

*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*

**Caractérisation phénotypique des  
bactéries isolées des nodules de  
*Pisum sativum* L.**

Présenté par :

**BELHADJ NAIMA & OULDYOUCEF KATIA**

Soutenu le : **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>r</sup> BEN SAID K.</b>	MAA	President
<b>M<sup>r</sup> BALHADI D.</b>	MAA	Encadreur
<b>M<sup>lle</sup> DJINNI I.</b>	MCB	Examineur
<b>M<sup>lle</sup> BOUDEHOUCHE W.</b>	Doctorante	Invité

**Année universitaire : 2016 / 2017**



## *Remerciements*

**T**out d'abord, nous rendons grâce à Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

**M**ajestueusement Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire monsieur BELHADI Djellali.

On le remercie de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

**O**n adresse nos plus vifs remerciements à Mme BOULILA de nous avoir permis d'effectuer ce projet au sein du laboratoire d'écologie microbienne.

**N**os chaleureux remerciements à Mlle BOUDEHOUCHE Wafa qui nous a accompagné tout au long de notre travail de pratique, nous avons apprécié votre disponibilité.

**S**ans oublier les membres du jury Mr BEN SAID ainsi que Mlle DJINNI, on vous remercie d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

**A** toutes personnes intervenant de près et de loin par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé nos réflexions et qui ont accepté de répondre à nos questions durant notre recherche

## *Dédicaces*

### *A MACHÈRE MAMAN*

Honorable aimable tu représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de la tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'accompagner

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour

### *A MON CHÈRE PAPA*

Autant de phrases et d'expressions ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance, tu as su graver en moi le sens de la responsabilité de l'optimisme et de la confiance en moi

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain

### *A MACHÈRE GRANDE SŒUR*

DOUDOU

A l'unique sœur que j'ai au monde qui me tient compagnie, merci pour ton soutien chaleureux que tu n'as pas cessé d'apporter tout au long de ma vie

### *A MES CHÈRES FRÈRES*

RABAH, JAA & LYES

Je vous dédie ce modeste travail en témoignage de l'amour que je ressens pour vous trois vous ne cessez pas de veiller sur moi merci pour tous

### *A TOUS MES PROCHEs*

Tantes oncles cousins et cousines

### *A MES MEILLEURES AMIES*

Merci d'être toujours près de moi

### *A Ma BINOME*

Ainsi qu'à toute l'équipe de notre chambre de la résidence universitaire

### *A TOUTES MES AMIES*

En souvenir de nos bons moments

Ainsi qu'à toutes les personnes qui me sont chères que j'ai omis de citer

KATIA

## *Dédicaces*

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, pour leur amour

A ma sœur *sabrina* et ses deux beaux enfants *Meriem* et

*Mido*

A mes deux frères *Aziz* et *Amar* les meilleurs frères au  
monde

A mon cher mari *zouhir*

A mon petit ange *mignou Chahinez* pour son soutien

Sans oublier ma binôme *katia* et toutes mes amies sans

*Exception*

*Naima*

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Liste des différents antibiotiques utilisés .....	13
<b>Tableau II :</b> Les différentes concentrations en métaux lourds utilisée .....	14
<b>Tableau III:</b> Caractérisation morphologique des colonies.....	16
<b>Tableau IV :</b> Résultats de l'antibiogramme .....	19
<b>Tableau V :</b> Sensibilité des souches aux métaux lourds .....	20
<b>Tableau VI :</b> Résultat de La galerie API 20 NE .....	21
<b>Tableau VII:</b> Temps de génération des isolats .....	25
<b>Tableau VIII :</b> Résultats d'assimilation des sucres .....	26

## Liste de figures

<b>Figure I :</b> Photographie de <i>Pisum sativum</i> L.....	10
<b>Figure II :</b> Réhydratation des nodules.....	11
<b>Figure III :</b> Rinçages des nodules .....	11
<b>Figure IV :</b> Nodules à broyer .....	11
<b>Figure V :</b> Coloration de Gram observées sous microscope G×100).....	17
<b>Figure VI :</b> Résultat du test au bleu de Bromothymol.....	17
<b>Figure VII :</b> Résultats du test d'indole.....	18
<b>Figure VIII :</b> Résultats de test d'oxydase .....	19
<b>Figure IX:</b> Croissance sur milieux à différents pH .....	22
<b>Figure X :</b> Effet de la température sur la croissance des isolats.....	22
<b>Figure XI :</b> Effet du Na Cl sur la croissance des isolats .....	23
<b>Figure XII:</b> Cinétique de croissance des différentes souches .....	24
<b>Figure XIII :</b> Résultats du test de nodulation.....	25

## Liste d'abréviation

**ADH** : arginine dihydrolase

**AM** : Amikacine

**ARN** :

**BTB** : Bleu de Bromothymol

**C°** : degré Celsius

**CaCl<sub>2</sub>** : chlorure de calcium

**CASFM** : comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie

**Cd** : cadmium

**Cx** : Céfotaxime

**CAz** : Céftazidime

**ESC** : Esculine Ferric Citrate

**Fox** : Cifoxitine

**GEN** : Gentamicine

**GEL** : Gelatinase

**h** : heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : eau oxygénée

**AK** : Kanamycine

**ME** : Méropénème

**min** : minute

**ml** : millilitre

**N** : Azote

**N<sub>2</sub>** : Gaz dinitrogène

**Ne** : Néomycine

**nm** : nanomètre

**NO<sub>3</sub>** : nitrate

**OFNAET** : Office Algérienne d'Action Economique et Touristique

**OPGN** : O-nitrophényl-b-D-galactopyranoside

**Ox** : Oxacilline

**Pb** : plomb



**Ps:** *Pisum sativum*L.

**R.** : Rhizobium

**T** : Température

**TE** : Tétracycline

**TRP** : tryptophane

**µg** : microgramme

**µl** : microlitre

**URE** : urease

**YMA:** YastMannitol Agar

**YMB** : YastMannitol Bouillon

**Zn** : zinc

# *Introduction*

## **Introduction**

La nutrition des plantes intéresse l'homme depuis l'antiquité. De ce fait, l'agriculture biologique, comme toutes formes d'agriculture doit se poser la question de son amélioration mais aussi, de l'évaluation des moyens techniques de production. Un tel enjeu implique une définition collective des objectifs à atteindre pour initier des innovations et développer une maîtrise des techniques de la production tout en se questionnant sur les performances économiques et environnementales (Capitaine et al., 2009). La nécessité de nouvelles orientations est particulièrement mise en avant pour faire face aux défis des prochaines décennies en matière d'alimentation, de préservation des écosystèmes, de la biodiversité, des contraintes énergétiques et de changement climatique (Bonny, 2011).

Le développement de l'agriculture biologique est basé à l'origine sur la conduite d'un système de culture équilibré, c'est pour cela que les agriculteurs sont incités à se spécialiser pour atteindre des rendements nécessaires à la demande du marché. Cette orientation conduira les producteurs à faire appel le plus souvent aux engrais du commerce pour assurer la productivité par la nutrition azotée des cultures (Skerman, 1976). Malheureusement, le coût élevé des engrais, notamment des engrais azotés, est souvent incompatible avec les ressources financières de la majorité des paysans des pays en voie de développement. L'une des solutions permettant le maintien ou l'amélioration de la fertilité des sols, sans avoir recours aux importations d'engrais chimiques, consiste à utiliser les systèmes fixateurs d'azote et ils appellent avec une certaine urgence l'exploitation des possibilités offertes par les légumineuses (d'où l'intérêt d'implanter des fabacées en précédent) (Rinaudo, 1985).

Par leur capacité unique à fixer l'azote de l'air à l'aide de leurs nodosités, les légumineuses avec leur autonomie en azote réduisent l'utilisation des engrais azotés dans les systèmes de culture (Naudin, 2009). Les légumineuses ont joué un rôle essentiel dans le succès de la production à travers l'histoire. Elles contribuent par environ un tiers de prise directe de protéine par l'homme, tout en servant de source importante de fourrage pour des animaux et d'huiles comestibles et industrielles grâce à leur capacité pour la fixation symbiotique d'azote (Smyklet et al., 2012). Cette qualité nutritionnelle des graines de légumineuses est un enjeu économique important suite à la

demande croissante de protéines végétales pour la consommation animale et humaine. Pour cette raison, la politique agricole commune a encouragé pendant des années la production de sources protéiques pour l'alimentation avec comme objectif de réduire le déficit en protéine. L'effet de cette politique s'est traduit par une augmentation de la production du pois, de fève et de féverole essentiellement en Europe du Nord, en Europe du sud, et particulièrement dans les régions méditerranéennes (da Silva., 1996).

La région de l'est algérien présente un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide et semi aride, elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées. Les quelques variétés de la période coloniale ont été perdues. L'érosion génétique pour cette culture a été pratiquement totale. Le pois rond surtout cultivé en Algérie comme pois de casserie, était en régression marquée depuis une dizaine d'années durant les années 50 en raison des prix commerciaux et des débouchés qui s'étaient effondrés. Depuis, le pois sec est tombé pratiquement dans les oubliettes, les travaux n'ont pratiquement jamais été initiés sur cette espèce. Les quelques variétés de la période coloniale ont été perdues. L'érosion génétique pour cette culture a été pratiquement totale. (FAO, 2006)

Les légumineuses ont plusieurs rôles dans plusieurs domaines, alimentaire, économique et agronomique (Bellon, 1993), avec une forte présence dans les écosystèmes naturels présentant un contraste de climat et de sol. Jusqu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, elles étaient la principale source primaire d'azote réactif et la seule utilisable en agriculture grâce à une fixation symbiotique dans le système de production végétales (Schneider, 2015). Dans certains pays comme la Chine et l'Inde, elles sont utilisées comme engrais vert (Rinaudo, 1986).

Les sources d'azote minéral, pour les plantes supérieures, sont le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et l'azote atmosphérique utilisé seulement par les végétaux qui vivent en symbiose avec des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ). Plusieurs types de bactéries fixatrices d'azote sont reconnus. C'est le cas des bactéries vivantes dans le sol ou dans l'eau, des bactéries symbiotiques produisant des nodules racinaires dans des légumineuses ou, des bactéries associatives fixant l'azote à l'extérieur des racines des plantes, des bactéries fixatrices d'azote dans les racines, les tiges et les feuilles des plantes (Takuji, 2014). En effet, lors de la symbiose entre les légumineuses comme le pois (*Pisum sativum* L.) et les bactéries du genre *Rhizobium* au

niveau des nodules, où se trouvent des souches très performantes de bactéries fixatrices d'azote, une amélioration de la productivité de ces légumineuses est observée (Cazenave, 2014).

La fixation d'azote des légumineuses a une énorme importance écologique, économique et aussi alimentaire. En effet, la culture du pois peut présenter des atouts considérables, permettant de répondre aux problématiques actuelles de recherche de produits riches en protéines, de plantes écologiques avec des cultures à faibles intrants en particulier sur la nutrition azotée (Raveneau., 2014) d'où l'importance de notre travail qui consiste à étudier la diversité des rhizobies nodulants le petit pois tout en induisant une réduction importante de l'utilisation des engrais azotés, et en sélectionnant les rhizobies qui peuvent avec une association avec les pois améliorer l'adaptation de cette plante par une amélioration de leur fixation d'azote et une amélioration de la nutrition.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres: le premier traite les généralités sur la fixation symbiotique et les légumineuses, le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes suivies pour sa réalisation, le troisième est consacré à la présentation des résultats et leurs discussions et enfin, nous terminerons par une conclusion et quelques perspectives.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

## **I- La fixation biologique**

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère de l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en azote ammoniacal (NH<sub>3</sub>), cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Hopkins, 2003). La fixation biologique de l'azote joue un rôle essentiel dans le cycle de l'azote dans l'écosystème. Plusieurs types de bactéries fixatrices d'azote sont connues telle que les bactéries vivantes dans le sol ou dans l'eau, des bactéries symbiotiques produisant des nodules racinaires dans des légumineuses (Takuji, 2014).

### **I-1-L'azote atmosphérique**

L'azote (N) est un élément essentiel pour toutes les formes de la vie, les quantités d'azote assimilables par les plantes dans les sols sont faibles alors que cet élément constitue souvent, avec le manque d'eau et de phosphate, un principal facteur limitant la croissance des végétaux (Cleland et Harpole, 2010), Il représente environ 2% des matières sèches totales de la plante qui pénètre la chaîne alimentaire. Néanmoins, les plantes ne peuvent pas accéder directement au gaz dinitrogène (N<sub>2</sub>) qui représente environ 80% de l'atmosphère, Elles absorbent l'azote disponible dans le sol à travers leurs racines sous forme d'ammonium et de nitrates. (Santi, 2012).

### **I -1-2- Importance de l'azote pour la plante**

La disponibilité du sol en azote peut être augmentée dans des zones agricoles par l'offre d'engrais, mais dans les états naturels l'azote se trouve sous forme inorganique, produit par des microorganismes qui représentent moins de 5% du sol total (Salon et *al.*, 2011). Considéré comme un élément constitutif des végétaux, le plus important après le carbone et qui doit être sous une forme assimilable pour les plantes, c'est pour cette raison que les plantes établissent des relations symbiotiques avec des bactéries (rhizobia) capables de fixer et réduire l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique (nitrogénase) au sein des nodules (Fossou et *al.*, 2012). Cette enzyme des bactéroïdes est capable de réduire l'azote atmosphérique en ammonium, elles se trouvent dans les nodosités des légumineuses (Marie-Esther, 1983).

L'azote (N) est un facteur limitant pour la croissance et le rendement des plantes, en raison de sa faible disponibilité dans le sol, cet élément est un composant essentiel des cellules au niveau structurel, génétique et métabolique, participant à beaucoup de processus de croissance et développement de la plante, parmi les processus biologique fixateurs d'azote le plus étudiés est celui qui met en évidence l'association des légumineuses avec les *Rhizobium*.

## **II-La symbiose légumineuse-rhizobia**

La symbiose Rhizobium-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (PERRET et *al.*,2000)

Les légumineuses fourragères tel que le pois présentent beaucoup d'atouts notamment par leur teneur élevée en azote et leur capacité d'apporter une fertilisation azotée (Aufrere et *al.*, 2012).En effet, les légumineuses peuvent pousser dans le sol sans azote combiné grâce à la fixation de l'azote atmosphérique en collaboration avec le rhizobia (Vladimir,2013). En effet, les légumineuses ont un intérêt agronomique et environnemental dans les rotations culturales puisque elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique et permettent d'économiser les apports d'engrais azotés (Tolleter, 2007).

Les rhizobia sont des bactéries gram négatives vivant dans le sol et capables d'établir une interaction symbiotique avec les légumineuses. Pendant cette interaction mutuelle, les bactéries apportent l'azote combiné, sous forme d'ammoniaque directement transformée de l'azote atmosphérique à la plante. En retours, la plante fournit des hydrates de carbone et développe de nouveaux organes sur ses racines qui accueillent les bactéries ce qu'on appelle les nodules (Poinsot, 2012).

### **II-1-La Spécificité d'hôte**

Il y'a une forte spécificité dans la symbiose entre les légumineuses et le Rhizobium, ce dernier est un genre de bactéries qui survit universellement dans le sol, ils colonisent les cellules



de légumineuse dans des nodules de racine et fixe l'azote atmosphérique pour le transformer en ammoniac (Takashi Sato, 2014).

La formation de la symbiose légumineuse-rhizobium exige l'infection réussie des racines des légumineuses avec des rhizobia dans des cellules de la plante, où les bactéries favorisent la formation d'un nodule, dans lequel l'azote atmosphérique est fixé par les Rhizobium aux dépens des ressources énergétiques de la plante (Glyan'koet et *al.*, 2013).

## **II-2-Facteurs limitant l'association symbiotique des légumineuses**

L'association symbiotique peut être affectée par plusieurs des facteurs limitant tels que la sécheresse, la salinité les changements climatiques tel que températures extrêmes, la présence des métaux lourds ainsi que la faible disponibilité d'éléments nutritifs (ELDIN, 1989)

## **III-La culture du Pois en Algérie**

En Algérie, la culture du pois est soumise aux contraintes sévères telles que la sécheresse, la salinité et des maladies depuis plusieurs années consécutives (Tadja, 2009). La production du pois est particulièrement réponde à Oran, Sidi bel Abbés et Tlemcen (Nord) où elle est soit en culture normale ou en jachère. Son exportation est réglementée par l'arrêté du 27 juin 1958 et soumise au contrôle de l'OFAAET (Office algérien d'Action Economiques Touristique) (Laumont, 1960).

## **IV-Données sur la culture du Pois (*Pisum sativum*L.)**

### **IV-1-Historique**

Le Pois (*Pisums ativum* L.), appelé aussi Pois sec ne faisait guère avant 1830, que l'objet de quelques cultures de plein champ dont la production était réservée à la nourriture des classes pauvres et des habitants des campagnes. Les surfaces cultivées ont, par la suite, progressé assez régulièrement jusqu'en 1929 (Laumont, 1960).

### **IV-2-Origine et répartition biologique**

Le pois (*Pisum sativum* L.), originaire d'Asie du Sud-ouest, était parmi les premières cultures cultivées par l'homme. On trouve encore des pois sauvages en Afghanistan, en Iran et en Ethiopie. Cette culture a longtemps été cultivée aux États-Unis et, historiquement, le pois de la campagne était l'une des meilleures cultures commerciales du Wisconsin. En 1909, 78

000 acres ont été plantées et une partie de l'est et du nord-est du Wisconsin a conduit le pays à la production de pois sur le terrain. La culture du pois a conduit à une séparation progressive des types: ceux cultivés pour l'utilisation des légumes, ceux cultivés pour la semence et le fourrage, et les types de plateaux comestibles qui ont évolué plus récemment (Oelke et al., 1991).

#### IV-3-Classification

L'espèce *Pisum sativum* L. appartient au genre *Pisum*, classé dans la tribu des Fabeae (*Viciae*), cette dernière regroupe diverses espèces de plantes herbacées annuelles, réparties en cinq genres : *Lathyrus* L. (gesse/pois doux, environ 160 espèces), *Lens* (lentilles, 4 espèces), *Pisum* L. (pois, 3 espèces), et *Vicia* L. (vesces, environ 140 espèces) et le genre monotypique *Vavilovia* (Smýkal et al., 2011). La classification la plus récente du genre *Pisum*, après avoir compté plusieurs espèces, ne regroupe plus que trois espèces:

-*P. sativum* L.

- Subsp. *sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*)
- Subsp. *elatius*

- *P. fulvum*

- *P. abyssinicum* (Cieslarová et al., 2011)

#### IV-3-1-Taxonomie

La taxonomie du *Pisum sativum* est la suivante :

**Règne :** Plantae

**Sous règne :** Viridiplantae

**Infra-règne :** Streptophytae

**Division :** Tracheophytae

**Sous-division :** Spermatophytina

**Infra-division :** Angiospermae

**Classe :** Magnoliopsidae

**Super –ordre :** Rosanae

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae

**Genre :** *Pisum*

**Espèce :** *Pisum sativum* L (Benantar et Ayouni, 2015).

#### IV-4-Utilisations et intérêt du pois

Le pois, *Pisum sativum*L., est une légumineuse d'intérêt agronomique connue depuis l'antiquité. Il était utilisé pour la consommation humaine et animale. Au Moyen-âge, le pois était surtout considéré comme légume sec, riche en énergie et en protéines puis, il été cultivé comme légume frais pour la première fois en France (Tolleter, 2007).

Le pois présente un intérêt potentiel par suite des progrès attendus de sa culture, de la qualité de ses protéines et sa richesse en lysine (Quemere et al., 1982), c'est une excellente source de protéines et d'énergie car ses derniers sont reconnus comme très dégradables (Pelletier., 1999). Ces protéines présentent une qualité correspondante aux besoins de l'alimentation animale en eau et en énergie, ainsi qu'une autonomie de sa nutrition azotée en conséquence, il a un impact positif sur la réduction des rejets de gaz à effet des serres et la tendance à l'acidification des sols (Munier et Carrouée, 2003). Cet Azote contribue aussi à la diminution des émissions de gaz à effet de serre liés à la synthèse des engrais azotés. D'autre part, le pois permet de réduire les pressions parasitaires dans les rotations céréalières. Enfin, dans les systèmes de polyculture-élevages, il constitue un atout pour la recherche de l'autonomie en protéines de l'exploitation (Corre-Hellou., 2006).

en France l'utilisation du pois comme supplément protéique dans les aliments du porc est une pratique déjà ancienne (Bourdon. et al., 1977).Le pois, de même que les autres légumes secs, est un aliment indispensable pour les populations peu consommatrices de produits carnés (Munier, 2003).

#### IV-5-Rhizobiums associés au pois

Selon des études basées sur les Séquences d'ARNr16S, les Bradyrhizobium, Azorhizobium et Rhizobium renferment les espèces qui forment des nodules dans les racines ou les tiges des légumineuses (Martinez, 1994).En effet, les rhizobia qui infectent les légumineuses hôtes, comme les pois communs, ont été placés dans une seule espèce, *Rhizobium leguminosarum*. Cette espèce a été subdivisée en trois sous espèce qui sont *R. leguminosarum, bv.Viciae*, *R. leguminosarum,bv. phaseoli*. *R. legumineusarum,bv. etli*, (Berkumet al., 1996).

Les légumineuses de la tribu des Viciae (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, et *Lens*) ont longtemps été considérées comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce

bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Cette classification a changé depuis 2008, d'autres espèces de *Rhizobium* ont été décrites pour des souches capables de noduler certaines espèces de légumineuses de la tribu des *Viciae*, comme *Rhizobium fabae*, isolé à partir de nodules *Vicia fabae* en Chine et capable de noduler le pois (Tian et al., 2008).

#### **IV-6- Combinaison de l'assimilation des nitrates et fixation d'azote chez le pois**

La fixation de l'azote permet d'obtenir un produit agricole riche en protéines. Cependant, la voie de la fixation symbiotique de l'azote n'est pas exclusive. En effet, le pois peut combiner la fixation et assimilation des nitrates du sol, dans ce cas, la voie de l'assimilation minérale prédomine sur la voie de la fixation symbiotique. La capacité à fixer l'azote atmosphérique n'est donc pas un frein à l'utilisation des nitrates présents dans le sol mais s'ajuste en fonction de la disponibilité en azote et ces besoins (Munier et Carrouée, 2003).

(Keyser et al., 1982) ont décrit les rhizobia à croissance rapide qui produisent des nodules et fixent de l'azote atmosphérique, classés dans le genre *Rhizobium* avec deux groupes liés *R.meliloti*, et *R.fredii*, bien que leur gamme d'hôtes soit semblable à celle des espèces à croissance lente *Bradyrhizobium japonicum* (Jarvis et al., 1992).

# *Matériel et méthodes*

# *Résultats et Discussion*

## I- Isolement de souches bactériennes

10 souches ont été obtenues.

### I -1- Caractérisation morphologique des isolats

Parmi les caractéristiques morphologiques et culturelles utilisées pour la caractérisation et l'identification des rhizobiums, une des plus remarquables est leur croissance sur milieu YMA (Vincent, 1970). Les colonies présentent un aspect lisse, circulaire à punctiforme, de taille variable de 1 à 2mm de diamètre, à contour régulier, de couleur beige, jaune ou blanche. Elles sont bombées, muqueuses, opaques et rarement translucides (Tableau III). L'ensemble de ces caractéristiques morphologiques rapproche ces isolats au genre *Rhizobium* (Jordan, 1982).

Une variation dans la production et la densité des exopolysaccharides a été observées avec la plupart des isolats. Toutefois, la souche Ps3 se caractérise par une production plus importante.

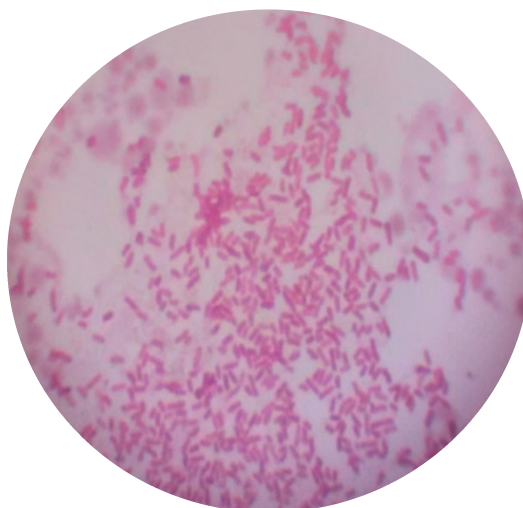
**Tableau III:** Caractérisation morphologique des colonies

Caractères Souches	Forme	Taille (mm)	Couleur	Aspect	Opacité	EPS	Durée de croissance
Ps 3	Punctiforme	<1	Jaune	Gluant	++	++++	3 j
Ps 5	Ronde	1	Jaune	Sèche	+	+	7 j
Ps 7	circulaire et bombée	1	Beige	Sèche	+	++	6j
Ps 8	Circulaire et bombée	2	Jaune	Mucoïdale	-	-	7 j
Ps9	Punctiforme	2	Jaune	Gluant	+	+	8j
Ps 10-1	Punctiforme	2	Jaune	Gluant	+	+	9 j
Ps 10 -2	Ronde et lisse	<1	Jaune	Gluant	+	+	7 j
Ps 11	Punctiforme	<1	Jaune	Gluant	++	++	10 j
Ps 12	Punctiforme	2	Beige	Gluant	++	+	10 j
Ps 14	Punctiforme	2	Jaune	Gluant	+	++	12 j

La caractérisation culturelle sur le milieu YMA additionné de rouge Congo montre que toutes les souches le dégradent. Toutefois, elles présentent des aspects variables.

### **I-1-1-Coloration de Gram**

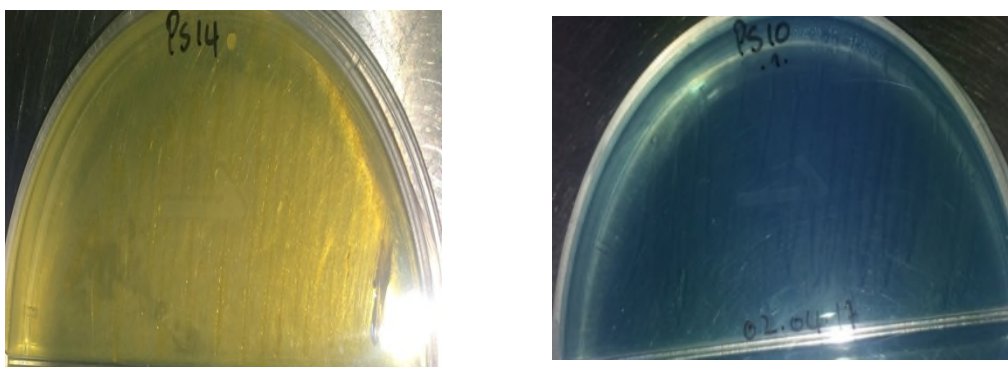
L'observation microscopique montre des cellules de différente forme bacille et coccobacille petits, Gram (-).



**Figure V :** Coloration de Gram observées sous microscope (G×100)

### **I-1-2- Test au Bleu de Bromothymol**

A l'exception des souches Ps 3 et Ps 14 qui provoquent l'acidification du milieu YMA au BTB, la plupart des isolats provoque son alcalinisation (figure VI). D'après Lesueur(1996), les souches alcalinisantes sont à croissance lente et appartiennent au genre *Bradyrhizobium*. Par ailleurs, (Kenedi et *al.*, 2010) a rapporté que les isolats producteurs d'acide avec une croissance rapide sont semblables à *Rhizobium leguminosarum* biovar.vicia



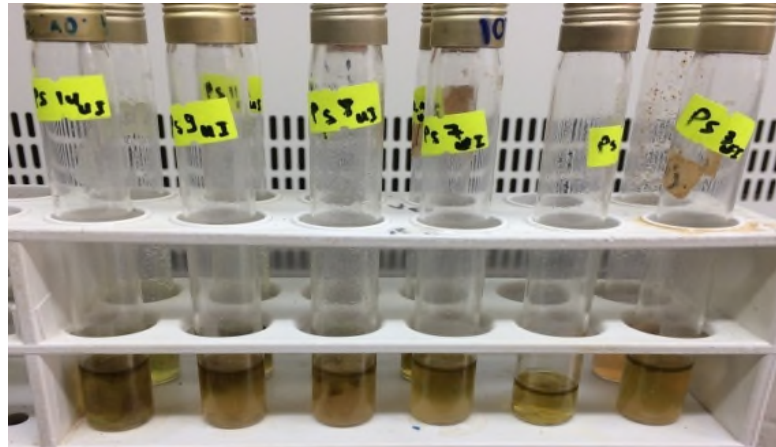
**Figure VI :** Résultat du test au bleu de bromothymol



## **I-2- Caractérisation biochimiques**

### **1-2-1- La production d'indole**

Les résultats montrent la présence de la formation d'un anneau rouge à la surface des tubes, ce qui indique que nos souches produisent de l'indole à partir du tryptophane (figure VII), ce test permet de mettre en évidence la présence de la tryptophanase ainsi que l'identification des entérobactéries (bacille Gram -)



**Figure VII : Résultats du test d'indole**

### **I-2-2- Résistance aux antibiotiques**

Nos souches se sont révélées plus sensibles à la Kanamycine, Tétracycline, Cefoxitine, Amikacyne, Céfotaxime, Méropénème et un peu moins sensibles à l'Oxacillin, Néomycine, Gentamicine et la Céf tazidime. La plupart des souches sont moins sensibles à l'exception de Ps12 et Ps14 qui sont très sensibles avec un diamètre de 33 et 34mm.

La sensibilité à la Tétracycline et Kanamycine dans notre étude est comparable à celle rapporté par (Jordan, 1984) pour le genre *Rhizobium* (Schwinghamer, 1985) a montré que les souches isolées de *R. trifolii* étaient en général en cible à la plupart des antibiotiques utilisés, tandis que les niveaux de résistance les plus élevés se sont produits contre la spectinomycine et chloramphenicol.

La sensibilité des isolats aux antibiotiques peut être due au fait que ces bactéries n'ont pas été exposées à ces antibiotiques dans des conditions naturelles (environnement).

Tableau IV : Résultats de l'antibiogramme

ATB/ Souche	K mm	Ox mm	TE Mm	GEN mm	Fox mm	NE Mm	CAZ Mm	AK Mm	CX Mm	MEM 10mm
Ps 3	21	6	40	19	28	10	12	20	25	6
Ps 5	20	6	45	16	16	10	27	20	24	20
P7	23	6	44	15	15	10	6	24	25	30
Ps8	20	6	40	18	27	10	6	11	24	30
Ps9	18	6	35	12	26	13	6	17	20	25
Ps10-1-	22	6	37	15	18	11	6	22	25	24
Ps10-2-	23	6	35	18	17	10	6	20	24	20
Ps 11	20	6	40	19	21	10	8	15	18	33
Ps 12	16	6	28	15	26	8	33	18	22	30
Ps 14	20	6	32	19	30	10	34	20	25	34

### I-2-3- Recherche de la catalase

Les résultats montrent que nos souches produisent une effervescence au contact avec l'eau oxygénée, donc elles sont catalase positive. Selon (Vincent, 1981), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principale des souches de *Rhizobium*.

### I-2-4- Production d'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram (-). La présence d'une oxydase constitue l'une des caractéristiques des souches de *Rhizobium* (Vincent, 1981).

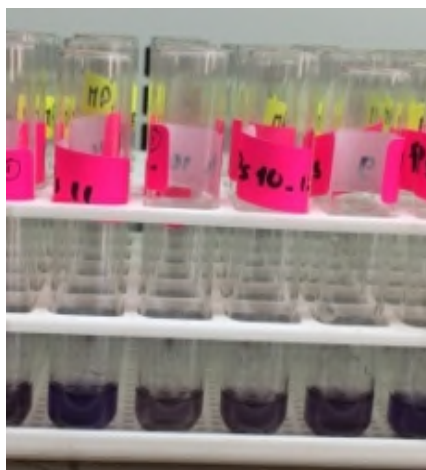


Figure VIII : Résultats de test d'oxydase

### **I-2-5- Sensibilité aux métaux lourds**

La plupart des souches isolées sont apparues résistantes à différentes concentrations des métaux lourds, à l'exception de Ps 10-2, et Ps 11 qui sont inhibées à des concentrations correspond à 654 et 800 (Tableau V) pour Zn. En ce qui concerne le cas du cadmium la plupart des souches résistes à des concentrations testées. Toutefois il a signalé que les souches (Ps 11, Ps12) sont inhibées à partir d'une concentration de 100 ug/ml. Par ailleurs pour le Pb on constate que la plupart des souches sont inhibées à la 3ème concentration 1500ug/ml.

La sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des rhizobia et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de « bio-remédiation » contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du rhizobium comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par (Abbes et Kamel 2004)

**Tableau V:** Sensibilité des souches aux métaux lourds

<b>Métaux</b>	<b>Zn</b>				<b>Cd</b>				<b>Pb</b>			
	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>654</b>	<b>800</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>112.4</b>	<b>150</b>	<b>1000</b>	<b>1500</b>	<b>2072</b>	<b>2500</b>
<b>Ps 3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Ps 5</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Ps 7</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Ps 8</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Ps 9</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Ps 10-1-</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Ps 10-2-</b>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Ps11</b>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps 12</b>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<b>Ps 14</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

### **I-2-6- Identification par galerie API 20 NE**

Toutes les souches hydrolysent de l'esculine mais ne possèdent pas de tryptophane désaminase. La plupart des souches dégradent l'urée et réduisent les nitrates. Par ailleurs, on constate que les souches Ps9 et Ps12 présentent les mêmes caractères.

**Tableau VI : Résultat de La galerie API 20 NE**

<b>Sucres Caractères</b>	<b>Ps 3</b>	<b>Ps 5</b>	<b>Ps 7</b>	<b>Ps 8</b>	<b>Ps 9</b>	<b>Ps10-1</b>	<b>Ps10-2</b>	<b>Ps 11</b>	<b>Ps 12</b>	<b>Ps 14</b>
<b>NO3</b>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>TRP</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ADH</b>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<b>URE</b>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>ESC</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>GEL</b>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<b>OPNG</b>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+

### **I-3-Caractérisation physiologique**

#### **I-3-1-Effet du pH**

La figure IX montre que toutes les souches se développent aux différents pH testés. Toutefois, on remarque que la croissance dans les milieux à pH basique est plus importante comparée à celle observée sur les milieux à pH acides. Seule la souche Ps10-1 présente une croissance comparable sur les pH testés. Ces résultats concordent avec ce qui a été rapporté par (Jordan,1984) qui a constaté que les bactéries appartenant à la famille des endophytes symbiotiques, tolèrent parfaitement les pH allant de 4.5 à 9 ainsi qu'avec ceux enregistrés par (Keyser et Munns,1979), qui ont détecté la croissance de leurs souches a des conditions assez basses de l'acidité avec des valeurs de pH entre 4.5 et 6.3.

L'action des pH alcalins sur les bactéries peut se manifester soit par une ionisation des molécules, ce qui ralentit leur passage dans le cytoplasme (Tungan et Martin, 1985), soit en modifiant la solubilité des gaz ou la disponibilité des substances nutritives *vis-à-vis* des cellules bactériennes (Schwartzbord, 1985), soit en inactivant certaines enzymes indispensables au métabolisme bactérien.

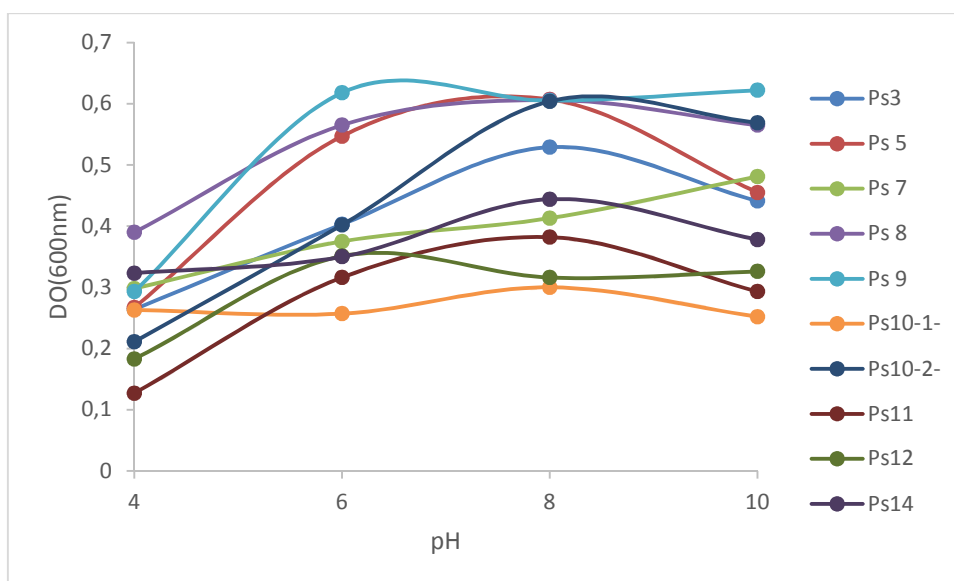


Figure IX: Croissance sur milieux à différents pH

### I-3-2- Effet de température

Toutes les souches retenues dans cette étude présentent une meilleure croissance à des températures entre 28°C et 32°C.

(Jordan, 1984) a rapporté que la température maximale pour *R. leguminosarum* bv.*trifolii* est de 30 °C.

Nos résultats (Figure X) concordent avec ceux rapporté par (Zahran, 1999), Pour la plupart des rhizobiums, l'intervalle de température de croissance est de 28 à 31°C.

Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia

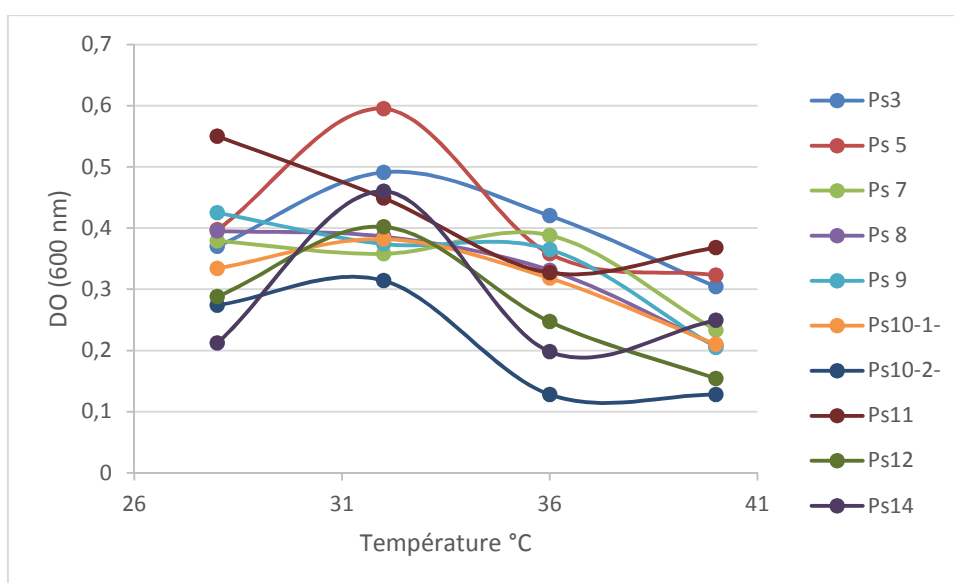


Figure X : Effet de la température sur la croissance des isolats

### 1-3-3-Tolérance au NaCl

La flore du sol, les bactéries nodulants les légumineuses, les rhizobia en particulier, sont exposés à l'action de divers facteurs abiotiques, notamment les sels. En général, les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de la réponse des rhizobiums aux conditions de salinité (Diez *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus, montrent que la majorité des souches présentent une tolérance à la salinité jusqu'à une concentration de 4%.

Les rhizobia tolérants au sel peuvent avoir le potentiel d'améliorer le rendement de légumineuses sous stress salin (Fuskhah *et al.*, 2014). Ceci est constaté dans la plupart des travaux en relation avec la taxonomie des rhizobia. Cette tolérance s'explique le plus souvent par la présence de molécules osmoprotectrices dans les cellules bactériennes (Nour *et al.*, 1995).

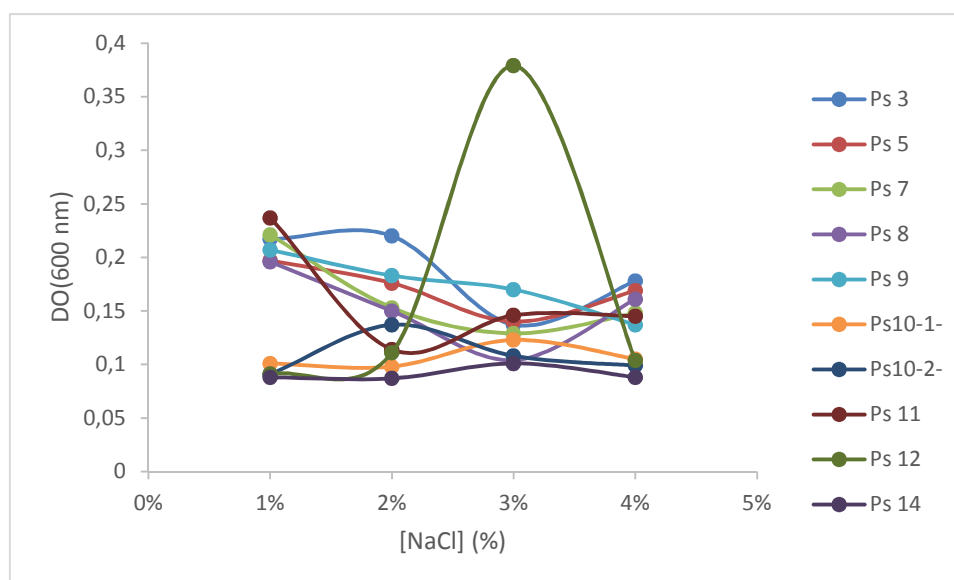


Figure XI : Effet du NaCl sur la croissance des isolats

### I-3-4- Cinétique de croissance des souches

Le suivi de la croissance des souches est une méthode utilisée afin de déterminer le paramètre cinétique de croissance, la représentation graphique de l'évolution de la croissance en fonction du temps (figure XII) permet de déterminer le temps de génération ainsi, 3 souches à savoir Ps3, Ps5 et Ps7 présentent un temps de génération inférieur à 6 heures tandis que, les autres souches présentent un temps de génération qui varie de 6 à 9h.13min.

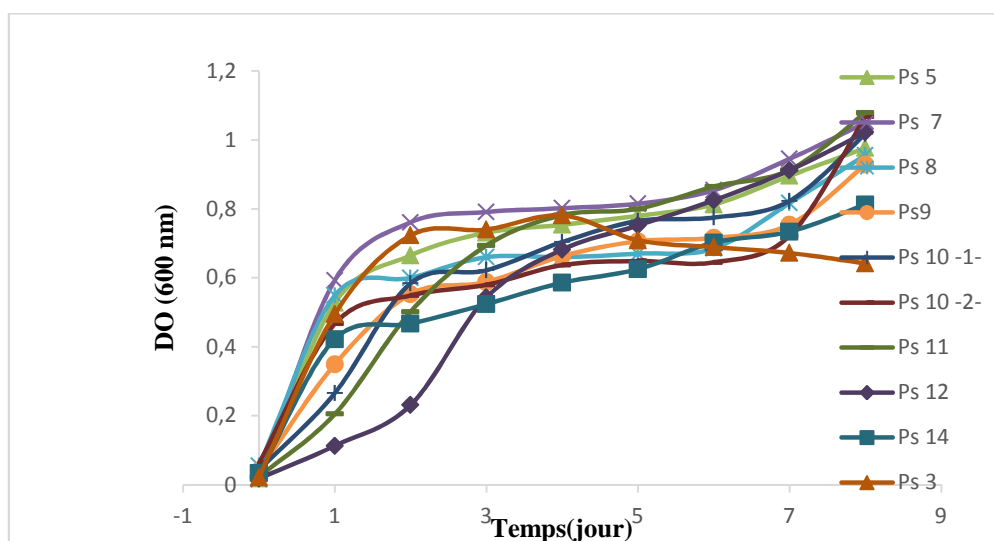


Figure XII : Cinétique de croissance des différentes souches

les souches Ps 3, Ps 5 et Ps 7 sont à croissance rapide leur temps de génération (Figure XII) est inférieur à six heures nos résultats sont en accord avec (Deshwal et Chaubey, 2014) qui ont rapporté que des isolats nodulant les racines du pois ont un temps de génération moyen allant de 3h et 3h,6min.

(Stowers, 1985) a rapporté que les rhizobiums isolés des légumineuses d'origine tempérée, telles que *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. meliloti* sont désignés comme étant à croissance rapide et présentent des temps de génération de moins de six heures alors que, les souches à croissance lente telles que *R. japonicum* et *R. lupini* isolés des légumineuses d'origine tropicale, qui ont des temps de génération supérieurs à six heures qui est le cas de nos autres souches.

La durée de croissance a été mesurée en prenant la densité optique (DO) à 600 nm des souches à chaque intervalle de 24 h. Le graphique a été tracé en fonction du temps de génération qui a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Temps de génération} = 24 \times \log 2 / t_1 - t_0$$

Tableau VII : Temps de génération des isolats

Souches à croissance rapide	G<6h	Souches à croissance lente	G>6h
Ps 3	4h 20min	Ps 8	7h.13min
Ps5	4h.55min	Ps9	7h.40min
Ps7	4h.36min	Ps10-1-	9h.8min
		Ps10-2-	8h.18min
		Ps11	7h.36min
		Ps12	9h.3min
		Ps14	6h.36min

### I-3-5- Tests de nodulation

L'expérience a été menée pour permettre le bon développement du système racinaire et pour évaluer la capacité de nos souches de former des nodules sur les racines, selon nos résultats il y'a eu formation de nodule pour la souche Ps 9 et Ps 11 (figure XIII).

La plupart des autres souches n'ont pas nodulé, l'absence de la nodulation ne permet pas de tirer la conclusion sur la non appartenance de ces souches aux rhizobia. Ceci pourrait être dû à la spécificité de la nodulation de ces souches pour leur plante hôte d'origine.



Figure XIII: Résultats du test de nodulation



**I- Caractérisation nutritionnelle**

**II-1- Assimilation des sucres**

Les résultats du test d'assimilation des différents sucres montrent que la totalité des souches assimilent tous les sucres testés. Sans pour autant avoir une préférence pour les monosaccharides et polysaccharides.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Stowers, 1985), les sources de carbone (le maltose et lactose, glucose, galactose, Rhamnose, sorbitol, arabinose, xylose, saccharose et glycérols) sont généralement utilisées par les bactéries du genre *Rhizobium*, ce même auteur a rapporté que les rhizobiums à croissance rapide sont capables d'utiliser une large gamme d'hexoses, de pentoses, des disaccharides, les trisaccharides et les acides organiques.

**Tableau VIII : Résultats d'assimilation des sucres**

<b>Souches Sucres</b>	<b>Ps 3</b>	<b>Ps 5</b>	<b>Ps 7</b>	<b>Ps 8</b>	<b>Ps 9</b>	<b>Ps10-1-</b>	<b>Ps10-2-</b>	<b>Ps 11</b>	<b>Ps 12</b>	<b>Ps 14</b>
<b>Saccharose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Raffinose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Maltose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Salicine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sorbiose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Tréhalose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lévulose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glycérol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Arabinose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cellobiose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Rhamnose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



*Conclusion*

## Conclusion

L'amélioration de la production agricole nécessite la sélection préalable de souches bactériennes efficaces, adaptées aux conditions environnementales stressantes.

la présente étude consiste à isoler des bactéries symbiotiques dans le cadre de l'amélioration de la productivité des légumineuses par l'optimisation de la fixation d'azote.

L'étude des caractéristiques phénotypiques a permis, d'une part, de déterminer le niveau de variabilité morphologique entre les 10 souches isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Pisum sativum* L. et d'autre part, d'évaluer le comportement de la croissance bactérienne de ces isolats aux différentes conditions environnementales.

Au terme de cette étude, on retiendra que :

- Les souches isolées présentent une grande diversité morphologique et physiologique sur le milieu de culture YMA.
- La plupart des souches étudiées sont capables de se développer dans une gamme de pH allant de 4 à 10, avec un optimum de croissance à pH basique compris entre pH 6 et 8.
- Une large tolérance au NaCl, et aux températures a été notée pour l'ensemble des souches.
- Toutes les souches sont sensibles à tous les antibiotiques utilisés.
- Une large gamme d'utilisation de substrats carbonés comme source de carbone et d'énergie est observée chez toutes les souches.
- la plupart des souches présentent une tolérance aux métaux lourds testés (Zn, Cd et Pb) et à différentes concentrations.

L'étude de la cinétique de croissance sur milieu YMA a montré que la plupart des souches sont à croissance lente avec un temps de génération supérieur à 6h, tandis que, les souches Ps 3, Ps 5 et Ps 7 présentent une croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 h).

Ces souches tolérantes deviennent plus intéressantes pour la nodulation et la croissance des plantes. Cela permettra de les exploiter afin d'assurer la fixation biologique

de l'azote dans les systèmes agricoles. Pour compléter cette étude et parvenir à réaliser ces objectifs, d'autres travaux doivent être réalisés :

- La caractérisation à travers d'autres caractères inexplorés (utilisation des acides aminés, des acides organiques, ...)
- L'étude de la tolérance aux autres métaux lourds et à d'autres concentrations.
- La réalisation du test de nodulation sur la plante hôte d'origine et sur d'autres légumineuses, dont le but d'évaluer le spectre d'hôtes.
- Evaluer la capacité fixatrice d'azote (activité nitrogénase)
- Caractérisation moléculaire à travers l'étude des gènes symbiotiques et des gènes de ménages.

*Références*  
*Bibliographiques*

**A**

ABBAS, S. M. ET KAMEL, E. A. *Rhizobium* as a biological agent for preventing heavy metal stress. *Asian J Plant Sci*, 2004, vol. 3, no 4, p. 416-424.

AUFRERE, J., THEODORIDOU, K., et BAUMONT, R. Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. *Productions Animales*, 2012, vol. 25, no 1, p. 29.

**B**

BELLON, S. Mieux connaître la place des légumineuses fourragères. L'expérience méditerranéenne. *Fourrages*, 1993, vol. 135, p. 289-310.

BENANTAR et AYOUNI 2015, Evaluation de l'efficacité symbiotique de quatre souches de *Rhizobium leguminosarum* SV.Viciae nodulant le pois *Pisum sativum*, mémoire de Master en Microbiologie option Ecologie microbienne, Université des Frères Mentouri Constantine, 31p.

BONNY, Sylvie. L'agriculture écologiquement intensive: nature et défis. *Cahiers Agricultures*, 2011, vol. 20, no 6, p. 451-462.

BOURDON, D., JUNG, J., et PEREZ, J. M. Valeur énergétique et azotée de différentes variétés de pois (*Pisum sativum* L.) pour le porc. *Journ. Rech. Porc. Fr.*, 1977, vol. 9, p. 265-

BOSSUET, Jérôme et VADEZ, Vincent. S'appuyer sur les multiples bénéfices des légumineuses à graines pour une agriculture plus productive et nutritive dans les tropiques semi-arides (Relying on the numerous advantages of grain legumes for more productive and nutritive agriculture in the semi-arid tropics). *Sécheresse*, 2013, vol. 24, no 04, p. 314-321.69

**C**

CAPITAINE, M., DAVID, C., et FREYCENON, R. Evaluation et amélioration de la durabilité de l'agriculture biologique: éléments de débats. *Innovations agronomiques*, 2009, vol. 4, p. 209-215.

CARPÉNÉ, Marie-Anne. Purification et caractérisation de signaux biologiques à l'état de traces. 2013. Thèse de doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier.

CAZENAVE, Alexandre-Brice. Réponse adaptative à court terme de la fixation symbiotique du pois protéagineux à une ablation d'une partie des racines nodulées, en lien avec la disponibilité en assimilats carbonés. 2014. Thèse de doctorat. Dijon.

Cleland E E, Harpole W S. 2010. Nitrogen enrichment and plant communities. New York Academy of Sciences. 1195: 46 –61

Cieslarová J, Smýkal P, Dočkalová Z, Hanáček P, Prochazka S, Hýbl M, Griga M. 2011. Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. Genetic Resources and Crop Evolution. 58: 439–451.

CORRE-HELLOU, Guénaëlle, DIBET, Audrey, AVELINE, Anne, *et al.* Le pois au service des systèmes de culture à faibles intrants: quels besoins variétaux. Dossier de l'environnement de l'INRA, 2006, p. 111-116.

#### **D**

DESHWAL, Vishal Kumar et CHAUBEY, Abhishek. Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. Journal of Academia and Industrial Research, 2014, vol. 2, no 8, p. 464-7.

DEROCHE, Marie-Esther. Relations entre la photosynthèse et l'assimilation de l'azote. Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 1983, vol. 130, no 1, p. 85-98.

#### **E**

ELDIN, Michel. Le risque en agriculture. IRD Editions, 1989.

#### **F**

FAO. 2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques, INRAA. FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FOSSOU, R. K., KOUASSI, N. K. I. I., KOUADJO, G. C. Z., *et al.* Diversité De Rhizobia Dans Un Champ Cultive De Pois D'angole (*Cajanus Cajan* L.) (Legumineuses) A Yamoussoukro (Centre Côte D'ivoire). Agronomie Africaine, 2012, vol. 24, no 1, p. 29-38.

FUSKHAH, Eny, SUTRISNO, R. D., BUDHI, S. P. S., *et al.* Effectiveness of salt-tolerant rhizobium and forage legumes symbiosis on saline soil. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia*, 2014, vol. 1, no 16, p. 1-6.



**G**

GLYAN'KO, A. K. et ISCHENKO, A. A. Influence of rhizobial (*Rhizobium leguminosarum*) inoculation and calcium ions on the NADPH oxidase activity in roots of etiolated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2013, vol. 49, no 3, p. 215.

GUEDES, C. M. et DIAS DA SILVA, A. Cinétique de la dégradation dans le rumen de la matière sèche et de l'azote de graines de légumineuses méditerranéennes. *Ann. Zootech*, 1996, vol. 45, p. 423-435.

**H**

Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. Université des Sciences de Lille. Edition de Boeck. pp 99-120.

**J**

JARVIS, B. D. W., DOWNER, H. L., et YOUNG, J. P. W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1992, vol. 42, no 1, p. 93-96.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1984, vol. 1, p. 234-254.

JORDAN, D. C. NOTES: transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1982, vol. 32, no 1, p. 136-139.

**K**

KENENI, Asefa, PRABU, P. C., et ASSEFA, F. Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from *faba* bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, vol. 12, p. 365-376.

KEYSER, Harold H., BOHLOOL, B. Ben, HU, T. S., *et al.* Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, 1982, vol. 215, no 4540, p. 1631-1632.

Keyser.H.H.,Munns. DN., Hohenberg J.S 1979: Acid Tolerance of Rhizobia in Culture and in Symbiosis with Cowpea. *SOIL SCI. SOC. AM. J.*, VOL. 43 pp .42-52.

**L**

LAUMONT, P. et CHEVASSUS, A. Note sur l'amélioration du pois rond en Algérie. 1960.

LESUEUR, Didier, TASSIN, Jacques, ENILORAC, M. P., *et al.* La symbiose *Calliandrachalothyrus-rhizobium*: spécificité de la plante-hôte pour noduler et fixer l'azote atmosphérique. Caractéristiques biochimiques et symbiotiques du partenaire microbien. *Bois et forêts des tropiques*, 1996, no 248, p. 43-59.

LINDSTROM, K., AND S. LEHTOMAKI. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50:277-287.

**M**

MARINO, Daniel, FRENDO, Pierre, LADRERA, Ruben, *et al.* Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiology*, 2007, vol. 143, no 4, p. 1968-1974.

MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil*, 1994, vol. 161, no 1, p. 11-20.

MUNIER-JOLAIN, Nathalie et CARROUÉE, Benoît. Quelle place pour le pois dans une agriculture respectueuse de l'environnement ? *Argumentaire agri-environnemental. Cahiers Agricultures*, 2003, vol. 12, no 2, p. 111-120.

**N**

NAUDIN, Christophe. Nutrition azotée des associations Pois-Blé d'hiver (*Pisum sativum* L.–*Triticuma estivum* L.): Analyse, modélisation et propositions de stratégies de gestion. 2009. Thèse de doctorat. Université d'Angers.

NOUR, Sarah M., CLEYET-MAREL, Jean-Claude, NORMAND, Philippe, *et al.* Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicerarietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, vol. 45, no 4, p. 640-648.



OELKE, E. A., OPLINGER, E. S., HANSON, C. V., *et al.* Dry Field Pea: Alternative Crops Manual. University of Wisconsin-Extension, University of Minnesota-Center for Alternative Plant and Animal Products and the Minnesota Extension Service. St. Paul, Minnesota, 1991.

OHYAMA, Takuji, MOMOSE, Atsushi, OHTAKE, Norikuni, *et al.* Nitrogen Fixation in Sugarcane. In : *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, 2014.



PELLETIER, Christian et SAINT-LAURENT, MAPAQ Bas. Alimentation d'un troupeau laitier avec des pois. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec—Bas-Saint-Laurent, 1999.

PERRET, Xavier, STAEHELIN, Christian, et BROUGHTON, William J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, vol. 64, no 1, p. 180-201.

POINSOT, Véréna, CARPÉNÉ, Marie-Anne, BOUAJILA, Jalloul, *et al.* Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2012, vol. 33, no 1, p. 14-35.



QUÉMÉRÉ, P., FEKETE, J., et LEUILLET, M. Utilisation du pois protéagineux par le porcelet sevré précocement. In : *Influence du taux d'incorporation et de la variété*. 1982. p. 267-282.



RAVENEAU, Marie-Paule. Effet des vitesses de dessiccation de la graine et des basses températures sur la germination du pois protéagineux. 2012. Thèse de doctorat. Université d'Angers.

RINAUDO, Gérard. Utilisation des légumineuses à nodules caulinaires comme engrais vert en riziculture. Arbres fixateurs d'azote; L'Amélioration biologique de la fertilité du sol: actes des séminaires, 17-25 mars [1986], Dakar, Senegal/[organ par le Cent de recherche pour le devint [et] la Fond int pour la science], 1987.

RUIZ-DÍEZ, Beatriz, FAJARDO, Susana, PUERTAS-MEJÍA, Miguel Angel, *et al.* Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of microbiology*, 2009, vol. 191, no 1, p. 35-46.

RUIZ-DÍEZ, Beatriz, FAJARDO, Susana, PUERTAS-MEJÍA, Miguel Angel, *et al.* Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of microbiology*, 2009, vol. 191, no 1, p. 35-46.

### **S**

SANTI, Carole, BOGUSZ, Didier, et FRANCHE, Claudine. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 2013, vol. 111, no 5, p. 743-767.

SATO, Takashi. Effects of *rhizobium* inoculation on nitrogen fixation and growth of Leguminous green manure crop hairy vetch (*Viciavillosa* Roth). In : *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*. InTech, 2014.

SCHNEIDER, Anne et HUYGHE, Christian. *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires*. Editions Quae, 2015.

-SCHWARTZBROD, L., VILAGINES, Ph, SCHWARTZBROD, J., *et al.* Evaluation of the viral population in two wastewater treatment plants: Study of different sampling techniques. *Water Research*, 1985, vol. 19, no 11, p. 1353-1356.

SKERMAN, P. J. Les légumineuses fourragère tropicales. Food & Agriculture Org., 1982.

Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. 9: 4–18.

STOWERS, Mark D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annual Reviews in Microbiology*, 1985, vol. 39, no 1, p. 89-108. DESHWAL, Vishal Kumar et CHAUBEY, Abhishek. Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. *Journal of Academia and Industrial Research*, 2014, vol. 2, no 8, p. 464-7.

**V**

TADJA, A., BENKADA, M. Youcef, RICKAUER, M., *et al.* Characterization of ascochyta as pathological species of pea (*Pisum sativum* L.) at the north-west of Algeria. *J. Agron*, 2009, vol. 8, no 3.

TIAN, Chang Fu, WANG, En Tao, WU, Li Juan, *et al.* *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, vol. 58, no 12, p. 2871-2875.

TOLLETER, Dimitri. *Analyse structurale et fonctionnelle d'une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant) mitochondriale exprimée dans les graines de pois*. 2007. Thèse de doctorat. Université d'Angers.

**V**

VAN BERKUM, PETER, BEYENE, Desta, et EARDLY, Bertrand D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, vol. 46, no 1, p. 240-244.

VAN BERKUM, PETER, BEYENE, Desta, et EARDLY, Bertrand D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, vol. 46, no 1, p. 240-244.

Vincent J M 1981 Genre rhizobium the procaryote vol 1 Schlegel H G et Balows A (eds Berlin pp 818-843

VINCENT, James Matthew, *et al.* A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria., 1970.

**Y**

YAKOUBI, 2014 « Biologie physiologie et mise en évidence de l'activité enzymatique chez quelques isolats d'*Ascochyta pisi* agent de l'antracnose de petit pois », Mémoire de Magister en Microbiologie option Biodiversité des microorganismes, Université d'ORAN-ES SENIA, 120p.

**Z**

Zahran H. H., 1999: *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, N° 4 pp 968–989

ZHUKOV, Vladimir A., SHTARK, Oksana Y., BORISOV, Alexey Y., *et al.* Breeding to improve symbiotic effectiveness of legumes. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, 2013, p. 167-207.

ZOHRA, BENANTAR Fatma et RYM, AYOUNI.(2015) Évaluation de l'efficiencie symbiotique de quatre souches de *Rhizobium leguminosarum*sv. viciaenodulant le pois *Pisum sativum*.

# *Annexes*

**Annexe 01****Milieu YMA (Vincent, 1970).**

Mannitol .....	10g
Extrait de levure .....	0.4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.2g
NaCl .....	0.1g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1000ml

Le pH est ajusté à 6.8

**Milieu YMB (Vincent ,1970)**

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

Le pH est ajusté à 6.8

**Milieu nutritif de Jensen****-Solution minérale stock(10×)**

CaHPO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O).....	10g
K <sub>2</sub> HPO.....	0.2g
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	0.5g
NaCl .....	0.2g

**-Solution FeCl<sub>2</sub>(10×)**

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



**-Solution d'oligo-éléments (10×)**

CuSO <sub>4</sub> .....	0.16g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0.4g
MnSO <sub>4</sub> .....	3.6g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo, 7H <sub>2</sub> O .....	0.5g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0. ....	004g
H <sub>2</sub> O .....	200ml

**Dilution (1×)**

Solution minérale (Stock × 10) .....	100ml
Solution FeCl <sub>2</sub> (10×) .....	0.3ml
Solution d'oligoélément (10×) .....	01ml
H <sub>2</sub> O .....	900ml

**Annexe 03****-Résultats des testes biochimique**

souches	Aspect sur RC	Aspect sur BTB	nitrate	oxydase	indole
<b>Ps 3</b>	Absorbance	Acidification	+	+	+
<b>Ps 5</b>	Dégradable	Alcalinisation	+	+	+
<b>Ps 7</b>	Dégradable	Alcalinisation	-	+	+
<b>Ps 8</b>	Dégradable	Alcalinisation	+	+	+
<b>Ps 9</b>	Dégradable	Alcalinisation	+	+	+
<b>Ps 10 -1-</b>	Dégradable	Alcalinisation	-	+	+
<b>Ps 10 -2-</b>	Dégradable	Alcalinisation	-	+	+
<b>Ps 11</b>	Dégradable	Alcalinisation	+	+	+
<b>Ps 12</b>	Absorbance	Alcalinisation	+	+	+
<b>Ps 14</b>	Dégradable	Acidification	+	+	+

## Annexe 04

Tableau des valeurs de la densité optique

<b>Temps (jours) souches</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Ps 3</b>	0.022	0.495	0.723	0.740	0.680	0.670	0.689	0.900	0.998	0.967	0.629
<b>Ps 5</b>	0.018	0.528	0.665	0.731	0.692	0.693	0.687	0.896	0.977	0.893	0.889
<b>Ps 7</b>	0.016	0.593	0.761	0.791	0.740	0.745	0.757	0.945	1.078	0.712	0.705
<b>Ps 8</b>	0.055	0.549	0.552	0.650	0.586	0.595	0.608	0.817	0.956	0.702	0.699
<b>Ps9</b>	0.040	0.349	0.553	0.588	0.578	0.706	0.716	0.724	0.929	0.660	0.658
<b>Ps 10 -1</b>	0.043	0.266	0.584	0.622	0.704	0.587	0.593	0.823	1.018	0.616	0.610
<b>Ps 10 -2</b>	0.063	0.643	0.549	0.576	0.637	0.640	0.645	0.633	1.068	0.618	0.611
<b>Ps 11</b>	0.023	0.205	0.326	0.694	0.824	0.687	0.699	0.913	1.079	0.710	0.704
<b>Ps 12</b>	0.018	0.073	0.231	0.543	0.682	0.657	0.668	0.912	1.022	0.838	0.832
<b>Ps 14</b>	0.34	0.62	0.415	0.575	0.508	0.491	0.500	0.487	0.813	0.602	0.597

## Résumé

Dix isolats nodulaires de *Pisum sativum* L. de la région de Semaoun (Wilaya de Bejaia) ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers l'étude des caractères cultureux, biochimiques et physiologiques. Les tests de tolérance aux stress abiotiques (salinité, pH et température) ont montré que la plupart des souches se développent en présence de 2% en NaCl, préfèrent les pH basiques et présentent une meilleure croissance entre 28°C et 32°C. La caractérisation symbiotique a révélé la formation de nodules chez 2 isolats (Ps9, Ps11). L'auxanogramme montre que tous les isolats assimilent les différents sucres testés. La plupart de nos souches sont apparues résistantes à différentes concentrations en Zn, Cd, et Pb et sont sensibles aux différents antibiotiques. La cinétique de croissance a montré que ces souches sont divisées en deux groupes, rhizobium à croissance rapide et rhizobium à croissance lente.

Mots clés : *Pisum sativum* L, rhizobium, caractérisation phénotypique, facteurs abiotiques.

## Abstract:

Ten nodular isolates of *Pisum sativum* L. from the Semaoun region (Wilaya de Bejaia) have been phenotypically characterized through the study of cultural, biochemical and physiological traits. Abiotic stress tolerance tests (salinity, pH and temperature) showed that most strains develop in the presence of 2% NaCl, prefer basic pH and show better growth between 28°C and 32°C. The symbiotic characterization revealed the formation of nodules in 2 isolates (Ps9, Ps11). The auxanogram shows that all the isolates assimilate the different tested sugars. Most of our strains have been shown to be resistant to different concentrations of Zn, Cd, and Pb and are sensitive to different antibiotics. Growth kinetics showed that these strains are divided into two groups, fast-growing rhizobium and slow-growing rhizobium.

Key words : *Pisum sativum* L, rhizobium, phenotypic characterization, Abiotic Factor.