

A l'opposé, la plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse. Elle lui offre également un microenvironnement très particulier et nécessaire à la fixation de l'azote. Par ailleurs, outre l'augmentation au niveau du sol de la population des rhizobia spécifiques à la légumineuse hôte après culture, la symbiose fournirait un cadre de reproduction bénéfique qui favoriserait l'évolution des espèces bactériennes (Noel et *al.*, 2013).

## **8- Facteurs limitant la symbiose rhizobia-légumineuses**

Le succès de cette symbiose est limité par l'aptitude des deux partenaires à surmonter l'effet de divers stress imposés par l'environnement (sécheresse, températures basses ou élevées, pH défavorables, salinité ...) ou conséquences de certaines pratiques agricoles inadéquates (fertilisation chimique, application des pesticides...). Toutefois, les légumineuses sont en général plus sensibles aux stress que leurs partenaires microbiens. De ce fait, la symbiose est largement tributaire de l'état physiologique de la plante hôte, facteur déterminant de la réceptivité et de l'hébergement des rhizobia (Zahran, 1999).



## **9- *Medicago polymorpha***

*Medicago polymorpha* est une plante fourragère nutritive, hautement savoureuse en azote pour les sols légèrement neutres et alcalins dans les régions climatiques méditerranéennes (Del Pozo, 2002). Elle est considérée comme la légumineuse la plus précieuse pour l'amélioration des pâturages (Graziano, 2010) et la stimulation de la matière organique du sol dans les sols bien drainés (wang et *al.*, 2010). Elle est à croissance rapide et dense, capable de fixer l'azote et d'augmenter l'approvisionnement disponible en azote du sol, le rendant très utile en tant que fumier vert (Denton et *al.*, 2007). Sa diffusion mondiale est attribuée à sa faible sensibilité à la photopériode et à la vernalisation (Clarkson et Russel 1975; Aitken 1985). Elle est notamment très répandue dans les zones tempérées chaudes subtropicales et en altitude (Mauries, 2003).

### **9-1- Origine et distribution géographique de *Medicago polymorpha***

*Medicago polymorpha* fut introduite en Europe vers 470 av.J.C avant les guères médiques. Elle portait alors le nom de *Medica herbà* « l'herbe de Médie », devenu plus tard le nom de genre : *Medicago* qui est une légumineuse annuelle à semences durables et autonome originaire du bassin méditerranéen, où elle est largement distribuée comme sauvage dans la plus grande partie du monde (crawfourd et *al.*, 1989).

Comme d'autres *Medicago* annuels, *Medicago polymorpha* est bien adaptée dans les sols alcalins, elles sont aussi capables d'être cultivées sur des sols modérément acides en raison de sa tolérance aux conditions acides pendant la phase de nodulation (Howieson et Ewing, 1989 ; Ewing et Robson, 1990). Sa résistance au froid est bien documenté (Cocks et Ehrman, 1987 ; Loi et *al.*, 1993).

### **9-2- Morphologie**

*Medicago polymorpha* étant membre de la famille Leguminosae, à petites fleurs (3-6 mm de long) de couleur jaune vif, se regroupent en têtes de fleurs de 2 à 10 fleurs aux extrémités de la tige.

Le fruit est une gousse qui serpente 2 à 6 fois et a des rangées d'épines sur le bord extérieur, d'une longueur d'environ 6-7 mm. Ils commencent vert et relativement doux, mais deviennent rapidement marron et dur. À l'intérieur de la casse se trouvent plusieurs graines, habituellement jaune ou bronzé et en forme de rein. Ses tiges sont faibles et atteignent une

longueur de 60 à 75 cm. Dans les peuplements épais, les tiges peuvent devenir dressées, atteignant une hauteur de 60 cm. Le système racinaire possède une racine de prise qui est difficile à retirer lorsqu'il est établi (Heuzé and *al.*, 2016).

### **9-3- Intérêt de *Medicago polymorpha***

Elle est très utile pour la restauration des sols, le fumier vert et la couverture hivernale pour le contrôle de l'érosion, en particulier dans les zones de sécheresse. Ses caractéristiques de croissance rapide et dense capable de fixer l'azote et d'augmenter l'approvisionnement disponible en azote du sol, la rendent très utile en tant que fumier vert (Denton et *al.*, 2007).

*Medicago polymorpha* est largement utilisée dans les systèmes d'élevage de légumes. Ce système intègre la production végétale et animale dans les régions semi-arides et terrestres. Elle est basée sur la rotation des cultures céréalières avec la réanimation des légumineuses annuelles (Cocks, 1992 ; Graziano et *al.*, 2010).

Au cours de la période de jachère / pâturage, *Medicago polymorpha* est utilisée pour augmenter la quantité d'azote dans le sol, en raison de sa capacité à répartir l'azote atmosphérique dans ses nodules radiculaires, ce qui pourrait éliminer le besoin d'engrais azotés supplémentaires. Il perturbe également le cycle de vie des organismes nuisibles et protège les sols contre la dégradation, pousse rapidement au printemps et supprimera les mauvaises herbes au début de la saison de croissance. Les mauvaises herbes d'automne peuvent être contrôlées par leur ré-croissance après la récolte, qu'elles soient ovales ou intercalées avec le grain ou que le grain soit ensemencé dans un stand établi (Clark, 2007).

L'élimination des animaux de pâturage au milieu de la floraison a réduit la consommation de fleurs et a permis une plus grande survie des semences plus tard dans la saison de croissance (Duke, 1983, Tilman, 2000).

Dans les rotations à long terme des cultures, la persistance de ses graines se régénère généralement pendant la phase de pâturage des banques de semences dans le sol (Denton et *al.*, 2007).

Rochon et *al.* (1994) ont constaté que les paddocks à pâturage à rotation, ensemencés avec *Medicago polymorpha* ont montré une productivité accrue sous une forte intensité de pâturage. L'élevage doit être soigneusement géré, cependant, pendant la phase de floraison afin d'éviter l'épuisement de la banque de semences causée par l'apport de semences (Rochon et *al.*, 2004).



# **Matériel et méthodes**

## Matériel et Méthodes

### 1- Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué à partir d'un site «Saket» situé dans la région de Bejaia, durant le mois de février 2017. Des échantillons de nodules appartenant à *Medicago polymorpha* (Figure1) ont été récoltés sur plusieurs pieds.



**Figure 1** : Photo de *Medicago polymorpha*

La récolte des nodules est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985). Il s'agit de creuser environ 15cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau courante puis essuyées au papier absorbant. Les nodules sont excisés avec un fragment de racine pour éviter de les endommager (Figure 2).



**Figure 2** : Nodules de *Medicago polymorpha*

## **2- Stérilisation des nodules**

Les nodules préparés auparavant sont mis dans une boîte de Pétri contenant de l'eau physiologique pendant 30 minutes, puis transférés dans un bain d'éthanol à 70° pendant 30 secondes pour désinfecter la surface externe. Les nodules sont ensuite transférés dans un bain d'eau javel 5% pendant 3 min.

Après désinfection de la surface, les nodules sont transférés dans un tube contenant de l'eau distillée stérile puis rincer abondamment (5 bains) pour les débarrasser des résidus toxiques d'eau javel. Chaque nodule est ensuite transféré séparément dans un tube à eppendorf stérile (Figure 3).



**Figure 3** : Nodules après stérilisation

## **3- Isolement des rhizobia à partir des nodules**

A l'aide d'une tige métallique stérile et flambée au bec bunsen, les nodules sont écrasés jusqu'à obtention d'un broyat. Des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA (Annexe 1), sontensemencés à partir du broyat, puis incubés à 28°C pendant 24h à plusieurs jours.

## **4- Purification et conservation des souches bactériennes**

Les colonies ayant des caractéristiques culturelles différentes sont repiquées et purifiées par repiquage sur milieu YMA. Elles sont ensuite repiquées sur du YMA incliné et dans du glycérol à 60% puis conservées à 4°C et -80°C.

## **5- Caractérisation phénotypique**

### **5-1- Caractères cultureux et cellulaires**

Les caractères cultureux et cellulaires de chaque souche ont été déterminés à partir des colonies bien individualisées obtenues après incubation à 28 °C. Les colonies ont été étudiées à travers le contour, la couleur, l'aspect, la taille et opacité sur milieu YMA, YMA additionné de Rouge Congo.

### **5-2- Caractères biochimiques**

#### **5-2-1- Test au bleu de bromothymol (BTB)**

Afin de déterminer si les souches présentent un pouvoir alcalinisant ou acidifiant, elles ont été ensemencées sur un milieu YMA additionné de bleu de bromothymol. Après incubation à 28°C pendant 48h les boîtes sont examinées par rapport au changement de couleur de l'indicateur.

Les souches ayant provoqué un virage au jaune sont considérées acidifiantes tandis que, les souches ayant provoqué un virage au bleu sont considérées alcalinisantes.

#### **5-2-2- Test d'oxydase**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (-). Il permet de mettre en évidence l'enzyme phénylène diamine oxydase.

Dans des tubes à essai contenant les suspensions bactériennes, on ajoute un disque à oxydase dans chaque tube. L'apparition d'une couleur violette après 10 minutes indique la présence de cette enzyme.

#### **5-2-3- Production d'indole**

Des tubes à essai contenant le bouillon eau peptonnée exemple d'indole est ensemencé avec une suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique. Après incubation à 28°C pendant 48h quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu. L'apparition d'un anneau rouge à la surface indique la production d'indole.

### **5-2-4-Recherche de la catalase**

Sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée, est déposée. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien. L'apparition d'une effervescence indique la présence d'une catalase.

### **5-2-5- Identification par la galerie API 20 NE**

Les galeries Api utilisent plusieurs types de tests. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le microorganisme considéré va réagir. L'ensemencement est réalisé avec une suspension bactérienne calibrée, selon les recommandations prescrites sur la galerie.

Après incubation à 28°C pendant 24h à 48h, la lecture est réalisée conformément aux indications du fabricant (Biomerieux).



**Figure 4 :** Galerie API 20NE

## **6- Caractères nutritionnels**

### **6-1 Utilisation des substrats carbonés**

La mise en évidence de la capacité de différentes souches à utiliser différents substrats comme source de carbone a été réalisée sur milieu YMA modifié en remplaçant le mannitol par le substrat à tester et l'extrait de levure par le KNO<sub>3</sub>. Du rouge de phénol a été ajouté au milieu comme indicateur coloré.

Les sucres utilisés sont : Maltose, Manose, Sorbiose, Galactose, Fructose, Arabinose, Rhamnose, Tréhalose, Raffinose, Salicine, Cellobiose, Levulose et Glycérol

Après ensemencement du milieu par la méthode de touche les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48h, le virage du rouge au jaune indique l'utilisation du sucre correspondant.



## **7- Paramètres physiologiques**

### **7-1- Sensibilité aux métaux lourds**

La sensibilité des différentes souches aux Métaux lourds a été testée sur milieu YMA additionné de métaux lourds (Zn, Cd et Pb) à différentes concentrations (Tableau N°1). Les boîtes de Pétri contenant ce milieu sontensemencées pas la méthode des spots à raison de 10 µl de la suspension bactérienne. Elles sont ensuite incubées à 28°C pendant 48h. La présence d'une croissance sur le milieu indique la tolérance au métal et à la concentration correspondante.

**Tableau I :** Concentrations des métaux (µg/ml)

Zn	Cd	Pb
200	50	1000
400	100	1500
600	112.4	7072
800	150	2500

### **7-2- Résistance aux antibiotiques**

Après ensemencement des boîtes Pétri contenant un milieu YMA par la méthode d'écouvillonnage, des disques d'antibiotiques sont déposés à la surface. Les antibiotiques utilisés sont :

Cefoxitine, ceftazidime, Cefuroxime, Erythromycine, Gentamicine, Kanamycine, Meropenem, Néomycine, Oxacilline et Tétracycline

La résistance aux antibiotiques a été évaluée par mesure des diamètres des zones d'inhibition après incubation à 28°C pendant 48h.

### **7-3- Tolérance au NaCl**

L'étude concernant l'effet de la salinité sur la croissance des souches isolées des nodules racinaires de *Medicago polymorpha* a été réalisée sur le milieu YMB (Annexe 1) avec différentes concentrations en NaCl (1%, 2%, 3% et 4%).

Des tubes à essai contenant 5ml de bouillon YMB modifiée ont été inoculés avec 100 µl de la suspension bactérienne. Après incubation à 28°C pendant 8 jours, des mesures de DO à 600nm ont été réalisées.

#### **7-4- Détermination des paramètres de croissance**

C'est le temps correspondant au dédoublement de la biomasse, il est déterminé, pendant la phase exponentielle.

Des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture YMB, sontensemencés avec 1ml de chaque suspension bactérienne. Après incubation à 28°C, des mesures de la DO sont effectuées à des intervalles de temps réguliers.

#### **7-5- Tolérance au pH**

Dans le but de déterminer la tolérance des souches isolées à l'effet du pH, une étude a été réalisée sur milieu YMB à différents pH (4, 6, 8 et 10).

Des tubes à essai de 5ml de bouillon sont inoculés avec 100 µl de la suspension bactérienne. Après incubation à 28°C pendant 8 jours, la croissance des différentes souches a été évaluée par mesure de la DO à 600 nm.

#### **7-6- Tolérance à la température**

L'étude concernant l'effet de la température sur la croissance des différentes souches a été réalisée sur le milieu YMB. Des tubes à essai contenant 5ml de bouillon sontensemencés avec 100µl de la suspension bactérienne, les tubes sont incubés à différentes températures (28°C, 32°C, 36°C et 40°C) pendant 8 jours. L'effet de la température est évalué par mesure de la DO à 600 nm.

#### **8- Test de nodulation**

Le test de nodulation permet de vérifier la capacité et l'aptitude des isolats à former des nodules avec la plante-hôte dans des conditions bactériologiques contrôlées (Vincent, 1970 ; Beck et al ,1993). En raison de l'indisponibilité des graines de *M.polymorpha*, des graines de *Vigna unguiculata*, considérée comme espèce réceptrice à large spectre sont utilisées pour réaliser le teste de nodulation.

### **8-1- Préparation des plantes axéniques**

Des graines de *Vigna unguiculata* sont plongées dans de l'alcool à 70% pendant 1 minute puis transférées dans un bain d'eau de javel 5° pendant 3 à 5 minutes. Elles sont ensuite rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour les débarrasser des résidus toxiques de l'eau de javel. Les graines ainsi désinfectées sont mises à germer dans une boîte de Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile et à l'obscurité pendant 8 jours.

### **8-3- Transfert des plantules et inoculation**

Les graines ayant germé et non contaminées sont transférées dans des flacons contenant 250 ml du milieu Jensen (Figure 5). Les plantules ainsi transférées sont inoculées avec 100 µl de la suspension bactérienne. Enfin, pour l'obscurité nécessaire, la partie racinaire est couverte puis les flacons sont placés dans une chambre de culture à température ambiante et une luminosité contrôlée pendant un mois de culture.



**Figure 5** : Dispositif de nodulation

# **Résultats et discussions**

## Résultats et discussions

### 1-Isolement des souches

Après isolement et purification dix isolats bactériens sont obtenus à partir des nodules de *Medicago polymorpha*.

### 2- Caractères cultureux

L'observation des caractères cultureux montre une certaine diversité entre les isolats. En effet, certaines colonies apparaissent au bout de 48h, MP14 et MP16. Tandis que d'autres n'apparaissent qu'après 6 jours, MP3.1 et MP17 avec une taille de 1mm de diamètre. Les colonies sont transparentes ou opaques de couleur, beige, jaune ou blanche. Certaines présentent un contour régulier et d'autre irrégulier.

**Tableau II** : Résumé des caractères cultureux des isolats après observation à l'œil nu

Souches	Durée d'apparition des colonies (jours)	Taille (mm)	Couleur	Aspect	Opacité	Production d'EPS	Contour
<b>MP3.1</b>	6	1	Beige	Sèche	++	+	Régulier
<b>MP3.2</b>	3	Punctiforme	Beige	Sèche	++	+	Régulier
<b>MP13</b>	5	Punctiforme	Beige	Gélatineuse	+++	++	Irrégulier
<b>MP14</b>	2	1	Jaune	Sèche	++	+	Régulier
<b>MP15</b>	3	1	Blanche	Sèche	+++	+	Régulier
<b>MP16</b>	2	1	Jaune	Sèche	+++	+	Irrégulier
<b>MP17</b>	6	1	Blanche	Sèche	++	++	Régulier
<b>MP18</b>	5	2	Beige	Sèche	+++	+	Régulier
<b>MP19</b>	5	1	Transparente	Sèche	+	+	Régulier
<b>MP21</b>	3	2	Blanche	Sèche	++	+	Irrégulier

EPS : Exopolyssacharides

En se référant à la première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote proposée par Jordan (1982), les isolats pourraient appartenir aux deux genres (*Rhizobium* et *Bradyrhizobium*). Vue que le temps d'apparition de certaines colonies est inférieur ou égal à 5 jours, il s'agit donc de souches à croissance rapides. Pour d'autres souches le temps d'apparition est entre 5 et 7 jours, il s'agit donc de souches à croissance lente.

### 3- Caractères cellulaires

L'observation sous microscopique des colonies bactériennes après coloration de Gram montre que toutes les souches sont Gram (-), de forme bâtonnets aux extrémités arrondies (bacille ; coccobacille).

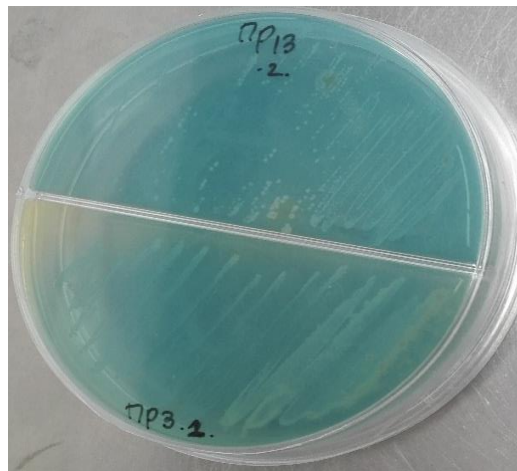
### 4- Caractères biochimiques

#### 4-1- Test au bleu de bromothymol (BTB)

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique. Une réaction acide se traduit par le changement de couleur du bleu vers le jaune, par contre la réaction basique se montre par le renforcement de la couleur bleu.

Dans notre cas les souches MP3.1 ; MP13 ; MP17 et MP18 alcalinisent le milieu YMA contrairement au reste des souches qui acidifient le milieu (Figure 6).

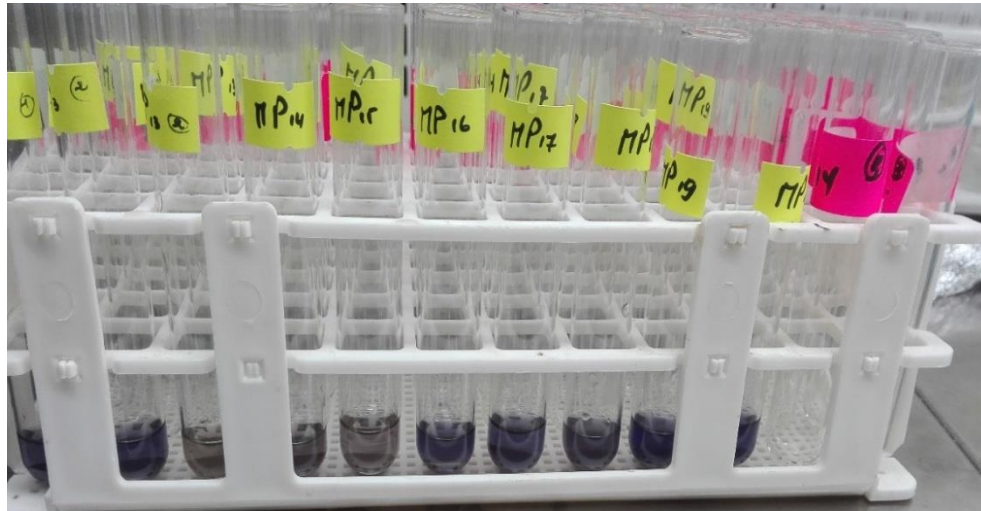
Cette alcalinisation du milieu suggère l'appartenance de ces souches au genre *Bradyrhizobium* à croissance lente. Toutefois des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira et *al.* (1993).



**Figure 6 :** Exemple de résistance au BTB

#### **4-2- Test d'oxydase**

Après ajout des disques à oxydases dans chacun des tubes à essai contenant la suspension bactérienne, on observe un virage de couleur vers le violet dans le cas des souches : MP3.1 ; MP3.2 ; MP16 ; MP17 ; MP18 ; MP19 et MP21. Elles sont donc oxydase positif. Les souches : MP13 ; MP14 et MP15 sont quant à elles oxydase négatif (Figure 7).



**Figure 7** : Résultats du test d'oxydase

#### **4-3- Production d'indole**

Les résultats de la mise ne évidence de la production d'indole montre la présence d'un anneau rouge après addition du réactif de Kovacs. Toutes les souches sont ainsi productrices d'indole (Figure 8).



**Figure 8 :** Mise en évidence la production d'indole

#### **4-4- Recherche de la catalase**

Après ajout de quelques gouttes d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), on observe apparition d'une effervescence, ce qui traduit la présence de la catalase chez toutes les souches

#### **4-5- Galerie API 20 NE**

Les résultats de l'identification par la galerie API 20 NE montrent que toutes les souches ne possèdent pas de tryptophane désaminase et dégradent l'esculine. Cependant, on constate que pour les autres tests, les réponses sont très variables. Il y a lieu également de signaler que les souches MP16 et Mp19 présentent les mêmes caractères.



**Tableau III** : Résultats de la galerie API 20 NE

Test / souches	MP3.1	MP3.2	MP13	MP14	MP15	MP16	MP17	MP18	M19	MP21
<b>NO3</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>TRP</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<b>ADH</b>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<b>URE</b>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<b>ESC</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>GEL</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PNG</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## 5- Caractères nutritionnels

### 5-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone

D'après le tableau on remarque que toutes les souches sont capables d'assimiler tous les sucres et que les souches n'ont pas de préférence aux monosaccharides ou disaccharides par rapport aux polyols, contrairement à ce qui a été rapporté par plusieurs auteurs (Lindstrom *et al.*, 1988 ; Nour *et al.*, 1994 ; de Lajudie *et al.*, 1994)

Les souches présentent des exigences en substrats carbonés qui sont caractéristiques des rhizobia a croissance rapide, elles seraient apparentées au genre *Rhizbium* ou *Sinorhizobium*.

**Tableau IV:** Assimilation des sucres par les rhizobia isolés de nodules *Medicago polymorpha*.

Souches/ sucres	MP3.1	MP3.2	MP13	MP14	MP15	MP16	MP17	MP18	MP19	MP21
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lévulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## 6- Caractérisation physiologiques

### 6-1- Tolérance aux métaux lourds

L'étude de la tolérance des isolats aux métaux lourds montre qu'à l'exception de la souche MP13 qui montre une sensibilité à toutes les concentrations en Cd testées, les autres souches présentent une tolérance à tous les métaux testés (Figure 9).

Les concentrations minimales inhibitrices par les différents métaux montrent que dans le cas du Zinc, la souche MP18 présente la CMI la plus faible de valeur inférieure à 400 µg /ml, tandis que les autres souches présentent une CMI supérieure à 800 µg /ml.

Dans le cas de Cadmium, on remarque que la CMI est supérieure à 150 µg /ml pour la plus part des souches. En ce qui concerne le plomb, on constate qu'à l'exception de MP3.1

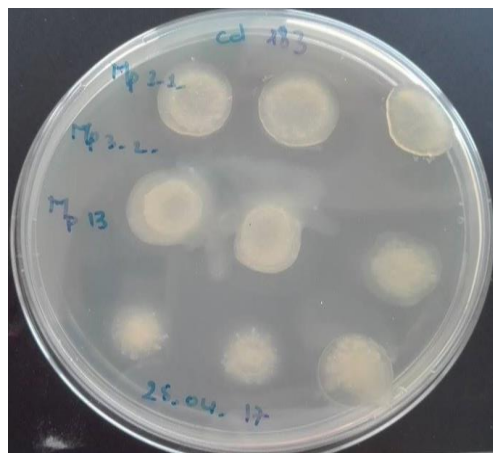
et MP18 qui présentent des CMI inférieures à 2072 µg /ml, les souches présentent des CMI supérieures 2500 µg /ml

Les isolats ont montré une résistance intrinsèque très élevée au Zn, Pb, Cd. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Struffi et col (1998) pour les rhizobia à croissance rapide (*Rhizobium sllae*). Les bactéries à Gram (-) sont tolérantes à des concentrations élevés de métaux lourds, alors que les bactéries à Gram (+) ne le sont pas (Fatell et *al.*, 1985).

**Tableau V** : Concentrations minimales inhibitrices des souches *vis à vis* des métaux lourds.

Métaux / Souches	Zn	Cd	Pd
MP 3.1	>800	>150	<2072
MP 3.2	>800	>150	>2500
MP 13	>800	<50	>2500
MP 14	>800	>150	>2500
MP 15	>800	>150	>2500
MP 16	>800	>150	>2500
MP17	>800	>150	>2500
MP 18	<400	<100	<2072
MP 19	>800	>150	>2500
MP 21	>800	>150	>2500

Les concentrations sont exprimées en µg/ml. Zn : Zinc ; Pb : Plomb ; Cd : Cadmium



**Figure 9** : Tolérance aux métaux lourds

## 6-2- Tolérance aux antibiotiques

D'après le tableau de la tolérance aux antibiotiques, toutes les souches présentent une sensibilité aux différents antibiotiques sauf pour l'oxacilline, à l'exception de la souche MP13 qui présente une tolérance aux antibiotiques : FOX, N, CAZ, AK, CX, MEM et OX. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Elkan (1992) qui a montré que les rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques que les rhizobia à croissance lente.

**Tableau VI :** Résultats de l'antibiogramme des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha*.

ATB/ Souches	FOX (mm)	N	CAZ	AK	CX	MEM	K	OX1	TE	GEN	E
MP3.1	32	12	12	22	28	22	20	6	35	18	25
MP3.2	30	11	15	21	25	34	20	6	30	18	20
MP13	6	6	6	6	6	6	20	6	40	20	10
MP14	34	11	15	18	28	39	16	6	30	15	30
MP15	20	10	22	20	18	21	15	6	40	14	25
MP16	22	12	20	15	18	30	20	6	35	18	25
MP17	20	9	25	24	8	23	14	6	28	13	18
MP18	12	10	30	20	8	46	17	6	34	15	16
MP19	19	10	17	16	10	35	17	6	44	18	20
MP21	24	14	26	17	20	35	24	6	44	20	6

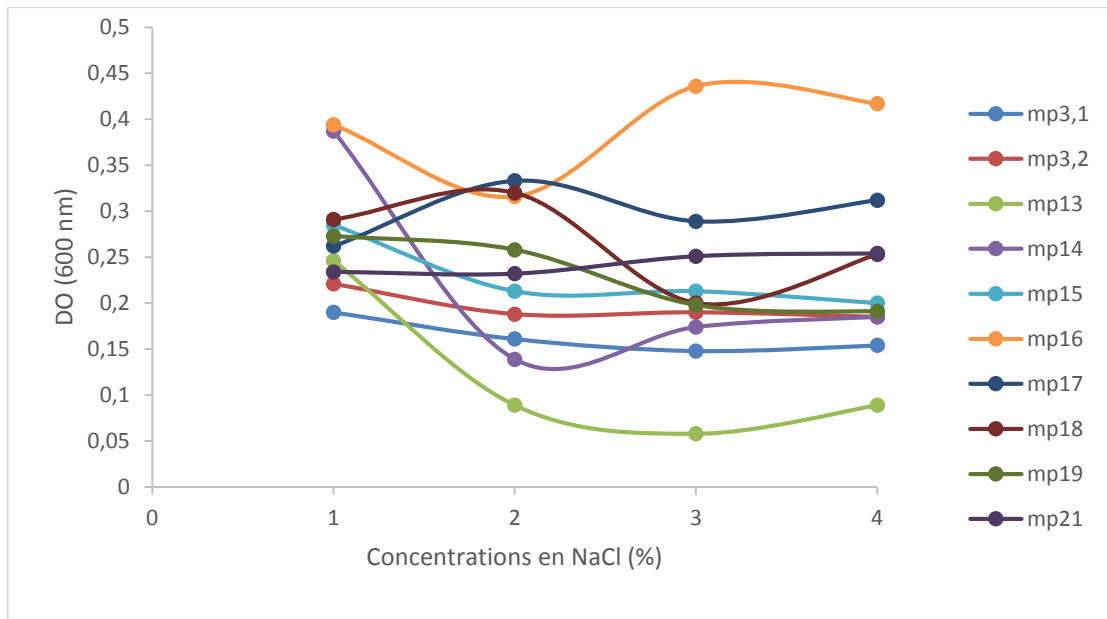
## 6-3- Tolérance au NaCl

La mise en culture des souches isolées de *M. polymorpha* sur milieu YMB avec les différentes concentrations en NaCl montre que la majorité des souches ont une meilleure croissance à 1%.

Les souches MP17, MP18 et MP19 ont un optimum de croissance de 2%, tandis que la souche MP16 présente un optimum de croissance à 3% et la souche MP 21 à 4% (Figure 10).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Jebara *et al.*, (2000) qui ont montré, que certaines souches de *Sinorhizobium meliloti*, ont été rapportées pour leur capacité à croître

à des concentrations élevées en sel (>3%). Cependant la tolérance de ces souches reste inférieure à celles de (Zahran *et al*, 1994) de 1700 mM d' NaCl chez les *Sinorhizobium*.

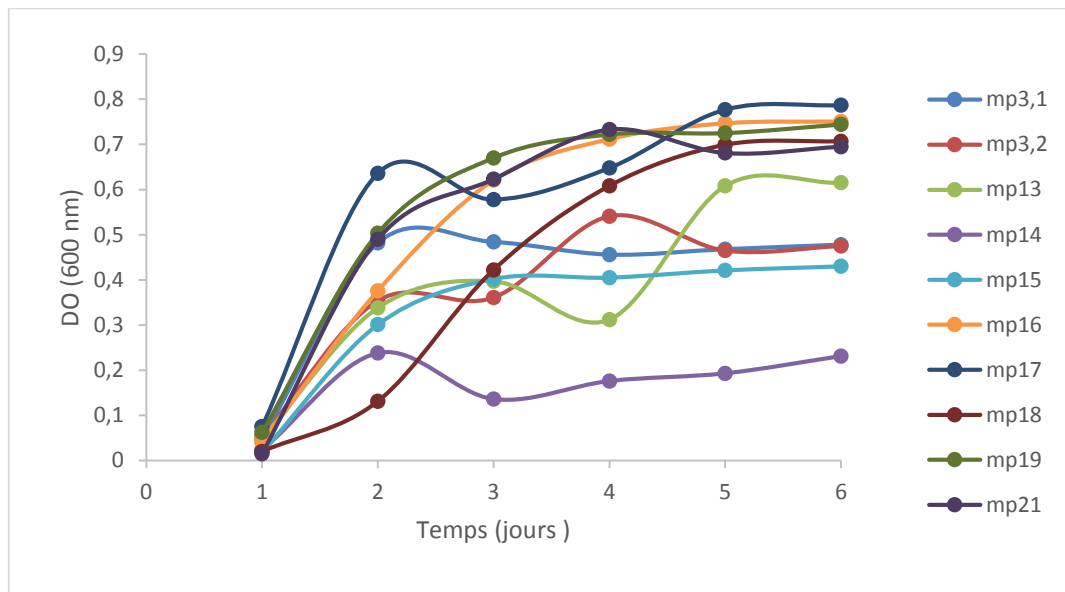


**Figure 10** : Effet du NaCl sur la croissance des souches isolées des nodules de *Medicago polymorpha*.

#### 6-4- Croissance bactérienne

Le suivi de la croissance des souches est une méthode utilisée afin de déterminer les paramètres cinétiques de croissance. La figure 11 montre que la plupart des souches atteignent la phase stationnaire après 24h d'incubation. Seule la souche MP18 présente une phase exponentielle prolongée pour atteindre la phase stationnaire après 96h.

Les travaux de Nour *et al.*, (1995) portant sur l'espèce *Mesorhizobium ciceri* ont montré que le *Rhizobium* à croissance rapide atteint sa croissance maximale après 36 à 72 heures en milieu liquide (Jordan., 1982 ; Nour *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1995.).



**Figure 11 :** Courbes de croissance des souches isolées des nodules de *Medicago polymorpha*.

En se basant sur les résultats de la cinétique de la croissance, le temps de génération a été calculé pour chacune des souches. Ainsi on constate que la souche MP 21 présente le temps de génération le plus court, soit 4h46 min, alors que la plupart des souches présentent un temps de génération supérieur à 7heures.

A partir de ces résultats, les isolats peuvent être classés dans le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente car la moyenne du temps de génération est comprise entre 4h46mn et 8h51mn. En effet (Jordan, 1982, 1984) ont montré que les souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* possèdent un temps de génération inférieur à 4 heures En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un temps de génération de 6 à 8 heures.

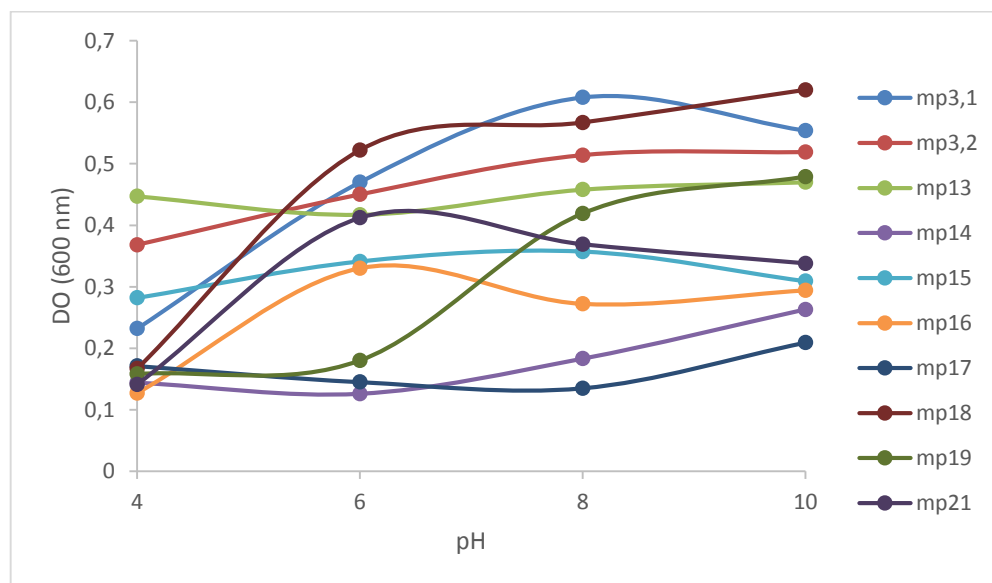
**Tableau VII** : Résultats de la croissance bactérienne

Souches	Croissances bactériennes (heures)
MP3.1	7h13m
MP3.2	8h45mn
MP13	8h36mn
MP14	7h7mn
MP15	6h1mn
MP16	7h25mn
MP17	7h47mn
MP18	8h51mn
MP19	7h57mn
MP21	4h46mn

### 6-5- Tolérance au pH

Nos résultats montrent que la plus part des souches présentent un optimum de croissance entre pH 6 et pH 8 mais, présentent une meilleure croissance au pH alcalin.

Glenn et Dilworth, (1994) ; Correa et Barneix, ont rapporté que les souches de la même espèce peuvent varier considérablement dans leur tolérance au pH (Figure 12).



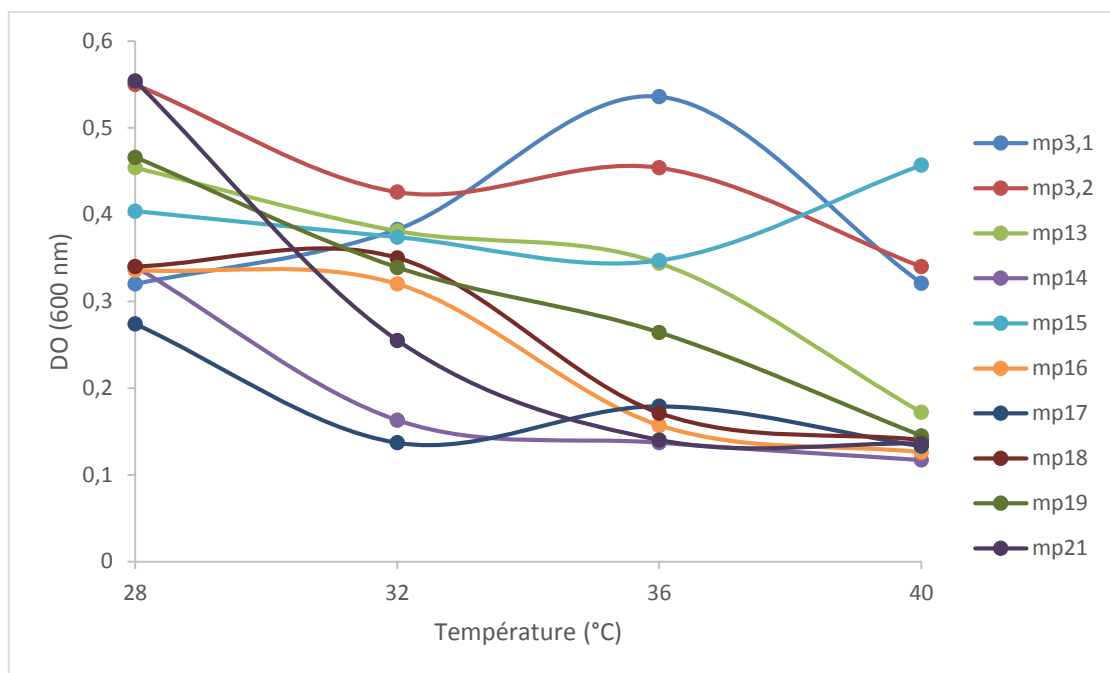
**Figure 12** : Effet du pH sur la croissance des souches isolées des nodules de *Medicago polymorpha*.

## 6-6- Effet de la température sur la croissance

D'après les résultats on remarque que la plupart des souches présentent un optimum de croissance à 28°C. Les souches MP18 et MP 3.1 présentent une meilleure croissance à 32°C et 36°C respectivement. La souche MP15 continue de croître même à une température plus élevée qui est de 40°C. Au-delà de 36°C, la majorité des souches sont très affectées à l'exception de MP15 (Figure 13).

Ces résultats sont en accord avec la littérature qui attribue le caractère mésophile aux rhizobia et avec la plus part des travaux réalisés au laboratoire d'écologie microbienne sur divers rhizobia isolées de différentes légumineuses, notamment du genre *Medicago*.

Ainsi, Kedjar (2001) a rapporté que des rhizobiums isolés de *Medicago sativa* dans la région de Bejaia présentent un optimum de croissance entre 25 et 30°C. Tandis que les rhizobia isolées de *Medicago polymorpha* présentent un optimum de croissance à 30°C. Par ailleurs, Boulila (2002) a rapporté que des souches de rhizobia isolés de *Medicago minima* se distinguent par un optimum de croissance à 41°C.



**Figure 13 :** Effet de la température sur la croissance des souches isolées des nodules de *Medicago polymorpha*.



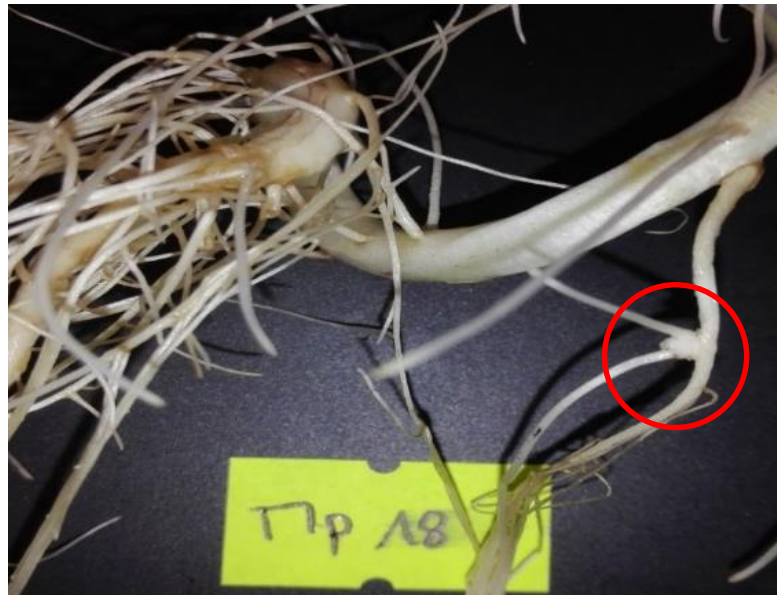
## 7- Test de nodulation

Les résultats du test de nodulation ont permis d'observer la formation des nodules par les souches MP13, MP16 et MP18. Ce qui confirme l'appartenance de ces souches aux rhizobia. Les autres souches n'ont pas nodulé la légumineuse *V. unguiculata* mais ne peuvent être exclus des rhizobia du moment où cette légumineuse n'est pas leur plante hôte d'origine.

**Tableau VIII** : Résultats du test de nodulation

<b>Souches</b>	<b>Nodulation</b>
<b>MP3.1</b>	–
<b>MP3.2</b>	–
<b>MP13</b>	+
<b>MP14</b>	–
<b>MP15</b>	–
<b>MP16</b>	+
<b>MP17</b>	–
<b>MP18</b>	+
<b>MP19</b>	–
<b>MP21</b>	–

(+) pour apparition de nodule(s) et (-) pour absence de nodule(s).



**Figures 14 :** Racines de *Vigna inguiculata* nodulées par les souches MP13 et MP18.

# **Conclusion et Perspectives**

## **Conclusion**

En se basant sur les résultats obtenus dans cette étude où nous avons analysé les caractères phénotypiques de 10 souches de rhizobia isolé à partir de *Medicago polymorpha* récoltée dans la station de Saket de la région de Bejaia. Au terme de cette étude, on retiendra que :

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, à l'examen microscopique et à l'aspect des colonies apparues après environ une semaine d'incubation à 28°C a montré que certains de ces isolats ont les caractères des rhizobia à croissance rapide. Tandis que les autres sont à croissance lente.

En fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA additionné au bleu de Bromothymol, certaines souches ont acidifié le milieu après seulement 24h d'incubation et d'autre l'alcalinise. Pour les tests biochimiques toutes les souches produisent de l'indole et possèdent une oxydase.

L'évaluation de la tolérance de nos isolats *vis-à-vis* des facteurs de stress a montré qu'ils sont capables de pousser sur une large gamme de pH allant de 4 jusqu'à 10. Pour la température, une bonne croissance se manifeste aux alentours de 28 °C sauf pour la souche MP15 qui se manifeste par une bonne croissance à 40°C. Elle mérite, de ce fait une attention toute particulière dans les futurs travaux. La tolérance au sel s'est révélée majoritaire à 1% et 2%. Toutefois, la croissance de certaines souches apparait à 4%.

Le test nutritionnel dévoile que les isolats ont tendance à utiliser une large gamme de sucres comme source de carbone.

L'évaluation de la résistance des souches étudiées aux antibiotiques montre une sensibilité *vis à vis* de plusieurs antibiotiques sauf pour l'oxaciline qui montre une tolérance pour toutes les souches.

Pour la résistance aux métaux lourds, montre différentes CMI pour les différents métaux utilisés chez les souches testées.

Seules 3 isolats sur 10 ont pu nodulé les racines de la plante *Vigna unguiculata*. Ce résultat négatif est dû à l'utilisation d'un hôte non spécifique.

Enfin, dans la perspective de mettre en application les résultats de nos recherches, il serait souhaitable :

- D'étudier le comportement de résistance des rhizobiums en présence d'autres antibiotiques et d'autres métaux lourds
- Refaire le test de nodulation sur les graines de la plante hôte.
- les caractères phénotypiques (inaffectivité, pouvoir symbiotique, osmotolérance...)

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., ... & Rey, L. (2014).** *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.
- Amrani, S., Nazhat-Ezzaman, N., & Bhatnagar, T. (2009).** Caractéristiques symbiotiques et génotypiques des Rhizobia associés à *Acacia saligna* (Labili.) Wendl dans quelques pépinières en Algérie. *Acta Botanica Gallica*, 156(3), 501-513.
- Badri, M., Zitoun, A., Ilahi, H., Huguet, T., & Aouani, M. E. (2008).** Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniata* Mill.(Fabaceae). *Journal of genetics*, 87(3), 241-255.
- Benabdoun, M., Gherbi, H., Djekoun, A., Bogusz, D., Franche, C., & Ykhlef, N. (2012).** FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE: LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE CASUARINA-FRANKIA. *Sciences & Technologie C*, (35), 15-19.
- Bensaid K. (2003).** Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha* de la region de Bejaia et étude de l'effet de Na Cl sur leur symbiose. Thèse de doctorat de Biologie de la Conservation et Ecodéveloppement.Faculté des Sciences de la nature et de la Vie (p.83).
- Bertine, N. M. N., Fernand, T., Gilbert, Z. T., Emile, M., Jules, L., Boukila, B., & Etienne, T. P. (2013).** Effet de la complémentation au *Tithonia diversifolia* sur l'évolution du poids post-partum et la croissance pré-sevrage des cobayes (*Cavia porcellus* L.). *Development*, 25, 8.
- Caird, M. A., Richards, J. H., & Donovan, L. A. (2007).** Nighttime stomatal conductance and transpiration in C3 and C4 plants. *Plant Physiology*, 143(1), 4-10.
- Crawford, E. J., Lake, A. W. H., & Boyce, K. G. (1989).** Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Advances in Agronomy*, 42, 399-437.
- De Jensen, C. E., Percich, J. A., & Graham, P. H. (2002).** Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research*, 74(2), 107-115.
- Del Pozo, Alejandro Ovalle, Carlos, Aronson, James & Avendaño, J. U. L. I. A. (2002).** Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in

central Chile. I. Phenology, biomass production and reproductive patterns. *Plant Ecology*, 159(2), 119-130.

**Dongmo Chaintreuil, C. (2000).** Caractérisation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes du riz sauvage *Oryza breviligulata*.

**Dumortier, G., El Kateb, N., Sahli, M., Kedjar, S., Boulliat, A., & Chaumeil, J. C. (2006).** Development of a thermogelling ophthalmic formulation of cysteine. *Drug development and industrial pharmacy*, 32(1), 63-72.

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

**Elise, S., Etienne-Pascal, J., de Fernanda, C. N., Gérard, D., & Julia, F. (2005).** The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant molecular biology*, 58(6), 809-822.

**Faria, S. D., Franco, A. A., Jesus, R. D., Menandro, M. D. S., Baitello, J. B., Mucci, E. S. F., ... & Sprent, J. I. (1984).** NEW NODULATING LEGUME TREES FROM SOUTH-EAST BRAZIL. *New phytologist*, 98(2), 317-328.

**Fettell, N. A., O'connor, G. E., Carpenter, D. J., Evans, J., Bamforth, I., Oti-Boateng, C & Brockwell, J. (1997).** Nodulation studies on legumes exotic to Australia: the influence of soil populations and inocula of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on nodulation and nitrogen fixation by field peas. *Applied Soil Ecology*, 5(3), 197-210.

**Gomes, C. M., Gottlieb, O. R., Bettolo, G. B. M., Delle Monache, F., & Polhill, R. M. (1981).** Systematic significance of flavonoids in Derris and Lonchocarpus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 9(2-3), 129-147.

**Hopkins, William G. (2003).** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.

**Keneni, A., Prabu, P. C., & Assefa, F. (2010).** Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 365-376

**Keneni, A., Prabu, P. C., & Assefa, F. (2010).** Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 365-376.



- Kimse, M., Soro, D., Bleyere, M. N., Yapi, J. N., & Fantodji, A. (2013).** Apport d'un fourrage vert tropical, *Centrosema pubescens*, en complément au granulé: effet sur les performances de croissance et sanitaire du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 1234-1242.
- Lafond, J., & Pageau, D. (2007).** Effets nutritionnels et non nutritionnels associés à la présence de légumineuses sur les rendements en grains d'orge et les nitrates du sol. *Canadian Journal of Soil Science*, 87(4), 445-454.
- Meeks, J. C. (1998).** Symbiosis between Nitrogen-Fixing Cyanobacteria and Plants The establishment of symbiosis causes dramatic morphological and physiological changes in the cyanobacterium. *BioScience*, 48(4), 266-276.
- Mérigout, P. (2006).** *Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants cultureux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté* (Doctoral dissertation, INAPG (AgroParisTech)).
- Moghaddam, B., Jebara, T., & Pentland, A. (2000).** Bayesian face recognition. *Pattern Recognition*, 33(11), 1771-1782.
- Moreira, F. M. S., Haukka, K., & Young, J. P. W. (1998).** Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, 7(7), 889-895.
- Moulin, L. (2002).** *Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia: de l'analyse du gène nodA à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries* (Doctoral dissertation, Lyon 1).
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., ... & Lindström, K. (1999).** *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1359-1368.
- Perret, J. P. C. J. M., & Choubert, J. M. (2007).** Le traitement du carbone et de l'azote pour des stations d'épuration de type boue activée confrontées à des fortes variations de charge et à des basses températures.
- Peter, J., Young, W., & HAUKKA, K. E. (1996).** Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, 133(1), 87-94.

- Rees, D. C., & Howard, J. B. (2000).** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current opinion in chemical biology*, 4(5), 559-566
- Rougé, P. (1981).** Étude des réactions croisées entre les lectines de légumineuses: In systématique et phylogénétique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 9(1), 39-43.
- Singh, Y., Khind, C. S., & Singh, B. (1991).** Efficient management of leguminous green manures in wetland rice. *Advances in Agronomy*, 45, 135-189.
- Somda, J., Kamuanga, M., Mendes, A., & Gomes, J. (2004).** Caractéristiques socioéconomiques et performances économiques des élevages laitiers en Guinée Bissau: cas des régions de Bafata et Gabu. *Socio-economic Research Working Paper*, (4), 48.
- Wani, S. P., Rupela, O. P., & Lee, K. K. (1995).** Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. In *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems* Springer Netherlands. (pp. 29-49).
- Yahia, N., & Fyad-Lameche, F. Z. (2003).** Evaluation of cold tolerance variability in annual *Medicago* species at the seedling stage. *Acta Botanica Gallica (France)*.
- 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.



# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1 : Composition des milieux de cultures.

#### 1- Yeast-Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10 g
Extrait de levure.....	0.4 g
K <sub>2</sub> HP04.....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
NaCl.....	0.1 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Le pH est ajusté à 6,8

#### 2- Yeast-Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
NaC l.....	0.1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

- Le pH est ajusté à 6,8

#### 3- Milieu Jensen :

- Solution minérale stock (10x)

CaHPO <sub>4</sub> .....	10g
MgSO <sub>4</sub> .....	05g
NaCl.....	02g

- Le pH est ajusté à 6,8

- **Solution FeCl<sub>2</sub> (10x)**

FeCl<sub>3</sub>.....0.1 g  
H<sub>2</sub>O.....100 ml

- **Solution d'oligo-éléments (10X)**

CuSO<sub>4</sub>.....0.16 g  
ZnSO<sub>4</sub>.....0.4 g.  
MnSO<sub>4</sub>.....3.6 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo , 7H<sub>2</sub>O.....0.5 g  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....0.004 g  
H<sub>2</sub>O.....200 ml

- **Dilution (10X)**

Solution minérale (stock 10X) .....100 ml  
Solution FeCl<sub>2</sub> (10X).....0.3 ml  
Solution d'oligoéléments (10X).....0.1 ml  
H<sub>2</sub>O.....900 ml



Diluer encore dans 2.5 ml  
d'H<sub>2</sub>O

## Annexe 2 : Tolérance au pH

<b>pH/ Souches</b>	<b>pH4</b>			<b>pH6</b>			<b>pH 8</b>			<b>pH10</b>		
<b>MP3.1</b>	0.256	0.230	0.210	0.488	0.470	0.453	0.632	0.622	0.612	0.587	0.521	0.556
<b>MP3.2</b>	0.345	0.383	0.378	0.471	0.443	0.437	0.552	0.589	0.515	0.555	0.540	0.525
<b>MP13</b>	0.448	0.446	0.447	0.424	0.417	0.410	0.425	0.427	0.430	0.470	0.472	0.474
<b>MP14</b>	0.126	0.173	0.134	0.170	0.188	0.130	0.183	0.191	0.175	0.286	0.234	0.270
<b>MP15</b>	0.295	0.282	0.270	0.341	0.370	0.313	0.345	0.341	0.350	0.322	0.339	0.356
<b>MP16</b>	0.127	0.126	0.129	0.331	0.330	0.330	0.259	0.279	0.280	0.247	0.287	0.207
<b>MP17</b>	0.191	1.141	0.181	0.110	0.104	0.116	0.115	0.160	0.130	0.253	0.227	0.202
<b>MP18</b>	0.162	0.172	0.167	0.543	0.587	0.500	0.556	0.577	0.570	0.614	0.648	0.682
<b>MP19</b>	0.145	0.158	0.171	0.199	0.158	0.185	0.444	0.408	0.480	0.446	0.460	0.453
<b>MP21</b>	0.123	0.170	0.130	0.425	0.400	0.412	0.364	0.369	0.375	0.366	0.358	0.375

### Annexes 3 : Tolérance à la température

Souches/ températures	28°C			32°C			36°C			40°C		
<b>MP3.1</b>	0.360	0.300	0.300	0.383	0.376	0.390	0.538	0.515	0.555	0.335	0.308	0.321
<b>MP3.2</b>	0.580	0.550	0.520	0.426	0.404	0.448	0.444	0.499	0.420	0.305	0.375	0.340
<b>MP13</b>	0.420	0.487	0.455	0.375	0.381	0.387	0.344	0.335	0.353	0.176	0.172	0.168
<b>MP14</b>	0.340	0.360	0.32	0.173	0.153	0.163	0.169	0.117	0.126	0.119	0.128	0.104
<b>MP15</b>	0.403	0.407	0.403	0.356	0.393	0.374	0.340	0.359	0.343	0.457	0.459	0.456
<b>MP16</b>	0.369	0.336	0.303	0.320	0.330	0.310	0.145	0.178	0.150	0.134	0.133	0.113
<b>MP17</b>	0.274	0.291	0.258	0.128	0.134	0.149	0.166	0.182	0.190	0.116	0.129	0.155
<b>MP18</b>	0.321	0.382	0.317	0.348	0.323	0.379	0.153	0.171	0.190	0.131	0.153	0.136
<b>MP19</b>	0.466	0.450	0.482	0.339	0.311	0.368	0.264	0.258	0.270	0.151	0.148	0.136
<b>MP21</b>	0.525	0.554	0.583	0.250	0.260	0.255	0.145	0.126	0.150	0.168	0.122	0.118





### Annexe 5 : Tolérance au NaCl.

[NaCl]/ Souches	1%			2%			3%			4%			5%		
<b>MP3.1</b>	0.218	0.194	0.160	0.183	0.156	0.145	0.158	0.214	0.142	0.163	0.139	0.160	0.148	0.150	0.202
<b>MP3.2</b>	0.217	0.240	0.207	0.189	0.171	0.205	0.178	0.181	0.211	0.170	0.193	0.192	0.148	0.137	0.109
<b>MP 13</b>	0.236	0.261	0.243	0.096	0.070	0.102	0.077	0.105	0.183	0.087	0.091	0.185	0.133	0.138	0.096
<b>MP 14</b>	0.365	0.133	0.663	0.146	0.132	0.320	0.405	0.236	0.193	0.148	0.169	0.240	.0186	0.206	0.215
<b>MP 15</b>	0.177	0.193	0.185	0.245	0.181	0.215	0.204	0.226	0.209	0.200	0.203	0.197	0.205	0.291	0.208
<b>MP 16</b>	0.428	0.390	0.366	0.495	0.332	0.340	0.455	0.485	0.368	0.446	0.385	0.420	0.630	0.661	0.480
<b>MP 17</b>	0.266	0.261	0.261	0.371	0.335	0.295	0.299	0.279	0.290	0.295	0.335	0.308	0.680	0.385	0.388
<b>MP 18</b>	0.268	0.236	0.369	0.324	0.316	0.322	0.200	0.225	0.175	0.276	0.238	0.247	0.202	0.243	0.297
<b>MP19</b>	0.275	0.258	0.288	0.251	0.262	0.261	0.203	0.189	0.204	0.218	0.203	0.154	0.204	0.265	0.185
<b>MP 21</b>	0.226	0.233	0.245	0.219	0.259	0.222	0.231	0.236	0.288	0.296	0.214	0.252	0.255	0.250	0.258

### Annexe 6 : Résultats de la croissance bactérienne

<b>Souches /temps</b>	<b>MP 3.1</b>	<b>MP3.2</b>	<b>MP13</b>	<b>MP14</b>	<b>MP15</b>	<b>MP16</b>	<b>MP17</b>	<b>MP18</b>	<b>MP19</b>	<b>MP21</b>
<b>T0</b>	0.048	0.053	.049	0.023	0.019	0.040	0.075	0.020	0.062	0.015
<b>T2</b>	0.482	0.354	0.338	0.238	0.301	0.376	0.636	0.131	0.503	0.490
<b>T3</b>	0.484	0.361	0.297	0.136	0.402	0.621	0.578	0.422	0.670	0.623
<b>T4</b>	0.560	0.541	0.312	0.176	0.405	0.712	0.648	0.608	0.722	0.733
<b>T5</b>	0.468	0.475	0.608	0.193	0.421	0.745	0.77	0.699	0.725	0.681
<b>T6</b>	0.478	0.475	0.615	0.231	0.430	0.751	0.787	0.707	0.744	0.695

## Résumé

Ce travail a été réalisé sur dix souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Medicago polymorpha*, récoltés dans la région de Bejaia. Les isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers une étude morphologique, biochimique et physiologique. L'évaluation de la résistance aux antibiotiques montre une résistance *vis-à-vis* de l'oxaciline. Quant à tolérance des souches aux métaux lourds, l'évaluation montre qu'à l'exception de la souche MP13 qui montre une sensibilité à toutes les concentrations en Cd testées. Le test de nodulation a confirmé l'appartenance de 3 souches à la famille des *Rhizobiaceae* vu leur capacité d'induire des nodules sur la racine de la légumineuse *Vigna unguiculata*. On suggère que nos souches appartiennent aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

**Mots clés :** *Medicago Polymorpha*, caractérisation phénotypique, *Vigna unguiculata*, Rhizobia.

## Abstract

This work was carried out on ten bacterial strains isolated from the root nodules of the legume *Medicago polymorpha* harvested in the Bejaia region. The isolates were phenotypically characterized by a morphological, biochemical and physiological study. Evaluation of resistance to antibiotics shows resistance to oxaciline. As for the tolerance of heavy metal strains, the evaluation shows that, with the exception of the MP13 strain, which shows a sensitivity to all the Cd concentrations tested. The nodulation test confirmed the belonging of 3 strains to the family of *Rhizobiaceae* due to their ability to induce nodules on the root of the legume *Vigna unguiculata*. It is suggested that our strains belong to the genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.

**Key words :** *Medicago Polymorpha*, phenotypic characterization, *Vigna unguiculata* , Rhizobia.

