

*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  
Spécialité : Microbiologie de l'Environnement



Réf : .....

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

**MASTER**

*Thème*

Etude de la tolérance aux stress abiotiques de  
bactéries nodulant la féverole

Présenté par : ABDERRAHIM Syla  
IMAKHLOUFENE Saida

Soutenu le : 13 /06/2016

Devant le jury composé de :

Mr. LADJOUZI R.	MAA	Président
Mr. BELHADI D.	MAA	Encadreur
Melle. BELHAMICHE N.	MAA	Examinatrice

**Année universitaire : 2015/2016**

# Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à :*

*Notre promoteur Mr BELHADJ Djellali, qui nous a permis de bénéficier de la qualité de son encadrement, les conseils qu'il nous a prodigué, la patience, la confiance qu'il nous a témoigné.*

*Nous tenons à remercier les membres de l'équipe de recherche du « laboratoire d'Ecologie Microbienne » de nous avoir accueillies au sein du laboratoire.*

*On remercie vivement, Mr R. LADJOUZI et Melle N. BELHAMICHE qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail.*

*Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant toutes nos années d'études.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin de quelque façons que ce soit, à la concrétisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je ne finirai ce travail qu'après avoir remercié Dieu qui m'a permis  
d'atteindre ce jour*

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma chère **maman** que j'aime énormément et qui m'a soutenu avec tous les  
moyens durant tout mon parcours et à qui je prie Dieu  
pour lui accorder santé et longue vie*

*A l'esprit de mon **père**, le destin a séparé entre nous et à qui je prie Dieu  
pour lui accorder leur pitié*

*A mon cher frère **Salah** et ma cher sœur **Samia** qui mon toujours aidé tout  
long de mon parcours*

*A mon Fiancé « **Farid** » qui ma soutenu pendant tout ce temps et à toute  
ma belle famille*

*A ma binôme « **Sylia** »*

*A toute ma famille et mes meilleur(e)s amis (es) sans exception*

*Ainsi qu'à tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leurs soutiens*

**SAIDA**

## *Dédicaces*

*Tout d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné le courage et la patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :*

*Mes très chers parents qui m'ont soutenus tout au long de ma vie*

*A mon frère et ma sœur : Mahmoud et Lina à qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur*

*A toute ma famille*

*A ma binôme « Saida »*

*A tous mes meilleur(e)s amis (es) qui me sont chers, à tous ce que j'aime et qui m'aiment : qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères,*

*Que dieu le tous puissant vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.*

*Sylia*



# **Sommaire**

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Synthèse bibliographique

I- Les légumineuses .....	4
II- Intérêts des légumineuses .....	4
II-1- Intérêts agronomiques et écologiques .....	4
II-2- Intérêts alimentaire et fourragère .....	5
II-3- Intérêts industriel et médical .....	5
III- <i>Vicia faba</i> .....	6
IV- Rhizobia .....	6
V- La symbiose Rhizobium-légumineuse .....	7
VI- Les paramètres abiotiques influençant le développement des rhizobiums .....	8
VI-1- La température .....	8
VI-2- Le pH .....	9
VI-3- La salinité .....	10
VI-4- Les métaux lourds.....	11
VI-5- Les antibiotiques .....	12
VI-6- Les pesticides.....	13

## Matériel et Méthodes

I- Matériel biologique.....	15
I-1- Souches bactériennes.....	15
II- Méthodes .....	15
II-1- Effet de la température sur la croissance.....	15
II-2- Effet des sels sur la croissance .....	15
II-2-1- Evaluation de l'effet des sels minéraux .....	15
II-2-2- Effet des métaux lourds sur la croissance.....	15

II-3- Résistance aux antibiotiques .....	16
II-4- Effet des pesticides sur la croissance des rhizobiums .....	17
II-5- Analyse statistique des données .....	18

## **Résultats et discussion**

I- Evaluation de l'effet de la température .....	19
II- Détermination de la tolérance aux sels minéraux .....	20
II-1- Tolérance au NaCl et au Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	20
II-2- Tolérance au KCl et au K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	21
II-3- Tolérance au MgCl <sub>2</sub> et au MgSO <sub>4</sub> .....	22
II-4- Profils de tolérance des souches de <i>Rhizobium sp.</i> aux différents sels .....	23
III- Etude de la sensibilité des rhizobiums aux métaux lourds .....	26
III-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices .....	28
IV- Détermination de la tolérance des <i>Rhizobium sp.</i> aux antibiotiques .....	30
V- Etude de la sensibilité des souches de <i>Rhizobium sp.</i> aux pesticides .....	32
V-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices .....	34
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	36

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste des abréviations

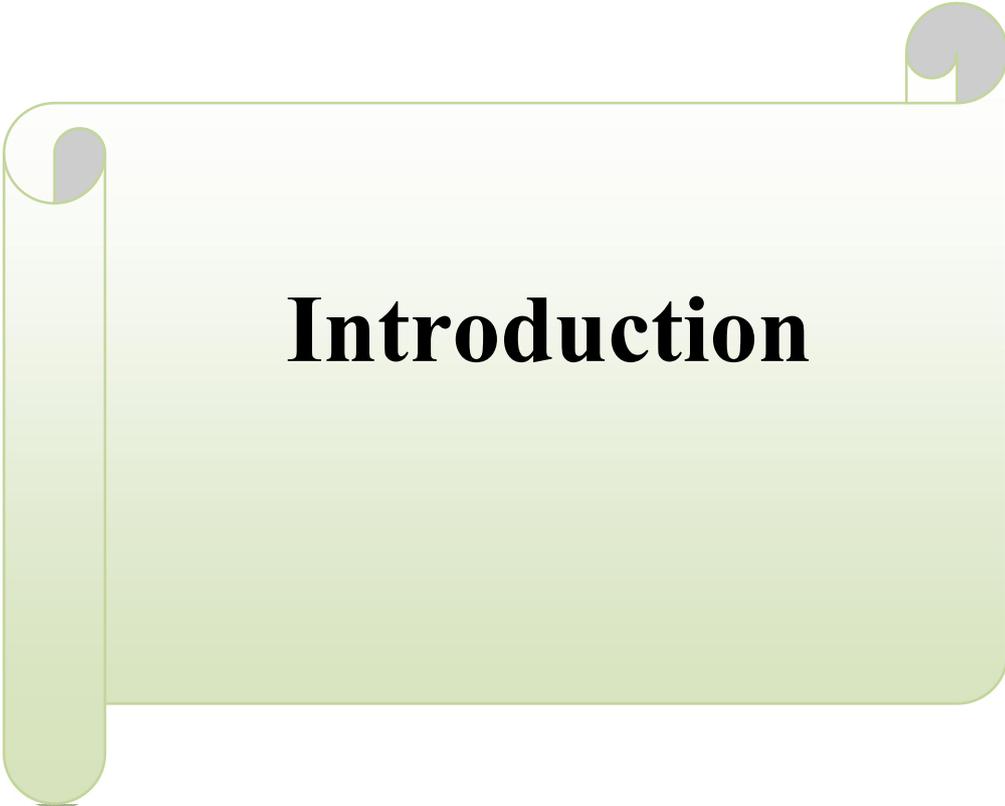
ADN	Acide désoxyribonucléique	FOX	Céfoxitine
AK	Amikacine	GEN	Gentamicine
AMC	Amoxicilline+Acide clavulanique	HPS	Heat protein shock
ATM	Aztréonam	LPS	Lipopolysaccharides
AX	Amoxicilline	NA	Acide Nalidixique
C	Concentration	ND	Non Déterminé
CAZ	Céftazidime	OX	Oxacilline
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice	P	Pénicilline
CTX	Céfotaxime	R	Résistant
CZ	Céfazoline	S	Sensible
E	Erythromycine	TE	Tétracycline
DO	Densité Optique	TIC	Ticarcilline
EPS	Exopolysaccharides	TOB	Tobramycine
ETP	Ertapénème	VA	Vancomycine
		YMA	Yeast Mannitol Agar
		YMB	Yeast Mannitol Broth

**Liste des figures**

<b>Figure N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Courbes de croissance des souches de <i>Rhizobium sp.</i> à différentes températures	19
<b>02</b>	Influence des différentes concentrations en sels de sodium sur la croissance des souches de <i>Rhizobium sp.</i>	21
<b>03</b>	Influence des différentes concentrations en sels de potassium sur la croissance des souches de <i>Rhizobium sp.</i>	22
<b>04</b>	Influence des différentes concentrations en sels de magnésium sur la croissance des souches de <i>Rhizobium sp.</i>	23
<b>05</b>	Courbes de croissance des différentes souches en présence de concentrations variables en sels minéraux	24-25
<b>06</b>	Pourcentage de résistance des souches aux différents antibiotiques	31
<b>07</b>	Photographies de développement de quelques souches en présence des différents pesticides	33

### Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Les antibiotiques testés et leurs diamètres critiques	17
<b>II</b>	Analyse de la variance	19
<b>III</b>	Variation de la tolérance aux métaux lourds	27
<b>IV</b>	Concentrations minimales inhibitrices	28
<b>V</b>	Profil de résistance des souches de rhizobiums aux différents antibiotiques	30
<b>VI</b>	Variation de la tolérance aux pesticides	32
<b>VII</b>	Concentrations minimales inhibitrices	35



# **Introduction**

## Introduction

L'augmentation croissante de la population dans le monde, la sécurité alimentaire, ainsi que l'augmentation des préoccupations environnementales et économiques associées à l'agriculture conventionnelle nécessitent le développement et l'adoption de pratiques alternatives de production alimentaire. La gestion durable de la fertilité des sols est une clé pour la production alimentaire sans compromettre la stabilité de l'environnement (Mothapo, 2011).

Depuis les années 1960, les rendements des grandes cultures ont augmenté régulièrement en particulier grâce à l'apport d'intrants (produits phytosanitaires, engrais et eau) et à l'introduction de variétés plus performantes et plus résistantes. Bien que cela ait permis de nourrir une population mondiale en expansion rapide, le coût environnemental n'a pas été pris en compte et les dégâts sur l'écosystème dus à l'agriculture intensive sont nombreux (pollution des nappes phréatiques, eutrophisation des eaux, etc.) (Zancarini, 2012).

La contamination des sols agricoles a diverses origines, mais elle reste généralement liée aux activités humaines avec l'utilisation des engrais comme les nitrates et les phosphates (Soussou, 2013).

Les légumineuses sont parmi les cultures les plus importantes dans le monde entier, ayant des impacts sur l'agriculture, l'environnement, l'alimentation animale, la nutrition humaine et la santé (Dita et *al.*, 2005).

Dans le bassin méditerranéen, la culture des plantes légumineuses occupe une place primordiale au niveau des agrosystèmes vu leurs intérêts agronomiques, économiques et nutritionnels qu'elles apportent via leur symbiose avec les rhizobia (Farissi et *al.*, 2014).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien (Chabbi, 2010). La fève est largement cultivée dans une gamme de conditions climatiques, allant de tempérées au subtropicales (Saadi, 2014).

L'adaptabilité et la productivité des légumineuses sont limitées par des stress abiotiques importants (Dita et *al.*, 2005). De même, les microorganismes du sol sont constamment en compétition avec les fluctuations de l'environnement telles que les carences en nutriments, le déficit hydrique, l'exposition à des hautes températures, l'acidité, les métaux lourds, l'osmolarité élevée et les hautes salinités (Figueira, 2005). Cependant, les souches de rhizobiums sont très sensibles aux facteurs environnementaux du sol, qui affectent leur capacité de fixer l'azote et par conséquent la productivité des légumineuses (Elsayed et *al.*, 2013).

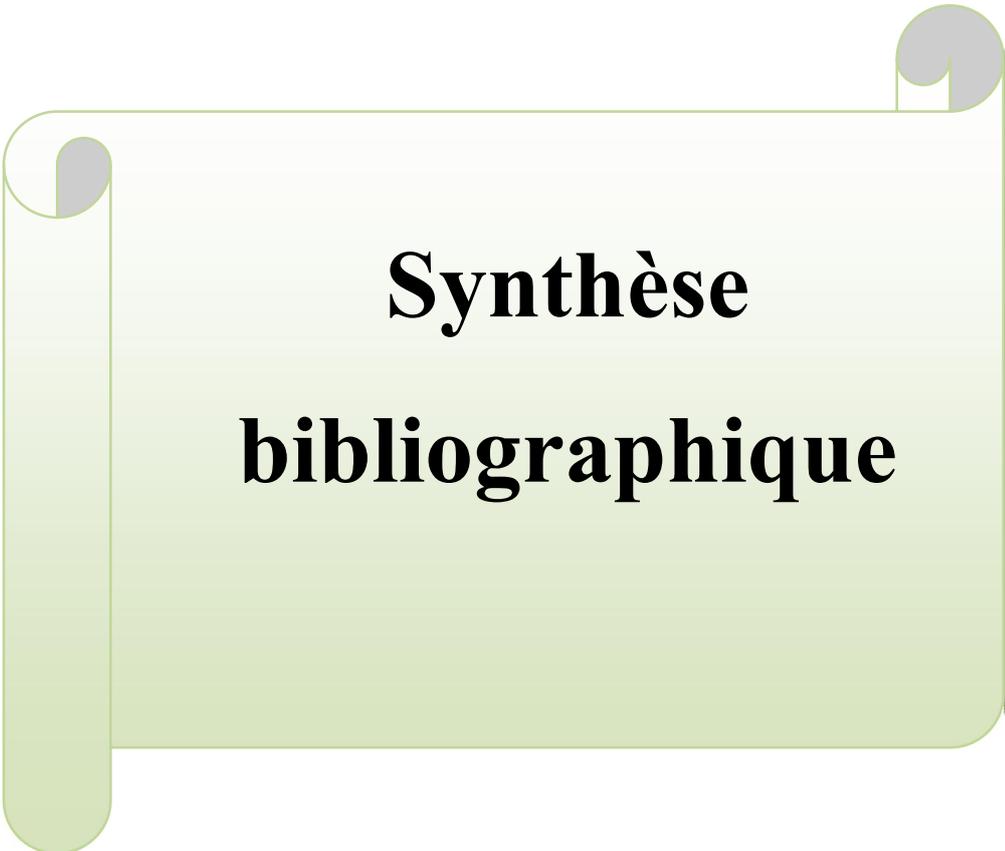
Le stress salin est l'un des facteurs les plus majeurs limitant la productivité agricole. Les effets nocifs du sel sur les plantes sont une conséquence d'un déficit hydrique, ayant pour résultat le stress osmotique et les effets des ions excessifs de sodium sur des processus biochimiques critiques (Elsayed et *al.*, 2013). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et aux activités industrielles et minières (Soussou, 2013).

Pour s'adapter à ces conditions défavorables, les microorganismes ont développé des mécanismes (altération de la perméabilité membranaire, production d'agents chélatants, mécanisme d'efflux...etc) afin de contrôler l'environnement et de modifier les profils d'expressions des gènes, l'activité enzymatique et le transport des protéines qui leur permettent de faire face aux nouvelles conditions environnementales (Figueira et *al.*, 2005).

La fève est une légumineuse capable de fixer l'azote en association endosymbiotique avec *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, qui améliore la fertilité du sol (Legesse et Assefa, 2014). Cette symbiose est le résultat d'un équilibre entre les facteurs environnementaux affectant la plante et les bactéries. Ainsi, le succès de l'infection et de la nodulation dépend des facteurs de l'environnement et de la survie des rhizobiums. Pour ces raisons, la tolérance du rhizobium à différents stress environnementaux est une propriété souhaitée pour une utilisation dans les sols appauvris en azote (Lebrazi et Benbrahim, 2014).

Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets des différents paramètres abiotiques sur le développement des rhizobiums à travers :

- L'étude de l'effet de la température sur la croissance des souches de rhizobiums ;
- L'étude de l'effet des sels (sels minéraux et sels métalliques) sur la croissance de ces souches ;
- L'étude de la résistance des souches de rhizobiums *vis-à-vis* de plusieurs familles d'antibiotiques ;
- L'étude de l'effet des pesticides sur la croissance de ces souches ;
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de dilution en milieu solide pour les métaux lourds et les pesticides.



**Synthèse**  
**bibliographique**

## **Synthèse bibliographique**

### **I- Les légumineuses**

Le mot «légumineuse» dérive du mot latin legumen, qui signifie semences récoltées dans les gousses. Leurs graines tombent généralement dans l'une des deux classes principales : celles où les substances principales de réserve sont les polysaccharides, habituellement l'amidon, et celles dans lesquelles les substances principales de réserve sont les graisses et souvent décrites comme des graines oléagineuses. Dans de nombreuses régions du monde, les grains de légumineuses sont également appelés "pulses", un mot dérivé du puls, terme latin qui signifie potage ou de la pâte. Ce dernier est le mot le plus couramment utilisé dans la plupart des pays anglo-saxons pour décrire les graines de légumineuses qui ont une faible teneur en matière grasse, telles que les haricots, les fèves, les pois ou les lentilles (Vasconcelos et Gomes, 2016).

### **II- Intérêts des légumineuses**

#### **II-1- Intérêts agronomique et écologique**

Les légumineuses peuvent fixer l'azote atmosphérique grâce à une interaction symbiotique avec les rhizobiums. De ce fait, elles sont en mesure de réduire l'azote atmosphérique en ammoniac permettant l'augmentation des valeurs protéiques du sol. A cause de cette capacité de fixer l'azote les légumineuses aident à stabiliser le sol et à prévenir l'érosion. Elles sont essentielles pour les écosystèmes et elles ont le potentiel de contribuer positivement à une agriculture durable (Vasconcelos et Gomes, 2016).

La fève est également un contribuant important pour la rotation des cultures et l'amélioration du sol, car elle peut fixer une quantité relativement importante d'azote (60 – 250 kg/ ha) (Hautsalo, 2013).

Dans les pays développés, la sur-utilisation des engrais chimiques azotés a conduit à une pollution des sols, des nappes phréatiques et des cours d'eau. De ce fait, la pollution par les nitrates est un problème réellement inquiétant, et la réintroduction des légumineuses s'avère être un bon moyen pour limiter cette pollution (Teggar, 2015).

## **II-2- Intérêts alimentaire et fourrage**

Les légumineuses sont des sources importantes de différents nutriments, comme les protéines, les minéraux, les lipides, les vitamines, l'amidon, le sucre et d'autres polysaccharides non amylacés (Vasconcelos et Gomes, 2016). Très souvent, elles représentent un complément nécessaire à d'autres sources de protéines (Duranti, 2006). En outre, les graines de légumineuse contiennent beaucoup de composés bioactifs et/ou anti-nutritionnels, tels que le phytate, les oligosaccharides, les composés phénoliques, les acides aminés non protéiques, les lectines et les inhibiteurs d'enzymes qui jouent des rôles métaboliques chez l'Homme ou les animaux qui consomment fréquemment ces graines (Sparvoli et *al.*, 2015).

Dans l'alimentation des animaux, elles peuvent être utilisées comme fourrage vert, matière sèche du fourrage, paille, tandis que certaines espèces peuvent être utilisées pour le pâturage. Elles peuvent réduire le lessivage des nitrates ainsi que le potentiel de réchauffement global des systèmes d'élevage (Vasconcelos et Gomes, 2016).

## **II-3- Intérêts industriel et médical**

En plus de leur utilisation traditionnelle comme alimentation et fourrage, les légumineuses peuvent être broyées en farine, utilisée dans la fabrication du pain, tortillas, chips, ou utilisées sous forme liquide pour produire du lait, du yaourt et d'autres formules infantiles. Elles sont également utilisées pour préparer des plastiques biodégradables, des huiles, des gommes, des colorants et des encres (Graham et Vance, 2003).

Les légumineuses sont également utilisées dans la médecine populaire. Les isoflavones contenus dans le soja et d'autres légumineuses sont suggérés dans la réduction des risques de cancer et dans la diminution du cholestérol dans le sérum. Les phytoestrogènes de soja et des aliments à base de soja ont été suggérés comme alternative dans la thérapie de remplacement des hormones chez les femmes post- ménopausiques (Graham et Vance, 2003).

La consommation des légumineuses est associée avec la physiologie et la santé. Elle joue un rôle dans la prévention des maladies cardio-vasculaires, l'obésité, le diabète et le cancer (Sparvoli et *al.*, 2015).

### III- *Vicia faba*

La fève n'était pas parmi les toutes premières récoltes domestiquées. Elle était probablement introduite dans l'agriculture vers la fin de la période Néolithique. Le centre d'origine était au Proche Orient, l'Irak et l'Iran et les centres secondaires ont évolué plus tard dans l'Afghanistan et l'Éthiopie. Avant 1000 AJC, la culture des fèves a été déjà établie en Europe. Les grandes graines sont d'origine récente et elles ont été probablement développées il y a 1000 - 1200 ans dans l'Est d'Irak, diffusées après en Asie, à travers l'Afrique du Nord vers Europe et éventuellement en Amérique (Link et *al.*, 2008).

La fève, comme une source importantes de protéines dans les secteurs arides des pays en voie de développement, très probablement influencée par le changement climatique, est réputée être parmi les espèces de légumineuses relativement sensibles au déficit hydrique. Elle est fortement sensible à l'irrigation, mais dans la plupart des régions de production, elle est rarement irriguée et dépend surtout de l'humidité stockée dans le sol et des précipitations pour sa croissance et son développement (Khasaei, 2014).

### IV- Rhizobia

Les Rhizobia sont habituellement définis en tant que bactéries du sol fixatrices d'azote, capables d'induire la formation des nodules racinaires ou de tiges sur les plantes légumineuses auxquelles l'azote atmosphérique est réduit en ammoniac au profit de la plante. Bien que la majorité de légumineuses forment la symbiose avec les membres des genres qui appartiennent à la classe Alphaproteobacteria (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *rhizobium* et *Sinorhizobium*), quelques légumineuses, telles que celles du grand genre *Mimosa*, sont nodulées par des membres de la classe Betaproteobacteria dont les genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Boakye et *al.*, 2016).

Les rhizobium sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Perry et *al.*, 2002). Ils sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches (Somasegaran et Hoben, 1994). Ils se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue lors d'une infection racinaire de la plante hôte (Perry et *al.*, 2002). Ce sont des bactéries chimioorganotrophes. Ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des

composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les rhizobiums sont des microorganismes aérobies qui fixent l'azote en conditions microaérophiles (Perry et *al.*, 2002). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, mais certaines souches comme *Rhizobium japonicum* tolèrent un milieu acide (pH = 4). La température idéale se situe entre 25-30°C. Ils se développent sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar), sur lequel les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides et peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles et sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

## **V- La symbiose rhizobium-légumineuse**

Le terme symbiose désigne l'ensemble des associations plus ou moins fortes s'établissant entre deux organismes différents vivant ensemble. Parmi ces associations, la plus importante est l'association symbiotique dans laquelle au moins l'une des deux espèces est bénéficiaire (Perry et *al.*, 2002).

La fixation de l'azote sur terre est le second plus important processus biochimique après la photosynthèse (Lakhal, 2011). Les légumineuses établissent une association symbiotique avec certaines bactéries Gram négatifs du sol, collectivement connues comme des rhizobium qui aident à fixer l'azote atmosphérique, afin d'obtenir des nutriments à partir de la plante et produire de l'azote par un processus appelé fixation biologique de l'azote (Sobti et *al.*, 2015), qui consiste en la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniacque en présence de la nitrogénase (Zahran, 1999).

L'interaction entre rhizobium et leur plante hôte est spécifique, la pénétration des rhizobiums dans leurs hôtes est strictement coordonnée et contrôlée (Pelmont, 1993). La plante ouvre le dialogue en exsudant des flavonoïdes qui activent les gènes de la nodulation de la bactérie. Cette activation provoque la synthèse d'une molécule signal de la nodulation (Lipo-chitoooligosaccharide) qui, à son tour, déclenche chez la plante des processus préparant la pénétration de la bactérie dans la racine (Ganry et Dommergues, 1995).

Les rhizobiums libèrent dans le milieu environnant de petites quantités de lipopolysaccharides (LPS) émanées de sa membrane externe. Ces LPS sont hétérogènes mais possèdent une spécificité structurale et antigénique en fonction de la souche. Ces derniers pénètrent dans les poils absorbants et contribuent à diriger la formation du canal infectieux (Pelmont, 1993).

Au stade final de l'infection, les bactéries subissent une différenciation en bactéroïdes et synthétisent la nitrogénase, enzyme catalyseur de la fixation de l'azote de l'air (Ganry et Dommergues, 1995).

Les conditions environnementales jouent un rôle essentiel dans le contrôle des interactions rhizobium-légumineuses. Elles peuvent affecter la croissance, la prolifération, le processus symbiotique et la fixation de l'azote par les rhizobiums en association avec les plantes légumineuses. Cette association mène à la tolérance aux conditions extrêmes de la salinité, l'alcalinité, l'acidité, la toxicité des métaux, la sécheresse et les engrais chimiques (Lebrazi et Benbrahim, 2014).

## **VI- Les paramètres abiotiques influençant le développement des rhizobiums**

### **VI-1- La température**

La température est l'un des facteurs principaux affectant la croissance des rhizobiums, leur survie dans le sol et le processus symbiotique. Les hautes températures (36, 40 et 42°C) altèrent également la composition de la surface cellulaire (EPS et LPS) (Yadav et Nehra, 2013) et engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversibles des enzymes (El hillali, 2006).

Les hautes températures induisent un changement dans la quantité des LPS secrétés et dans le profil électrophorétique des LPS et des protéines des souches de *Rhizobium sp.* résistantes à la chaleur (Nandal et *al.*, 2005).

## VI-2- Le pH

Le sol est un environnement complexe où le développement et la croissance des bactéries peuvent être influencés par différents facteurs édaphiques (Pereira et al., 2006). L'un des facteurs les plus importants qui affecte l'efficacité de la symbiose rhizobium-plante est le pH du sol dans lequel ils interagissent. La plante hôte semble être le facteur limitant pour la croissance des rhizobiums à des pH extrêmes ; la plupart des légumineuses ont besoin d'un sol neutre ou légèrement acide pour la croissance surtout quand elles dépendent de la fixation symbiotique de l'azote (Fox, 2005).

L'alcalinité du sol est l'un des problèmes les plus communs dans les régions arides et semi-arides, qui sont caractérisées par un pH élevé étendu entre 7,5 et 8,7 (Abd-allah, 2014).

L'acidité est beaucoup plus répandue que l'alcalinité dans plusieurs régions du monde. Face à l'acidité, les souches de rhizobium varient largement dans leurs tolérances (El hillali, 2006). Selon Zahran (1999), les souches de *Rhizobium loti* se développent à pH 4,5 contrairement aux souches de *Bradyrhizobium* qui ne se développent pas. Les souches de *Rhizobium loti* tolérantes à l'acidité montrent un avantage comparatif par rapport aux souches sensibles à l'acidité dans la capacité de noduler leurs légumineuses à pH 4,5.

Correa et al. (1997) ont observé que des souches de *Rhizobium loti* qui se développent lentement sont plus tolérantes à l'acidité, mais elles n'alcalinisent pas le milieu et que toutes les souches testées sont acidifiantes, suggérant que leur tolérance aux pH faibles n'est pas dépendante de l'excrétion des composés alcalinisant, mais de la présence d'autres facteurs tels que la température et la salinité, qui protègent la cellule contre l'action des concentrations extracellulaires élevées en protons.

## VI-3- La salinité

La salinité est un stress osmotique responsable d'importantes pertes de récolte dans le monde, particulièrement dans les sols semi-arides et dans le cas de l'agriculture irriguée (Abd-alla, 1992). Elle affecte la multiplication et la survie des rhizobiums dans le sol et la rhizosphère (Ben Khaled et al., 2003). Les sels de chlorure et de sulfate sont prédominants

dans les sols salins. La croissance des plantes, l'assimilation des nutriments, le métabolisme et la synthèse des protéines sont affectés sous les conditions du stress salin. Le retard dans la croissance des plantes provoque la diminution des rendements (Cordovilla et al., 1999).

Le stress salin est devenu une menace croissante à la production alimentaire, depuis que l'irrigation est considérée comme étant un problème majeur dans les champs agricoles suite à la salinisation progressive. Il réduit le potentiel hydrique, provoque le déséquilibre ionique ou la perturbation dans l'homéostasie et la toxicité des ions. Cette altération de l'état de l'eau mène à la réduction de croissance et la limitation de la productivité végétale. Puisque le stress salin implique le stress osmotique et ionique, la suppression de croissance est directement liée à la concentration totale des sels solubles ou au potentiel osmotique de l'eau de sol (Rabie et Almadini, 2005).

Certaines souches de rhizobiums ont la capacité de croître à des concentrations élevées (4 - 5%) en sel bien que, Bhattacharya et al. (2013) ont rapporté que les *Rhizobium sp.* isolés de *Pisum sativum* sont capables de se développer en présence de 1% en NaCl, mais incapables de se développer à des concentrations supérieures.

Les souches de rhizobiums à croissance rapide, productrices d'acides sont généralement plus tolérantes aux sels que les souches à croissance lente et alcalinisantes (Abdelmoumen et al., 1999).

La tolérance au sel varie selon le génotype du symbiote. Certaines hypothèses évoquent que certaines souches de rhizobiums pouvaient accroître la tolérance de la plante hôte à la salinité (Dommergues et al., 1998).

Les cellules de rhizobiums exposées aux concentrations élevées en sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'ectoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence des cellules et de limiter les dégâts causés par le sel (El hillali, 2006).

Chez les bactéries, il est probable que les solutés compatibles exercent leurs effets à deux niveaux. Tout d'abord, il a été bien établi que les solutés peuvent interagir avec les protéines en présence de concentrations élevées en sels et de stabiliser leur conformation,

ce qui conduit à la restauration de l'activité. Le second effet des solutés compatibles est que leur accumulation par la cellule mène à la libération des ions de potassium et l'abaissement de la force ionique cytoplasmique. Ainsi, il existe une synergie entre l'effet direct de la bétaine ou la proline sur la structure des protéines et l'effet indirect de la réduction de la force ionique (Abdelmoumen *et al.*, 1999).

#### **VI-4- Les métaux lourds**

Les métaux lourds sont connus pour être des polluants inorganiques importants qui persistent dans le sol pendant de longues périodes, et qui ont un effet ecotoxicologique pour les plantes et les microorganismes du sol (Lebrazi et Benbrahim, 2014). Ils sont largement utilisés dans des domaines très variés : Dans l'agriculture à travers l'utilisation des pesticides et des fertilisants. En industrie, comme c'est le cas de l'usage du plomb dans la fabrication des accumulateurs ou dans la médecine, ou le mercure et ses sels organiques comme antiseptiques dans les hôpitaux. Les rejets de ces métaux lourds provoquent une pollution croissante de l'environnement (Khebbat, 1994).

Certains métaux tels que le Zn, Cu, Ni et Cr sont des micronutriments essentiels ou bénéfiques pour les plantes, les animaux et les microorganismes (Pereira *et al.*, 2006), mais à de fortes concentrations ils peuvent être toxiques (Bruins *et al.*, 1999). D'autres métaux lourds tels que le Cd, Hg et Pb n'ont aucune fonction biologique et physiologique connue, et peuvent être toxiques à des concentrations relativement basses (Pereira *et al.*, 2006).

Il a été rapporté que les métaux lourds influencent défavorablement sur les microorganismes en affectant leur croissance, leur morphologie et leurs activités y compris la fixation symbiotique de l'azote (Pereira *et al.*, 2006). C'est le cas du mercure qui est toxique car il inactive les thiols essentiels qui font parties des enzymes et des protéines. (Bruins *et al.*, 2000).

Le cadmium étant un métal non essentiel qui est toxique à des concentrations faibles se trouve dans la biosphère à des concentrations de 0,01 à 1,8 ppm et il est souvent associés aux minerais de zinc (Bruins *et al.*, 2000).

Les mécanismes de tolérance des bactéries aux métaux lourds sont très divers, et peuvent impliquer un efflux du métal énergie dépendant, la précipitation des métaux en tant que sels insolubles, l'altération de la perméabilité membranaire aux métaux, l'immobilisation du métal à l'intérieur de la paroi cellulaire, la production d'agent chélatant et la transformation biochimique des ions métalliques (Figueira et *al.*, 2005).

#### **VI-5- Les antibiotiques**

La rhizosphère contient un mélange de populations microbiennes métaboliquement actives qui rentrent en compétition dans cet environnement par rapport à la taille, à la diversité et à l'activité biochimique. Généralement, les antibiotiques sont utilisés pour traiter les maladies des animaux et pour favoriser leur croissance (Naamala et *al.*, 2016).

La majorité des antibiotiques utilisés sont excrétés dans la matière fécale et les urines. Ils persistent et s'accumulent dans les sols après applications répétées d'engrais. Cela peut affecter l'innocuité et l'efficacité symbiotique des rhizobiums (Naamala et *al.*, 2016). Regrettablement, l'utilisation de ces antibiotiques est accompagnée par l'apparence rapide des souches résistantes (Davies et Davies, 2010).

L'évaluation de la résistance intrinsèque aux antibiotiques des rhizobiums de pois chiche a montré que la plupart des isolats examinés (65%) ont une haute résistance à la Kanamycine, à l'acide nalidixique et à l'érythromycine. En présence de l'ampicilline, le chloramphenicol, la rifamycine, la spectinomycine, la streptomycine ou la tétracycline, seuls 14 à 25% (selon l'antibiotique) d'isolats étaient résistants (Maatallah et *al.*, 2002).

Selon Abera et *al.* (2015), l'effet de différentes concentrations en antibiotique sur quatre souches de rhizobium (Deux de *Vicia faba* et deux de soja), révèlent une différence dans leur survie, leur persistance et leur compétitivité.

Le mode d'action des antibiotiques contre des bactéries dépend de la composition chimique de l'antibiotique et de la morphologie de la cellule bactérienne (Milicic et *al.*, 2006).

Les mécanismes de résistance des rhizobiums aux antibiotiques peuvent être actifs ou passifs. La résistance passive n'est pas directement mise en place pour résister à un antibiotique ou à une classe particulière d'antibiotiques (processus adaptatifs généraux, tel que la présence des barrières spécifiques sur la membrane externe des bactéries Gram

négatives). La résistance active implique trois principaux mécanismes ; la modification des sites de la cible, l'efflux actif de l'agent antimicrobien et de la modification enzymatique/dégradation de l'agent antimicrobien. Tous les mécanismes actifs exigent des changements de leur programmation génétique en réponse à la présence des agents antibiotiques (Naamala et al., 2016).

#### **VI-6- Les pesticides**

L'utilisation des pesticides est efficace pour la protection des plantes contre les ravageurs, mais leur utilisation intensive a entraîné la perturbation du système biologique naturel. Certains pesticides utilisés dans l'agriculture peuvent être nocifs pour les bactéries fixatrices d'azote. La quantité des pesticides appliqués atteignant l'organisme cible est de 0,1%, tandis que la quantité restante affecte le sol (Gulhane et al., 2015).

Une fois appliqué au sol, au feuillage des plantes ou directement sur les graines, les pesticides peuvent rentrer dans le sol par l'application directe ou par l'intermédiaire des exsudats racinaires des plantes. Cette entrée des pesticides peut affecter beaucoup d'organismes du sol par différentes façons. Quelques bactéries du sol peuvent tolérer ou dégrader quelques pesticides et les utiliser en tant que source unique de carbone ou d'azote. Des effets bactériostatiques et létaux peuvent également se produire (Drouin et al., 2010) en endommageant l'ADN, les protéines, la membrane et en provoquant l'oxydation des molécules (Ahemad et Khan, 2011).

Les effets phytotoxiques de divers herbicides sur les légumineuses dont les petits pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), les lentilles (*Lens esculentus*) et la féverole (*Vicia faba*) ont été rapportés. La gravité de ces effets dépend du type et de la concentration des herbicides, de l'espèce de rhizobium et du génotype de la plante (Ahemad et Khan, 2009). Cependant, les rapports des effets des herbicides sur les légumineuses et ses symbiotes (rhizobium) sont contradictoires ; une réduction significative de la croissance des rhizobiums a été observée pour certains herbicides, tandis que l'augmentation de la dose d'herbicides sur le terrain n'a pas influencée la croissance des rhizobiums, mais réduit la capacité ultérieure des rhizobiums de former des nodules. La croissance des rhizobiums est seulement un aspect de la symbiose, qui dépend aussi de la formation, la croissance et la fonction des nodules, tous ces processus peuvent être affectés par les applications d'herbicides (Ahemad et Khan, 2009).

Les études effectuées sur des isolats de rhizobiums de soja ont rapporté que les herbicides induisent une réduction de la nodulation pouvant être le résultat indirect des dommages causés sur la plante, par l'action direct de l'herbicide sur les rhizobiums ou bien la réduction peut résulter de l'action sur les deux partenaires symbiotiques (Shankar et *al.*, 2012).

Il a été rapporté que plusieurs fongicides testés (Captan, Carboxine, Folpet, etc.) étaient si toxiques aux rhizobiums et que l'utilisation des fongicides doit avoir un impact significatif sur la pratique agricole, ainsi il a été observé que la carboxine n'a pas réduit la croissance des rhizobiums (Castro et *al.*, 1997).



**Matériel**  
**et**  
**Méthodes**

## Matériel et Méthodes

### I- Matériel biologique

#### I-1- Souches bactériennes

Onze souches de *Rhizobium sp.* appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne sont utilisées dans cette étude. Ces souches (AKE1, AM11R, EA2, EB1, EC6, ES8, MEK6, MT2, UE28, UM2 et la souche de référence RLV) proviennent de différentes régions de Bejaia et sont isolées à partir des nodules de *Vicia faba*. Elles sont repiquées sur milieu YMA (Annexe 01) incliné en vue de revivification et incubées à 28°C.

### II- Méthodes

#### II-1- Effet de la température sur la croissance

L'évaluation de la tolérance à la température est réalisée sur milieu YMB (Annexe 01) repartit dans des tubes à essai à raison de 4ml. Chaque tube estensemencé avec 40µl d'une préculture obtenue sur YMB et ayant une DO ( $\lambda= 620\text{nm}$ ) de 0,1. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement. Après incubation aux températures choisies (26, 28, 30, 32, 34 et 36°C) pendant 72 heures, la croissance est évaluée par mesure de la densité optique à 620nm.

#### II-2- Effet des sels sur la croissance

##### II-2-1- Evaluation de l'effet des sels minéraux

L'effet du NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> et MgSO<sub>4</sub> sur la croissance des différentes souches est évalué sur milieu YMB, repartit dans des tubes à essai à raison de 4ml. Les différents sels sont testés à des concentrations de 50mM, 100mM, 150mM et 200mM. Pour chaque souche, trois tubes de chaque concentration sontensemencés avec 30µl d'une préculture obtenue sur YMB et ayant une DO de 0,1 à 620nm. Après incubation à 28°C pendant 72 heures, l'effet des différents sels a été évalué par mesure de la DO à 620nm.

## II-2-2- Effet des métaux lourds sur la croissance

L'évaluation de l'effet des sels métalliques sur la croissance des différentes souches de *Rhizobium sp.* est réalisée sur milieu YMA. Cinq sels métalliques à savoir, le sulfate de Zinc ( $ZnSO_4$ ), l'acétate de plomb ( $Pb(OOCCH_3)_2$ ), le sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ ), le sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ) et le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) sont testés à différentes concentrations.

Les concentrations en sels métalliques des solutions mères utilisées sont les suivantes :

- $ZnSO_4/7H_2O$  : 0,5g/ml
- $Pb(OOCH_3)_2/3H_2O$  : 0,1g/ml
- $CuSO_4/5H_2O$  : 0,25g/ml
- $CdSO_4/8H_2O$  : 0,1g/ml
- $AlCl_3/6H_2O$  : 0,5g /ml

A partir de ces solutions, des volumes définis de chaque solution sont prélevés et additionnés au milieu YMA pour obtenir les différentes concentrations à tester.

L'ensemencement est réalisé sous forme de spots de 10 $\mu$ l à partir d'une préculture d'une densité optique de 0,1 à 620nm. Trois dépôts sont effectués pour chaque concentration et chaque souche. Après incubation à 28°C pendant 72 heures, la croissance est évaluée par l'apparition de colonies sur le milieu. Les concentrations minimales inhibitrices sont ensuite déterminées pour chaque sel métallique.

## II-3- Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des souches de *Rhizobium* aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose YMA.

Après avoir coulé la gélose et après solidification, les boîtes sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une préculture d'une densité optique de 0,1 à 620nm.

Après séchage, des disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose. Ainsi, 18 antibiotiques dont les charges et les diamètres critiques sont représentés dans le tableau I sont testés. Après incubation à 28°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés. La sensibilité aux différents antibiotiques testés est déterminée

selon les recommandations établies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (1997).

**Tableau I** : Les antibiotiques testés et leurs diamètres critiques

Antibiotiques	Symboles	Charges	Diamètres critiques		Familles
			Sensible(S)	Résistant(R)	
Acide Nalidixique	NA	30 µg	≥ 20	<15	Fluoroquinolones
Amikacine	AK	10 µg	≥ 17	< 15	Aminoglycosides
Amoxicilline	AX	25 µg	≥ 21	< 14	Pénicillines
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	30 µg	≥ 21	< 14	Pénicillines
Aztréonam	ATM	30 µg	≥ 23	< 17	Monobactames
Céfazoline	CZ	30 µg	≥ 12	< 18	Céphalosporines
Céfotaxime	CTX	30 µg	≥ 21	< 15	Céphalosporines
Céfoxitine	FOX	30 µg	≥ 22	<15	Céphalosporines
Céftazidime	CAZ	30 µg	≥ 21	<15	Céphalosporines
Ertapénème	ETP	10 µg	≥ 23	< 20	Carbapénèmes
Erythromycine	E	15 µg	≥ 22	< 17	Macrolides, Lincosamides et Streptogramines
Gentamicine	GEN	10 µg	≥ 16	< 14	Aminoglycosides
Oxacilline	OX	1 µg	≥ 20	< 20	Pénicillines
Pénicilline	P	10 U	≥ 29	< 8	Pénicillines
Tétracycline	TE	30 µg	≥ 19	< 17	Tétracyclines
Ticarcilline	TIC	75 µg	≥ 22	< 18	Pénicillines
Tobramycine	TOB	10 µg	≥ 17	< 15	Aminoglycosides
Vancomycine	VA	30 µg	≥ 17	< 17	Glycopeptides

#### II-4- Effet des pesticides sur la croissance des rhizobiums

L'évaluation de l'effet des pesticides sur la croissance des différentes souches de *Rhizobium sp.* est réalisée sur milieu YMA. Cinq pesticides dont, deux fongicides (AGRIVIL 100g/l, ARDAVO 720g/l), deux acaricides (BYE-BYE 200g/l, RIVAfol 480g/l) et un insecticide (DURSBAN 480g/l) sont testés.

Un essai préliminaire en utilisant des concentrations de l'ordre de 25, 50, 75 et 100µg/ml (Ben-Gweirif et *al.*, 2005) a été réalisé. Sur la base des résultats obtenus,

d'autres concentrations à savoir 100, 150, 200 et 250 $\mu$ g/ml sont testées. L'ensemencement est réalisé sous forme de spots de 10 $\mu$ l à partir d'une préculture d'une densité optique de 0,1 à 620nm. Trois dépôts sont effectués pour chaque concentration et chaque souche. Après incubation à 28C°/24h, toute croissance sur milieu indique la tolérance au pesticide correspondant. En se basant sur la présence ou l'absence de la croissance, les CMI sont ainsi déterminées.

## **II-5- Analyse statistique des données**

Les résultats obtenus avec les différents tests sont regroupés dans une matrice puis ont fait l'objet d'une analyse de la variance sous XLSTAT (version 2009.1.02) pour déterminer l'influence des différents paramètres sur la croissance des souches retenues.



**Résultats**  
**et**  
**Discussion**

## Résultats et discussion

### I- Evaluation de l'effet de la température

La majorité des souches que nous avons étudiées présentent un optimum de croissance situé entre 26°C et 30°C (Figure 01). Au delà de cette gamme, on remarque que la croissance des souches EB1, EC6 et ES8 reste stable jusqu'à 34°C puis diminue progressivement. Il y a lieu de signaler que la croissance de ces souches est plus importante que celles des autres souches aux différentes températures testées. A l'exception de la souche MT2 qui présente une croissance faible mais stable, les souches AM11R, EA2, AKE1, UE28, MEK6 ainsi que la souche de référence RLV sont très affectées par les températures à 32°C puisque leurs charges finales sont inférieures à la charge initiale.

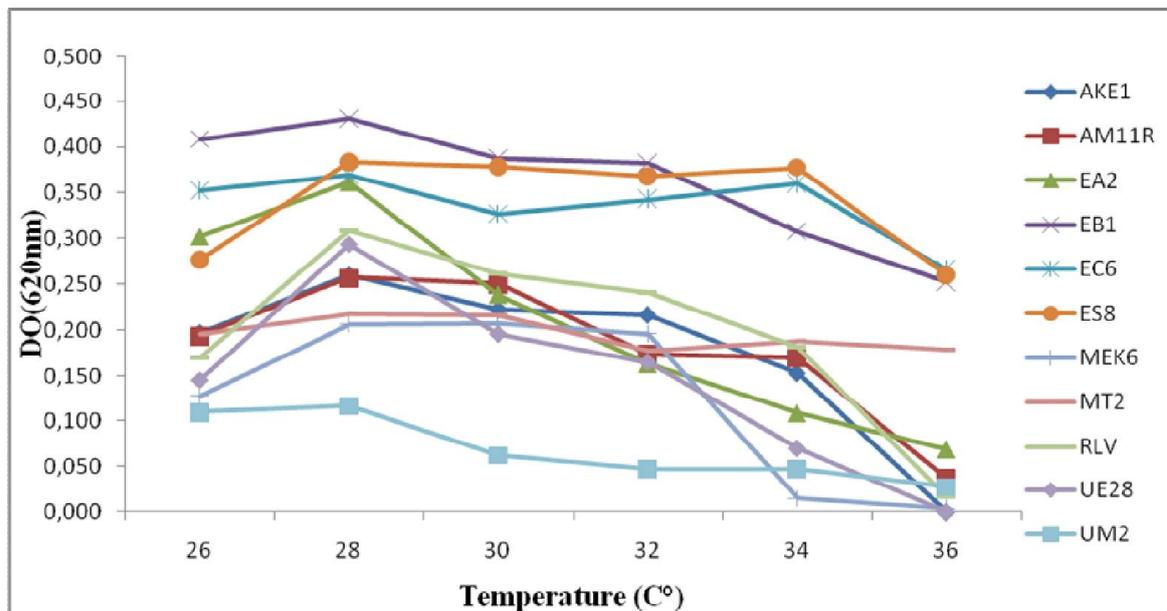


Figure 01 : Courbes de croissance des souches de *Rhizobium sp.* à différentes températures

L'analyse de la variance montre que la température a un effet très significatif ( $p < 0,05$ ) sur la croissance des souches (Tableau II).

Tableau II : Analyse de la variance

T °C	26	28	30	32	34	36
F	38,432	77,042	27,387	33,269	57,198	92,5
P- value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

D'après Gauri et *al.* (2011), la majorité des souches isolées de *Trifolium alexandrinum* ont la capacité de croître à 36°C, tandis que certaines souches survivent à 38°C. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les souches EB1, EC6, ES8 et MT2. Selon Yadav et Nehra (2013), la tolérance aux hautes températures serait due à un changement de la quantité des EPS au niveau de la surface cellulaire et à l'induction de la synthèse des protéines appartenant à un groupe spécifique de lipopeptides connus comme des protéines de choc thermique (HSPs). Toutefois, trois protéines de choc thermique (106.9, 83.1, 59.5 KDa) ont été rapportées pour être produites et accumulées par différentes espèces de rhizobiums (Nandal et *al.*, 2005).

## **II- Détermination de la tolérance aux sels minéraux**

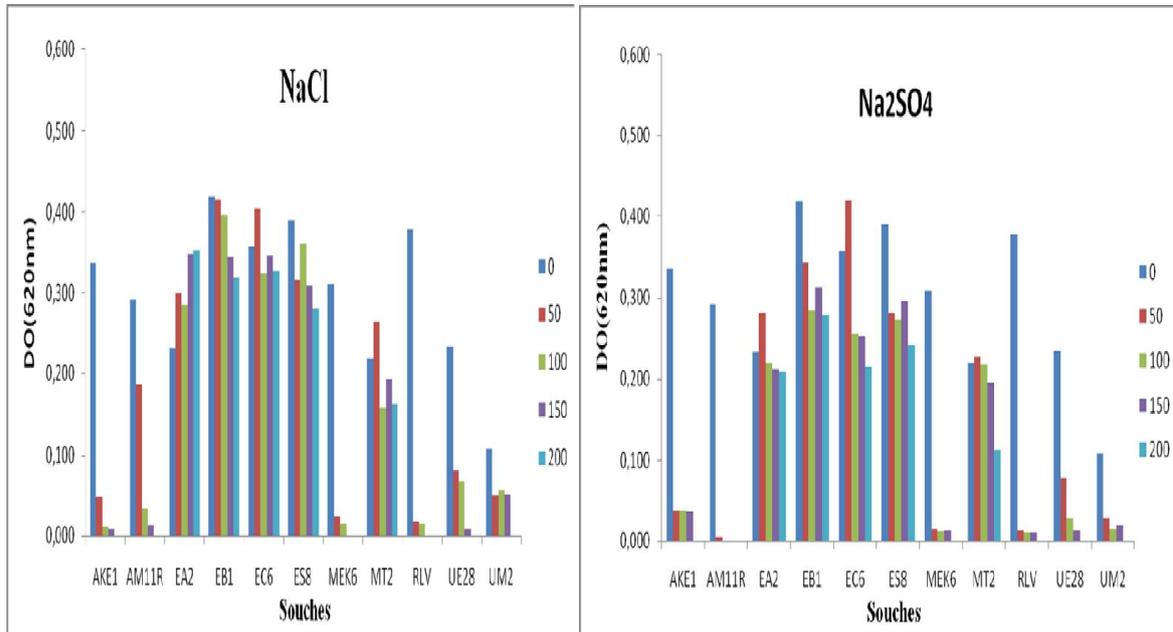
### **II-1- Tolérance au NaCl et au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

L'évaluation de la tolérance des souches de *Rhizobium* en présence de chlorure de sodium révèle que la plupart des souches sont sensibles aux différentes concentrations testées. Les souches EA2, EB1, EC6, ES8 et MT2 présentent une bonne croissance en présence des différentes concentrations en NaCl (Figure 02). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Elsayed et *al.* (2013) sur des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Abdelmoumen et *al.* (1999) ont rapporté que certaines souches de rhizobium isolées à partir de *Trigonella* tolèrent jusqu'à 4% (684 mM) et d'autres tolèrent 12% (2052 mM) en NaCl. Les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ont été rapportées pour être tolérantes aux concentrations supérieures à 350 mM en NaCl (Zahran, 1999).

Les résultats présentés dans la figure 02 résument la tolérance des souches au sulfate de sodium. On constate que la moitié des souches sont influencées par l'augmentation de la concentration en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, toutefois, elles présentent une croissance comparable à celle de la souche de référence RLV. Les souches EA2, EB1, EC6, ES8 et MT2 présentent une bonne croissance en présence des différentes concentrations en sel. L'optimum de croissance est obtenu à 0mM (YMB) pour les souches EB1 et ES8 tandis qu'il est de 50 mM pour les souches EA2, EC6 et MT2.

Les effets du NaCl et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sur l'ensemble des souches apparaissent similaires. Le même constat a été rapporté par Abdelmoumen et al. (1999) sur des souches de rhizobium isolés de différentes espèces de légumineuses.



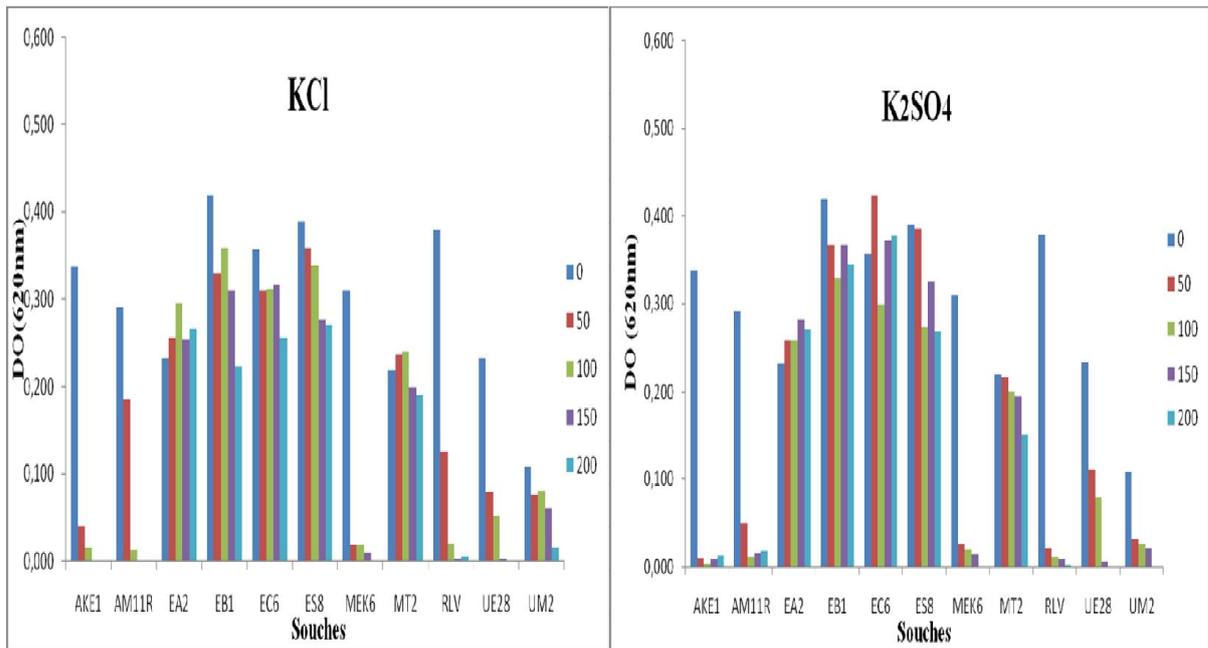
**Figure 02** : Influence des différentes concentrations en sels de sodium sur la croissance des souches de *Rhizobium sp.*

## II-2- Tolérance au KCl et au K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Les résultats du test de tolérance au chlorure de potassium montrent que les différentes souches présentent une variation dans leur sensibilité (figure 03).

Les souches EB1, EC6, ES8 et EA2 présentent la meilleure tolérance avec une croissance observée sur les différentes concentrations testées, toutefois, les souches EA2 et MT2 présentent une tolérance modérée. Les souches AKE1, AM11R, MEK6, UE28, UM2 ainsi que la souche de référence sont très sensibles.

Le suivi de l'évolution de la croissance en fonction des concentrations en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (figure 03) montre que les souches EB1, EC6 et ES8 présentent la meilleure tolérance avec une croissance observée sur les différentes concentrations testées. Les souches EA2 et MT2 présentent une tolérance modérée et se développent jusqu'à 200 mM de KCl, alors que les souches AKE1, AM11R, MEK6, RLV, UE28 et UM2 sont les moins tolérantes.



**Figure 03** : Influence des différentes concentrations en sels de potassium sur la croissance des souches de *Rhizobium sp.*

En comparant la croissance des différentes souches en présence de ces quatre sels, on constate que le profil de tolérance observé est identique. Les souches EA2, EB1, EC6, ES8 et MT2 présentent une bonne croissance en présence de chacun de ces sels et aux différentes concentrations testées.

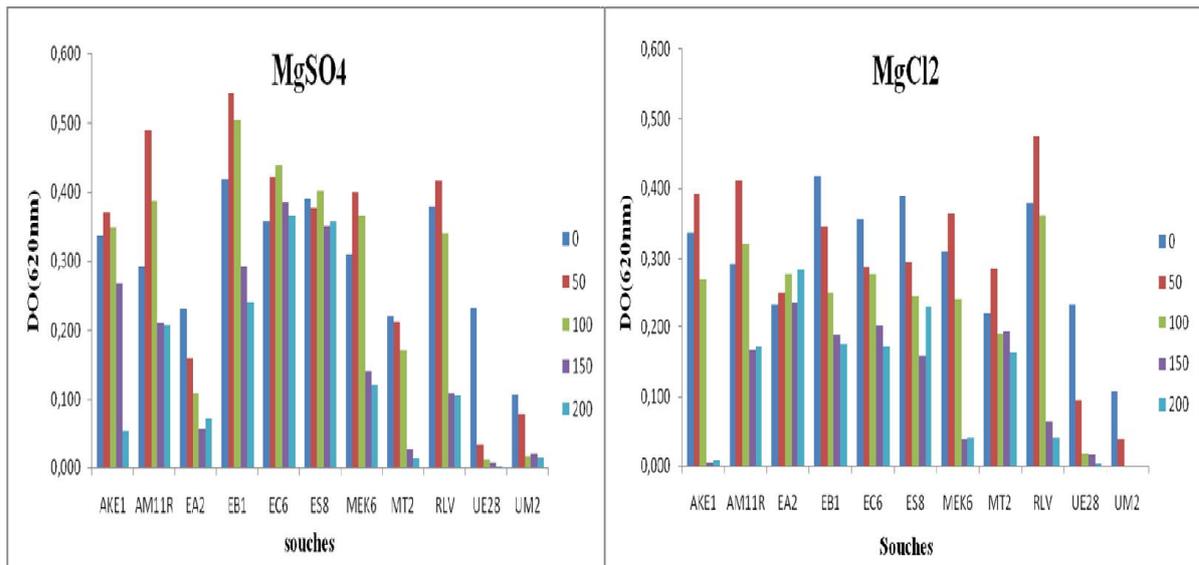
### II-3- Tolérance au MgCl<sub>2</sub> et au MgSO<sub>4</sub>

La figure 04 montre que la plupart des souches présentent une bonne croissance de MgCl<sub>2</sub> ou MgSO<sub>4</sub>. Les optima de croissance sont observés à 0 et 50mM pour la plupart des souches dans le cas MgCl<sub>2</sub> tandis que, dans le cas MgSO<sub>4</sub>, ils sont observés à 50 et 100mM. Les souches UE28 et UM2 présentent une faible croissance dans le cas des deux sels.

Le test de corrélation montre que le MgCl<sub>2</sub> n'a pas d'effet sur la croissance aux concentrations 50 et 100 mM. Son effet n'apparaît qu'aux concentrations élevées.

L'importance de l'effet inhibiteur du MgCl<sub>2</sub> comparé à celui de MgSO<sub>4</sub> serait liée à la toxicité des chlorures par rapport aux sulfates.

Elsheikh et Wood (1989) ont rapporté que la croissance des rhizobiums n'est pas affectée par 1,5% des différents sels comme :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (105,6 mM),  $\text{NaCl}$  (256,63 mM),  $\text{MgSO}_4$  (124,61mM),  $\text{MgCl}_2$ (157,54 mM),  $\text{K}_2\text{SO}_4$ (86,07mM) et  $\text{KCl}$  (201,2 mM), mais leur croissance est inhibée par tous ces sels à des concentrations allant de 2,5 à 3,5 sauf dans le cas du  $\text{MgSO}_4$  ou un développement important est observé à 3,5% (Abdelmoumen et al., 1999).



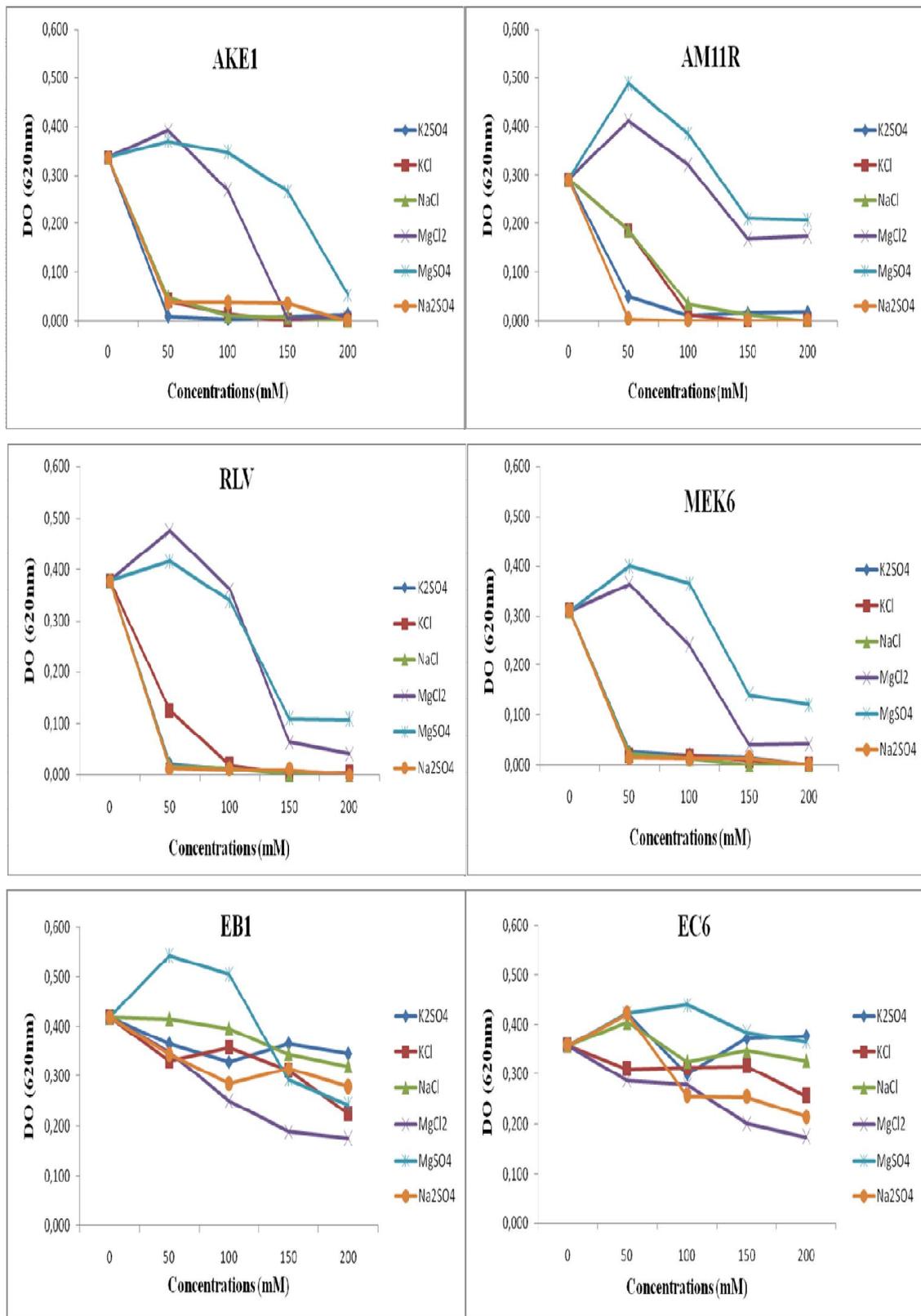
**Figure 04** : Influence des différentes concentrations en sels de magnésium sur la croissance des souches de *Rhizobium sp.*

#### II-4- Profils de tolérance des souches de *Rhizobium sp.* aux différents sels

La comparaison des profils de croissance des différents souches montre que les souches AKE1, AM11R et MEK6 présentent un profil semblable à celui de la souche de référence RLV avec une tolérance importante pour le  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{MgCl}_2$  (figure 05).

A l'exception des souches UE28 et UM2 qui sont très affectées par les différents sels et par toutes les concentrations testées, les autres souches présentent une bonne tolérance en présence de la plupart des sels.

La souche EA2 présente une meilleure tolérance pour le  $\text{NaCl}$  que pour les autres sels puisque sa croissance augmente avec l'augmentation de la concentration. Elle est par contre très affectée par le  $\text{MgSO}_4$  tout comme les souches MT2 et UE28.



**Figure 05 :** Courbes de croissance des différentes souches en présence de concentrations variables en sels minéraux

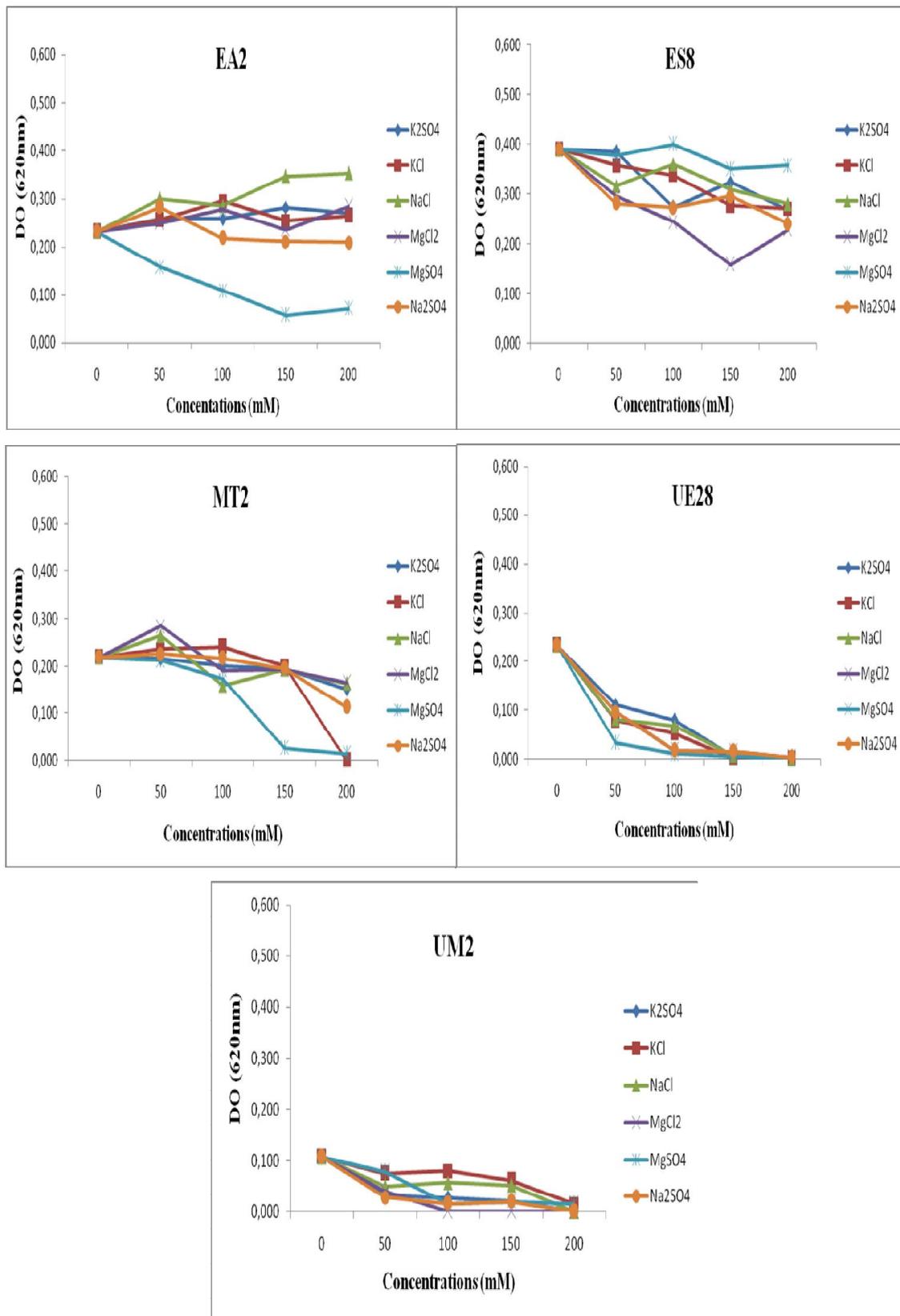


Figure 05 : Courbes de croissance des différentes souches en présence de concentrations variables en sels minéraux (suite)

Une variabilité dans la tolérance a été marquée pour l'ensemble des souches testées en présence de différents sels à différentes concentrations. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ventorino *et al.* (2012), qui a conclu que même les espèces d'un même genre pourraient avoir une tolérance différente au stress salin.

Les rhizobiums peuvent utiliser des mécanismes distincts pour l'adaptation osmotique au stress salin tels que l'accumulation des solutés organiques à bas poids moléculaire (Osmolytes), incluant les amino-acides tels que le glutamate, le N-acetylglutamyl, la glutamine, les sucres et les polyamines ou l'accumulation des ions (K<sup>+</sup>) (Zahran, 1999).

D'autres mécanismes tels que le changement de la structure des EPS et des LPS, la modification de la morphologie et de la taille des cellules et le changement au niveau de l'expression des gènes sont également observés (Ventorino *et al.*, 2012 ; Lopez- Gomez *et al.*, 2013).

### **III- Etude de la sensibilité des rhizobiums aux métaux lourds**

L'étude de la sensibilité des souches de rhizobium en présence des différents métaux montre que la plupart des souches se développent sur toutes les concentrations testées « Tableau III ». Toutefois, elles présentent des différences au niveau de l'importance de leur développement sur le milieu de culture et la variation de l'aspect mucoïdale, lié à la production des exopolysaccharides. Cette dernière diminue avec l'augmentation de la concentration en métaux lourds.

En présence du zinc, la souche MEK6 ne présente aucun développement même aux plus faibles concentrations « Tableau III ».

En ce qui concerne le Plomb, toutes les souches présentent une croissance même aux concentrations les plus élevées (2400 µg/ml). Les souches EB1, EC6 et ES8 présentent une croissance assez importante à la concentration 400 µg/ml (Tableau III).

Dans le cas du cuivre, la plupart des souches présentent une faible tolérance aux concentrations testées, contrairement au Cd, où les souches présentent une tolérance assez importante allant de 6,25 à 100 µg/ml. Les souches MT2, EA2 présentent une bonne croissance à la concentration 25 µg/ml (Tableau III).

Les résultats représentés dans le tableau III montrent que toutes les souches se développent aux différentes concentrations testées mais présentent une faible croissance comparée à celle observée en présence des autres métaux.

Tableau III : Variation de la tolérance aux métaux lourds

Métaux lourds	Concentrations	AKE1	AM11R	EA2	EB1	EC6	ES8	MEK6	MT2	RLV	UE28	UM2
Zinc	50	+	+	++	++	+++	+++	-	++	+++	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	500	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Pb	400	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cu	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Al	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cd	6,25	+	++	+++	+	+	+	++	+++	++	++	+
	12,5	+	++	+++	+	+	+	++	+++	++	+	+
	25	+	++	++	+	+	+	++	++	++	+	+
	50	+	++	+	+	+	+	++	+	++	+	+
	75	+	++	+	+	+	+	++	+	++	+	+
	100	+	++	+	+	+	+	++	+	++	+	+

### III-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de la tolérance aux métaux lourds nous ont permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (tableau IV). Celles-ci présentent une variabilité entre les souches et entre les métaux lourds testés.

La concentration minimale inhibitrice la plus élevée a été observée dans le cas de plomb, elle est supérieure à 2400 µg/ml pour toutes les souches, alors qu'une faible concentration minimale inhibitrice a été observée dans le cas de zinc pour la souche MEK6. Une CMI supérieure à 500 µg/ml a été observée chez toutes les souches testées en présence de zinc, cuivre et l'aluminium.

**Tableau IV:** Concentrations minimales inhibitrices

Souches métaux	AM11R	MEK6	RLV	UE28	UM2	AKE1	EA2	EB1	EC6	ES8	MT2
<b>Zn</b>	>500	50	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
<b>Cu</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>Cd</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>Pb</b>	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400	>2400
<b>Al</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Les concentrations élevées en métaux affectent négativement la microflore du sol (Pereira et al., 2006). Le cadmium à des concentrations faibles a été rapporté être toxique pour le microsymbiont, inhibe l'activité de la nitrogénase et affecte les activités métaboliques telle que la photosynthèse chez les légumineuses (Lebrazi et Benbrahim, 2014).

Les souches de *Rhizobium* testées présentent une tolérance *vis-à-vis* du cadmium avec une CMI > 100 µg/ml (soit 0.89 mM). Cette concentration est inférieure à celle observée par Abou-Shanab et al. (2007) chez *Rhizobium etli* AY460185 et qui est de 5 mM, par contre elle est supérieure à celle qu'ils ont observé chez *Rhizobium galegae* AY509216 et *Rhizobium gallicum* AY509211 qui est de l'ordre de 0,1mM et supérieure à celle de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* rapportée par (Pereira et al. 2006), qui est de 0,75 mM.

Dans le cas du plomb, les CMI sont inférieures à celles observées par Abou-shanab et al. (2007), chez des *Rhizobium etli* (15 mM) et supérieures à celles observées chez *Rhizobium mongolense* (10 mM). Les souches testées dans cette étude présentent une CMI beaucoup plus élevée comparée à celle trouvée par Pereira et al. (2006) chez *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* et qui est de 621,6 µg/ml.

Lenart-Boron et Boron (2014) ont rapporté que la fréquence des *Rhizobium spp.* se trouvant dans le sol non contaminé par les métaux lourds en Inde est de l'ordre de  $21.10^3$  UFC/g, tandis que dans le sol contaminé, leur fréquence est de  $16.10^2$  UFC/g. Ces auteurs ont également rapporté que la fréquence des *Azotobacter spp.* qui se développent naturellement sur ces sols est de  $23.10^3$  UFC/g, alors que dans le sol contaminé par les métaux lourds cette fréquence passe à  $17.10^1$  UFC/g. Ces résultats suggèrent que les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sont plus tolérantes que les bactéries fixatrices d'azote à l'état libre.

Dans le cas du zinc et du cuivre, la plupart des souches testées présentent une CMI  $>500 \mu\text{g/ml}$  et  $>100 \mu\text{g/ml}$  respectivement. Ces concentrations sont supérieures à celles observées par Cevheri et al. (2011) Chez des *Rhizobium* isolés de *Vicia palaestina* et qui sont de  $130,78 \mu\text{g/ml}$  et  $84,63 \mu\text{g/ml}$  respectivement.

Il a été rapporté que le zinc et le cadmium sont toxiques à des hautes concentrations, alors qu'à des concentrations modérées, ils sont importants comme oligoéléments. Le cadmium et le plomb sont, par contre, considérés toxiques car ; ils affectent les fonctions biologiques (Nies, 1999).

D'après les études de Paudyal et al. (2007), l'aluminium a un effet sur la croissance des rhizobiums même à de faibles concentrations. L'aluminium se lie à l'ADN des souches sensibles et des souches tolérantes mais la synthèse de cette ADN par les souches de *Rhizobium loti* n'est pas affectée (Zahran, 1999).

La toxicité de l'aluminium est un grand problème dans les milieux acides, car la solubilité des ions libres d' $\text{Al}^{3+}$  augmentent rapidement (Paudyal et al., 2007).

Les *Rhizobium* sont capables de produire des grandes quantités en exopolysaccharides et lipopolysaccharides qui séquestrent la majorité des métaux en dehors de la cellule (séquestration extracellulaire) qui est considéré comme première barrière de défense au stress métallique (Lebrazi et Benbrahim, 2014). Ce mécanisme peut être complété par d'autres mécanismes de résistance tel que le système d'efflux qui consiste à expulser le métal dans les conditions extrêmes. Ce système peut inclure l'ATPase et les échanges chimiosmotiques ions/proton (Lebrazi et Benbrahim, 2014).

#### IV- Détermination de la tolérance des *Rhizobium sp.* aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme obtenus montrent que la résistance aux antibiotiques varie d'une souche à l'autre (tableau V).

En effet, les antibiotiques tels que la céftazidime et l'oxacilline n'ont pas d'effet sur la croissance de nos souches, par contre la gentamicine, tétracycline et vancomycine inhibent fortement la croissance de la majorité des souches testées.

Parmi les souches étudiées, EA2 et MT2 présentent une résistance à 15 antibiotiques sur les 18 testées.

La souche MEK6 présente une résistance à 4 antibiotiques sur les 18 antibiotiques testés alors que, les souches EB1, EC6 et ES8 présentent une résistance à 11 antibiotiques.

**Tableau V:** Profil de résistance des souches de rhizobiums aux différents antibiotiques

Souches ATB	AKE1	AM11R	EA2	EB1	EC6	ES8	MEK6	MT2	RLV	UE28	UM2
NA	Rm	S	Rm	S	S	S	S	S	S	S	S
AK	S	S	Rm	R	R	R	S	R	S	S	S
AX	S	S	R	S	S	S	S	R	Rm	S	R
AMC	S	S	R	Rm	Rm	Rm	S	R	Rm	S	R
ATM	S	R	R	Rm	Rm	Rm	S	Rm	R	S	R
CZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CTX	S	S	R	S	S	S	ND	Rm	S	ND	R
FOX	S	ND	R	R	R	R	ND	R	S	S	R
CAZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ETP	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
E	R	S	R	S	S	S	S	Rm	S	S	S
GEN	S	S	S	S	S	S	S	Rm	S	S	S
OX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P	Rm	S	R	Rm	Rm	Rm	S	Rm	Rm	R	ND
TE	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
TIC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
TOB	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Rm	S
VA	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

R : résistante

Rm : Résistance Modérée

S : Sensible

ND : Non Déterminé

La figure 06 montre que les souches de *Rhizobium sp.* isolées de *Vicia faba* présentent une résistance bien marquée à la céftazidime et oxacilline (100%), la céfazoline et la ticarcilline (90,90%), la tobramycine, pénicilline et l’aztréonam (72,72%) et l’amoxicilline additionné à l’acide clavulanique (63,63%).

Une faible résistance était observée pour la gentamicine, tétracycline et vancomycine (9,09%).

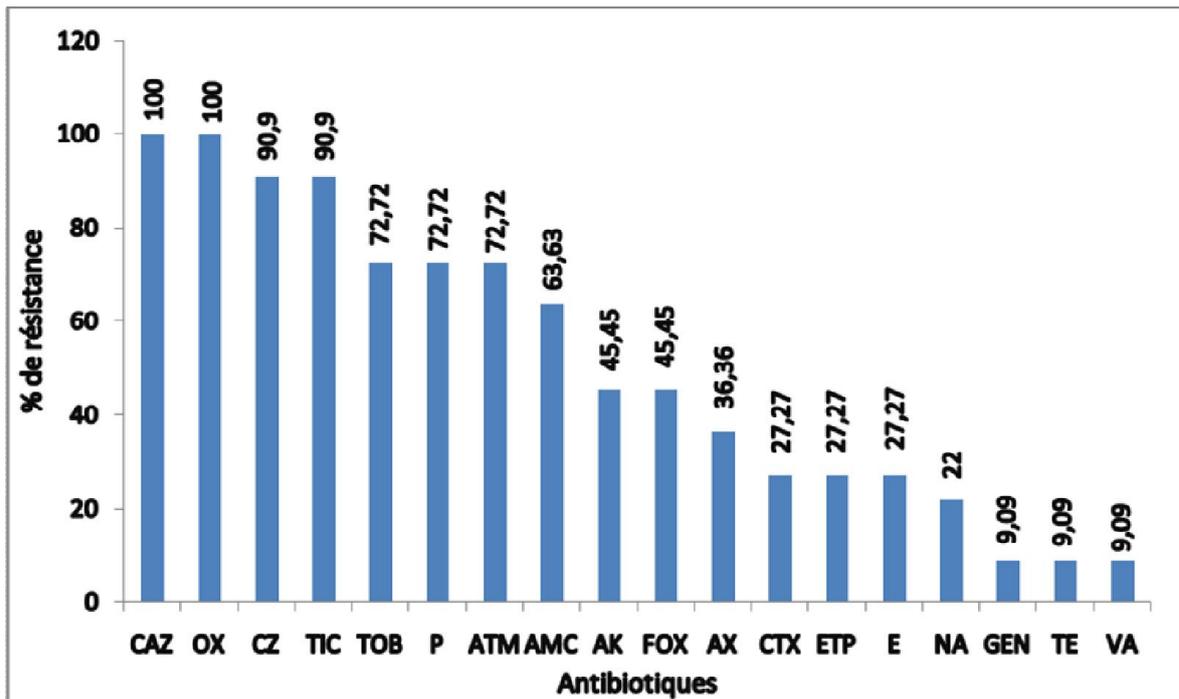


Figure 06 : Pourcentage de résistance des souches aux différents antibiotiques

La gentamicine et la tétracycline étant des inhibiteurs de la synthèse des protéines (Chopra et Roberts, 2001 ; Naamala et *al.*, 2016) présentent une action très importante puisque 90,91% des souches leurs sont sensibles. Le même constat est observé pour la vancomycine qui est un inhibiteur de la synthèse de peptidoglycane (Chopra et Roberts, 2001 ; Naamala et *al.*, 2016).

La sensibilité de 78% des souches testées à l’acide nalidaxique, serait due au l’inhibition de la réplication de l’ADN (Naamala et *al.*, 2016).

Toutes les souches testées dans cette étude sont résistantes à l’oxacilline et à la céftazidime appartenant à la classe des  $\beta$ -lactamines. Cette résistance pourrait être due à une altération de la cible, au mécanisme d’efflux qui empêchent la pénétration de certaines  $\beta$ -lactamines à l’intérieure de la cellule ou à l’hydrolyse qui est un mécanisme de résistance chez les bactéries Gram négatives (Chopra et Roberts, 2001),

Les résultats de la sensibilité à la tétracycline obtenus dans cette étude sont comparables avec ceux obtenus par Gauri et *al.* (2011) sur des souches de *Rhizobium trifolii*. Cet auteur a rapporté que la sensibilité des souches à l'antibiotique peut être due au fait que ces bactéries n'ont pas été exposées à cet antibiotique dans leur environnement naturel.

### V-Etude de la sensibilité des souches de *Rhizobium sp.* aux pesticides

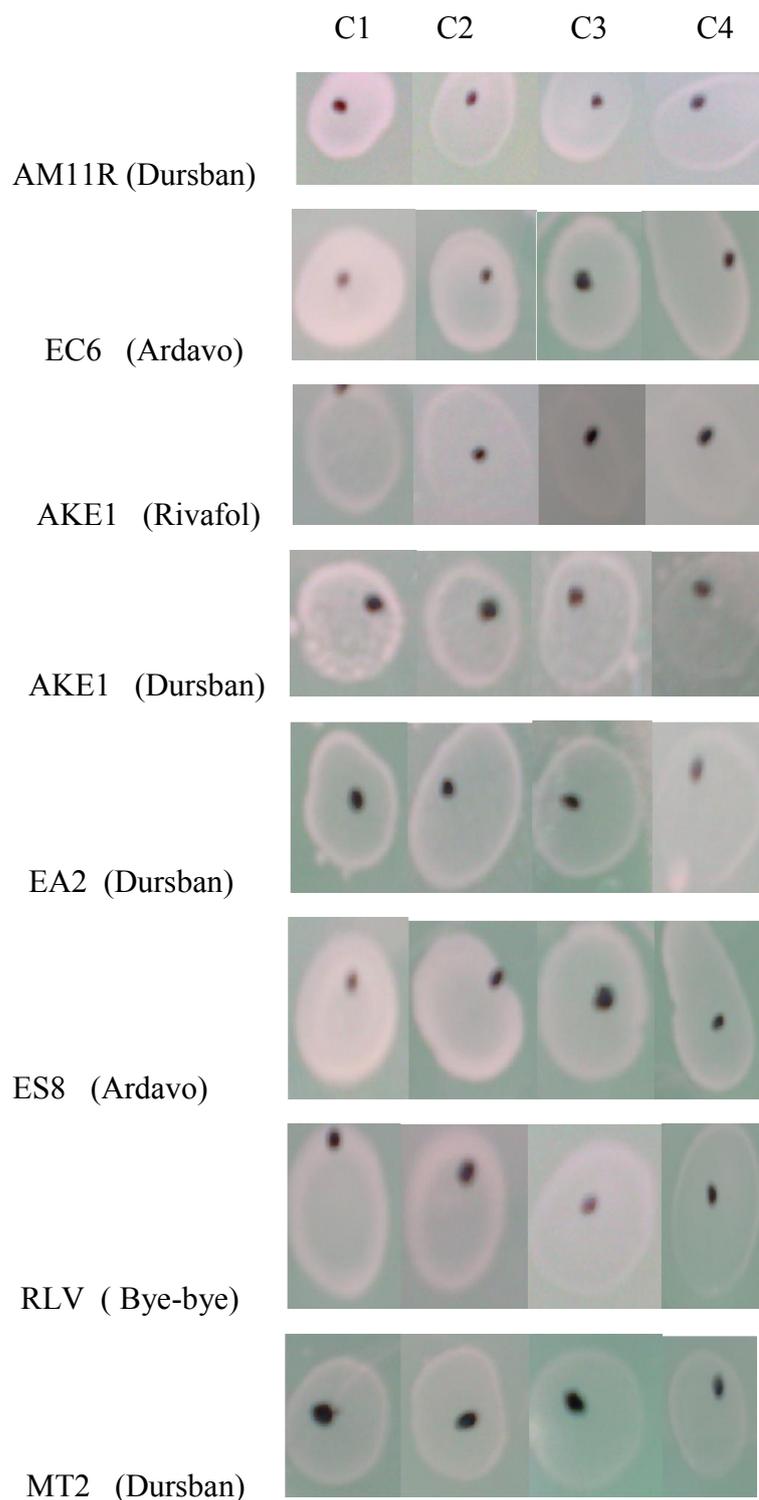
Le test d'évaluation de la sensibilité des souches de *Rhizobium sp.* en présence des différents pesticides à différentes concentrations montre que les différentes souches présentent une variabilité dans leur réponse (Tableau VI).

**Tableau VI :** Variation de la tolérance aux pesticides

Pesticides	Souches Concentrations	AKE1	AM11R	EA2	EB1	EC6	ES8	MEK6	MT2	RLV	UE28	UM2
AGRIVIL	100	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	++	+	-
	150	-	+	+++	+++	+	+	+	+	++	+	-
	200	-	+	+	+	-	-	+	+	++	+	-
	250	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
ARDAVO	100	+	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+
	150	+	+	++	+++	+++	+++	++	-	+++	++	-
	200	-	-	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	-
	250	-	-	++	++	+++	+++	+	-	++	+	-
RIVAFOL	100	++	++	++	+	+	++	++	+	+++	++	-
	150	++	+	++	-	+	++	++	-	+++	+	-
	200	++	-	++	-	-	-	+	-	++	+	-
	250	++	-	++	-	-	-	+	-	+	+	-
BYE-BYE	100	+	-	++	++	++	++	+	+	++	+	-
	150	+	-	++	++	++	+	+	-	++	+	-
	200	+	-	++	++	+	+	+	-	++	+	-
	250	-	-	++	+	+	+	+	-	+	+	-
DURSBAN	100	++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	-
	150	++	++	++	++	+++	+++	+	++	+++	++	-
	200	++	++	++	++	+++	+++	+	++	+++	++	-
	250	++	++	++	++	+++	+++	+	++	++	+	-

+++ : Bonne croissance ++ : Croissance modérée + : Croissance faible - : Absence de croissance

En effet, le développement des colonies et la production des exopolysaccharides présentent un grand contraste d'une souche à l'autre en fonction des pesticides et des concentrations testées (figure 07).



**Figure 07:** Photographies de développement de quelques souches en présence des différents pesticides

Dans le cas de fongicide AGRIVIL, une croissance à 100µg/ml a été observée chez toutes les souches avec une croissance importante chez AKE1, EB1 et EA2. Une croissance modérée chez la souche RLV et absence de croissance chez la souche UM2.

Une absence de croissance a été observée chez la souche AKE1 à une concentration de 150µg/ml, EC6 et ES8 à une concentration de 200µg/ml. Alors que les souches EA2, EB1, MT2, MEK6, RLV, UE28 et AM11R continuent de pousser même à 250µg/ml avec une faible croissance (Tableau VI).

Les souches EA2, EB1, EC6, ES8, MEK6, RLV et UE28 présentent une croissance plus ou moins importante, en présence du fongicide ARDAVO, pour les concentrations allant de 100 à 150µg/ml, par contre une absence de croissance a été observée chez MT2 et UM2 à 150 µg/ml et AKE1 à 200µg/ml (Tableau VI).

Le test d'activité antimicrobienne de l'acaricide RIVAFOL montre que les souches AKE1, EA2, MEK6, RLV et UE28 présentent une variabilité de croissance aux concentrations allant de 100 µg/ml jusqu'à 250 µg/ml, une absence de croissance chez les souches EB1 et ES8 à 200 µg/ml et aucune croissance pour la souche UM2 (Tableau VI).

Une croissance aux différentes concentrations a été observée chez les EA2, EB1, C6, ES8, MEK6, RLV et UE28 pour l'acaricide BYE-BYE par contre aucune croissance n'a été observée chez les souches AM11R et UM2. Alors que les souches MT2 et AKE1 sont inhibées respectivement aux concentrations 150 µg/ml et 250µg/ml (Tableau VI).

La présence de l'insecticide DURSBAN aux différentes concentrations montre que les souches de rhizobium testées présentent une croissance assez importante aux différentes concentrations testées sauf pour la souche UM2 qui ne présente aucune croissance (Tableau VI).

### **V-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices**

Les résultats de la tolérance aux pesticides nous ont permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Celles-ci varient de 100µg/ml à 250µg/ml pour les cinq pesticides testés.

Les CMI les plus élevées sont observées chez les souches EA2, MEK6, RLV et UE28 avec l'ensemble des pesticides. UM2 présente une faible tolérance avec une CMI<100µg/ml pour la majorité des pesticides testés, tandis que AKE1, EB1, EC6, MT2 et ES8 montre une CMI qui varie entre 150µg/ml et 250µg/ml (Tableau VII).

**Tableau VII:** Concentrations minimales inhibitrices

Souches Pesticides	AKE	AM1	EA2	EB1	EC6	ES8	MEK6	MT2	RLV	UE28	UM2
	1	1R									
<b>AGRIVIL</b>	150	>250	>250	>250	200	200	>250	>250	>250	>250	<100
<b>ARDAVO</b>	200	200	>250	>250	>250	>250	>250	150	>250	>250	150
<b>RIVAFOL</b>	>250	200	>250	150	200	200	>250	150	>250	>250	<100
<b>BYE-BYE</b>	200	<100	>250	>250	>250	>250	>250	150	>250	>250	<100
<b>DURSBAN</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	<100

Selon Shafiani et Malik (2003), les souches de rhizobium tolèrent des concentrations supérieures à 1600µg/ml de carbofuran/ml, 800µg/ml de l'endosulfan/ml et 1600µg/ml de malathion/ml. Ces concentrations sont supérieures à celles testées dans cette étude.

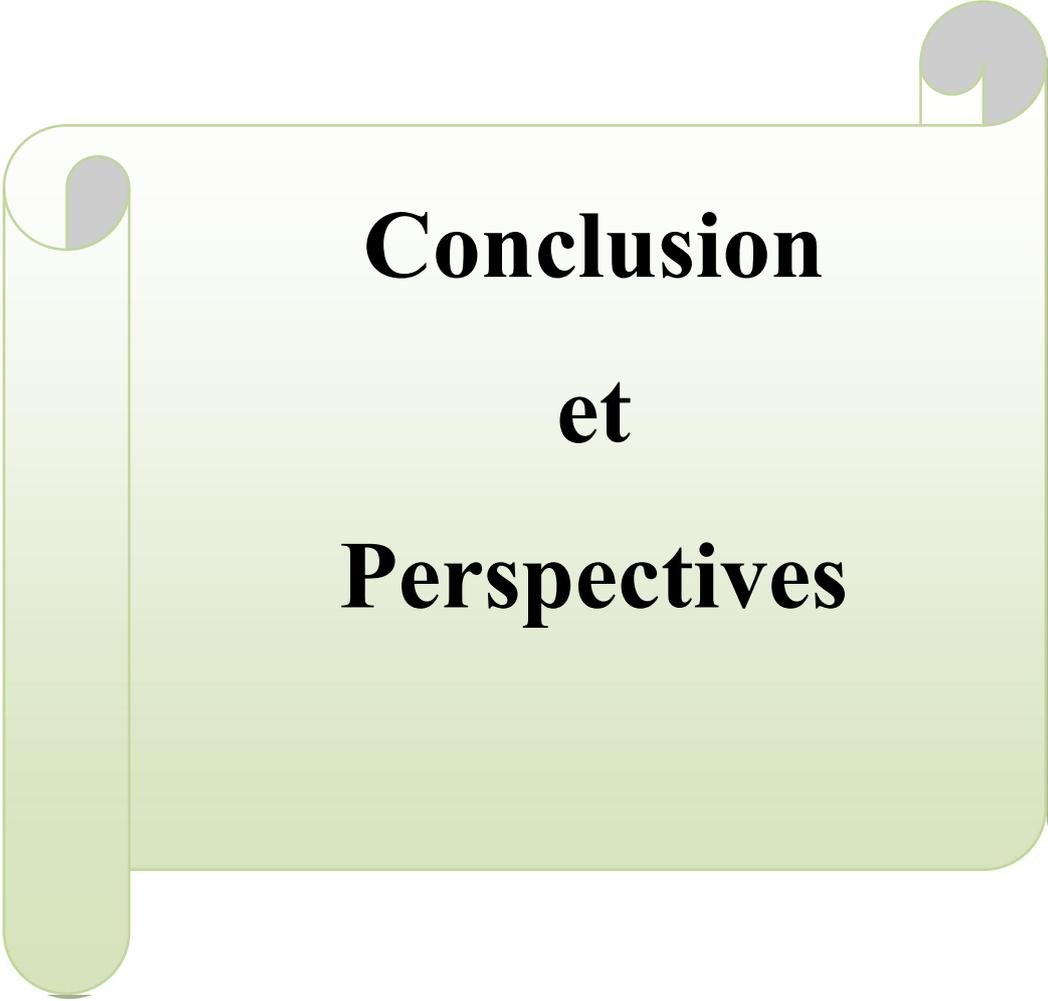
Il a été rapporté par Ben-Gweirif et al. (2005), que les souches de rhizobium isolées de différentes régions de Benghazi montrent une similarité dans leurs sensibilités relatives aux pesticides. Cette différence peut être en relation avec l'humidité, le pH et la texture du sol.

Une réduction significative dans la croissance des lentilles suivant l'application des fongicides était probablement due aux effets nuisibles de tuberconazole sur les organes de la plante, essentiellement la fonction des nodules, qui en conséquence diminuent la fixation de l'azote (Ahmad et Khan., 2011).

Certaines souches de rhizobium peuvent résister à des niveaux élevés en pesticide par l'adaptation. Cependant, cette adaptation des rhizobiums aux pesticides peut être une modification génétique (Zahran, 1999).

La variation entre les espèces de légumineuses avec la nodulation et la fixation d'azote sous traitement des pesticides peut dépendre du type et de la dose du pesticide, l'espèce de rhizobium et des légumineuses (Zahran, 1999).

Ahmed et Khan, (2009), rapportent que l'effet des herbicides sur les légumineuses et leurs symbiote rhizobium sont contradictoire. Une réduction significative dans la croissance des rhizobiums était observée chez certains herbicides. Cependant, la croissance des rhizobiums est seulement un aspect de la symbiose qui, aussi dépend de la formation, la croissance et la fonction des nodules. Tout ces processus peuvent être affectés par l'application des herbicides qui montrent une réduction significative dans l'efficacité symbiotique et la nitrogénase.



**Conclusion**  
**et**  
**Perspectives**

## Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons testé les niveaux de tolérance de 11 souches de rhizobiums nodulant *Vicia faba* de la région de Bejaia. En effet, l'évaluation de la tolérance de ces souches aux différents facteurs abiotiques a été réalisée sur les deux milieux YMA et YMB.

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a permis de mettre en évidence une grande diversité de réponses. Les souches EB1, EC6 et ES8 présentent une tolérance importante jusqu'à 34°C, tandis qu'une tolérance modérée a été marquée pour les souches AM11R, EA2, AKE1, UE28, UM2, RLV et MEK6. La souche MT2 peut survivre à la température 36°C.

L'étude de la sensibilité des différentes souches aux sels minéraux montre une différence de réponse entre les souches. Les souches EA2, EB1, EC6, ES8 et MT2 tolèrent jusqu'à 200 Mm de NaCl et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Concernant le KCl et le K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sauf EB1, EC6 et ES8 présentent une meilleure tolérance jusqu'à 200mM, tandis qu'en présence de MgCl<sub>2</sub> et de MgSO<sub>4</sub>, sauf UM2 et UE28 qui sont affectées, alors que les autres souches montre une tolérance entre 50mM et 200mM.

Le profil de tolérance des souches aux différents sels révèle une meilleure tolérance chez les souches AM11R, MEK6 et RLV pour le MgSO<sub>4</sub> et le MgCl<sub>2</sub>, tandis qu'une variabilité de tolérance est observé pour la plupart des souches en présence des différents sels.

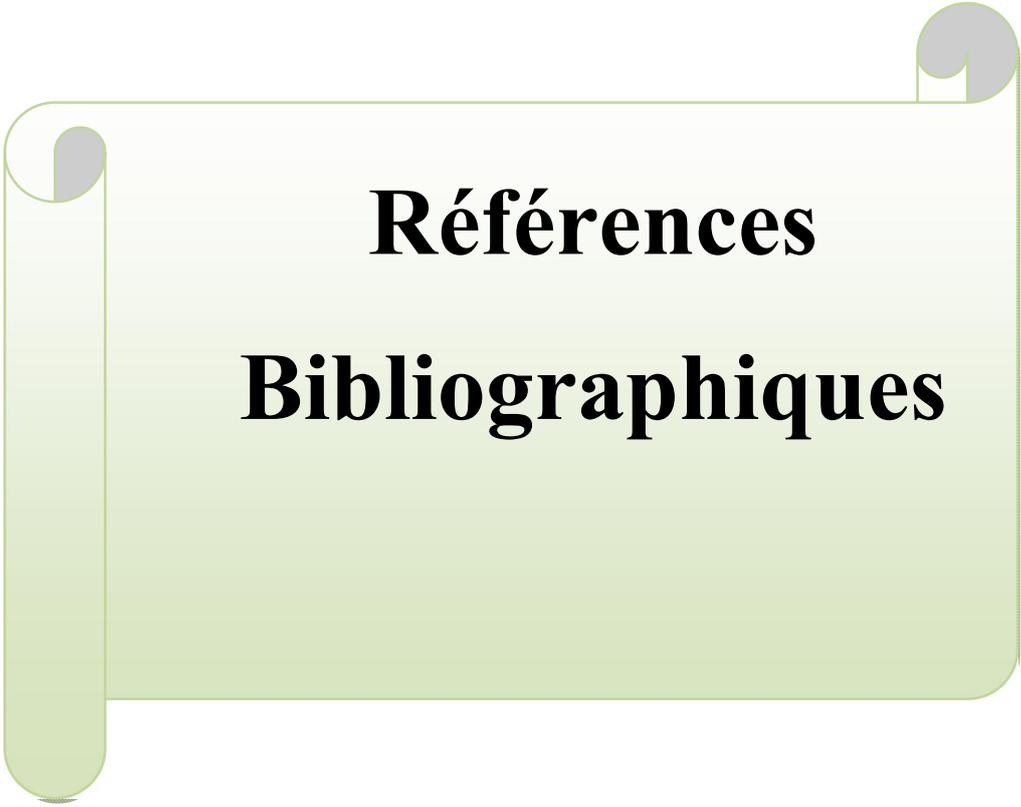
La résistance des souches aux sels métalliques montre une tolérance chez toutes les souches *vis-à-vis* du cuivre, plomb, cadmium et l'aluminium. Seule la souche MEK6 est affectée en présence du zinc.

L'antibiogramme montre que les souches étudiées présentent une grande résistance avec un pourcentage >60% pour CAZ, OX, CZ, TIC, TOB, P, ATM et AMC. La résistance est moindre pour AK, FOX, AX, CTX, ETP, E et NA. Le taux de résistance le plus faible est enregistré pour GEN, TE et VA.

L'étude de la sensibilité des souches aux pesticides révèle une variabilité de tolérance. Certaines souches, à savoir EA2, MEK6, RLV et UE28 présentent une grande tolérance jusqu'à 250µg /ml pour tous les pesticides.

En perspective, il serait intéressant de :

- ✓ Evaluer une gamme plus large de concentrations pour les facteurs abiotiques testés ;
- ✓ Etudier l'effet de ces paramètres sur la plante hôte et sur l'interaction symbiotique ;
- ✓ Faire une étude sur les mécanismes de résistance aux différents facteurs testés ;
- ✓ Caractériser des gènes impliqués dans la tolérance aux différents facteurs ;
- ✓ Etudier la combinaison de plusieurs facteurs sur la croissance de ces souches.



**Références**  
**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

**Abd-Alla M.H. (1992).** Nodulation and Nitrogen Fixation in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Plants under Salt Stress, *Symbiosis*, **12**, pp. 311-319.

**Abd-Allah M.H., El-Enany A.W.E., Nafady N.A., Khalaf D.M. et Morsy F.M. (2014).** Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers from faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, **169**, pp. 49-58.

**Abdelmoumen H., Filali-Maltouf A., Neyra M., Belabed A. et Missbah El Idrissi M. (1999).** Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal Applied Microbiology*, **86**, pp. 889-898.

**Abera T., Semu E., Debele T., Wegary D. et Kim H. (2015).** Determination Soil *Rhizobium* Populations, Intrinsic Antibiotic Resistance, Nodulation and Seed Yield of Faba Bean and Soybean in Western Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences*, **11** (5), pp. 311-324.

**Abou-Shanab R.A.I., Van Berkum P. et Angle J.S. (2007).** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, **68**, pp. 360-367.

**Ahemad M. et Khan M.S. (2009).** Toxicity Assessment of Herbicides Quizalafop-p-Ethyl and Clodinafop Towards *Rhizobium* Pea Symbiosis. *Bull Environ Contam Toxicol*, **82**, pp. 761-766.

**Ahemad M. et Khan M.S. (2011).** Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lens esculentus*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRL3. *Ecotoxicology*, **20**, pp. 661-669.

**B**

**Ben Khaled L., Gomez A., Honrubia M. et Oihabi A. (2003).** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. *Agronomie*, **23**, pp. 553-560.

**Ben-Gweirif S. F., El-Moshtty FI. et Agouri S R. (2005).** Effects of Some Pesticides on different Isolates of *Rhizobium leguminosarum* in Libya. *New tends in science*, pp. 20-24.

**Bhattacharya C., Deshpande B. et Pandey B. ( 2013).** Isolation and Characterization of *Rhizobium sp.* from Root of Legume Plant (*Pisum sativum*) and Its Antibacterial Activity Against Different Bacterial strains. *International Journal of Agricultural and Food Science*, **3**(4), pp. 138-141.

**Boakey E.Y., Lawson I.YD., Danso S.K.A. et Offei S.K. (2016).** Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*, **69**, pp. 89-99.

**Bruins M.R., Kapil S. et Oehme F.W. (2000).** Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **45**, pp. 198-207.

**C**

**Castro S., Vinocur M., Permigliani M., Halle C., Taurian T. et Fabra A. (1997).** Interaction of the fungicide mancozeb and *Rhizobium sp.* in pure culture and under field conditions. *Biol Fertil Soils*, **25**, pp.147–151.

**Cevheri C., Kucuk C. et Cetin E. (2011).** Fongicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Viciae palasestina*. *African Journal of Biotechnology*, **10**(13), pp. 2423-2429.

**Chabbi R. (2012).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister de Biotechnologie Végétale. Université Mentouri Constantine, 111p.

**Chopra I. et Roberts M. (2001).** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**(2), pp. 232-260.

**Cordovilla M.D.P., Ligeró F. et Lluch C. (1999).** Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology*, **11**, pp. 1-7.

**Correa O.S. et Barneix A.J. (1997).** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology*, **13**, pp. 153-157.

### D

**Davies J. et Davies D. (2010).** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**(3), pp. 417- 433.

**Dita M.A., Rispaill N., Prats E., Rubiales D. et Singh K.B. (2006).** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, **147**, 1-24.

**Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G. (1998).** Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Edition: Espaces. Montpellier. 499 p.

**Drouin P., Sellami M., Prevost D., Fortin J. et Antoun H. (2010).** Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of *Rhizobiaceae*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **45**, pp. 780-788.

**Duranti M. (2006).** Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, **77**, pp. 67-82.

**E**

**El-Hilali I. (2006).** La symbiose *Rhizobium*-Lupin Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat de Microbiologie et Biologie moléculaire. Université Mohamed V- Agdal, Rabat, 190p.

**Elsayed B.B., Hassan M.M. et El-Ramady H.R. (2013).** Phylogenetic and characterization of salt-tolerant rhizobial strain nodulating faba bean plants. *African Journal of Biotechnology*, **12**(27), pp. 4324-4337.

**F**

**Farissi M., Aziz F., Bouizgaren A. et Ghoulam C. (2014).** La symbiose légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité: Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, **11**(1), pp. 1-24.

**Figueira E.M.D.A.P., Lima A.I.G et Pereira S.I.A. (2005).** Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* : Glutathione as a detoxifying agent. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**, pp. 7-14.

**Fox M.A. (2005).** Adaptation of *Rhizobium* to Environmental Stress. Thèse de Doctorat: Université de Reading School of Animal and Microbial Sciences. p.330.

**G**

**Ganry F., Dommergues Y.R. (1995).** Arbres fixateurs d'azote : Champ ouvert pour la recherche. *Agriculture et développement*, **7**, pp. 38-55.

**Gauri., Singh A.K., Bhatt R.P., Pant S., Bedi M.K. et Naglot A. (2011).** Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*. *Journal of Agricultural Technology*, **7**(6), pp. 1705-1723.

**Graham P.H. et Vance C.P. (2003).** Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, **131**, pp. 872-877.

**Gulhane P.A., Gomashe A.V. et Sundarkar K.M. (2015).** Influence of pesticides on Nitrogen Fixing Bacteria. *International Journal of Technical Research and Applications*, **3**(4), pp. 157-160.

## *H*

**Hautsalo J. (2013).** Faba bean in microspore culture. Thèse de Master. Université de Helsinki. 76p.

## *K*

**Khasaei H. (2014).** Leaf traits associated with drought adaptation in faba bean (*Vicia faba* L.). Thèse de Doctorat. Université de Helsinki. 59p.

**Khebbat F. (1994).** Etude de la résistance des souches d'*E.coli* isolées de l'oued Bousellam aux antibiotiques et aux métaux lourds et effet de leur adaptation aux aminosides sur ces résistances. Détection des plasmides de résistance, leur élimination par différents agents physiques et chimiques et transferts par conjugaison. Thèse de magister en Biochimie, université FERHAT Abbas Sétif. 156p.

## *L*

**Lakhal A. (2011).** Effet de certains inducteurs de gènes nod (Composés phénoliques) sur la croissance de *Rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique. Thèse de Doctorat des sciences en biologie moléculaire et cellulaire, 156p.

**Lebrazi S. et Benbrahim K.F. (2014).** Environmental stress conditions affecting the N<sub>2</sub> fixing *Rhizobium*-legume symbiosis and adaptation mechanisms. *African Journal of Microbiology Research*, **8**(53), pp. 4053-4061.

**Legesse S. et Assefa F. (2014).** Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating Faba Bean (*Vicia faba*) from Tahtay Koraro, Northwestern Zone of Tigray Regional State, Ethiopia. *International Journal of Technology Enhancements and Engineering Research*, **2**(11), pp. 15-23.

**Lenart-Boron A. et Boron P. (2014).** The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils. *Environmental Risk Assessment of soil contamination*. DOI 10. 5772/57406, pp. 759-783.

**Link W., Hanafy M., Malenica N., Jacobsen H.J. et Jelenic S. (2008).** Faba bean. *In: Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Legume Grains and Forages*, pp. 71-88.

**Lopez-Gomez M., Palma E., Lluch C., (2013).** Strategies of Salt Tolerance in the Rhizobia-Legume Symbiosis. *In: Beneficial Plant Microbial Interaction: Ecology and Applications*. 99p.

### M

**Maâtallah J., Berraho E.B., Sanjuan J. et Lluch C. (2002).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, **22**, pp.321–329.

**Milicic B., Delic D., Kuzmanovic D., Stajkovic O. et Josic D. (2006).** Intrinsic antibiotic resistance of different *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium galegae* strains. *Roumanian Biotechnological Letters*, **11**(3), pp. 2723-2731.

**Mothapo N.V. (2011).** Nodulation and Rhizobia Diversity Associated with Distinct Hairy Vetch Genotypes. Thèse de Master en Science. Université North Carolina State, 80p.

### N

**Naamala J., Jaiswal S.K. et Dakora F.D. (2016).** Antibiotics Resistance in *Rhizobium*: Type, Process, Mechanism and Benefit for Agriculture. *Curr Microbiol*. DOI 10.1007/s00284-016-1005-0.

**Nandal K., Sehrawat A.R., Yadav A.S., Vashishat R.K. et Boora K.S. (2005).** High temperature- induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat- resistant mutants of *Rhizobium sp. (Cajanus)*. *Microbial Research*, **160**, pp. 367-373.

**Nies D.H. (1999).** Microbiological heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, pp. 730-750.

**P**

**Paudyal S.P., Aryal R.R., Chauhan S.V.S. et Maheshwari D.K. (2007).** Effect of heavy metals on growth of *Rhizobium* strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Scientific world*, **5(5)**, pp. 27-32.

**Pelmont J. (1993).** Bactéries et Environnement. Edition : Grenoble Sciences. Paris. 899p.

**Periera S.I.A., Lima A.I.G., Figueira E.M.D.A.P. (2006).** Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different source of heavy-metal contamination: Effects on protein expression. *Applied Soil Ecology*, **33**, pp. 286-293.

**Perry J.J., Staley J.T. et Lory S.(2002).** Microbiologie. Edition : Dunod, paris. 891p.

**Rabie G.H. et Almadani A.M. (2005).** Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, **4 (3)**, pp. 210-222.

**S**

**Saadi H. (2014).** Contribution à l'étude de la résistance variétés locales de *Vicia faba* L au nématode de *Dilvlenchus dipsaci* dans la région de Biskra. Mémoire de Magister en Agronomie. Université Mohamed Khider, 78p.

**Shafiani S. et Malik A.(2003).** Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater-irrigated soil. *World Journal of Microbiology*, **19**, pp. 897-901.

**Schuster-Gájzagó I. (2004).** Beans. *In: Cultivated Plants, Rrimarly as Food Source*, 2. Edible Bean Plants, Encyclopedia of Life Support System (EOLSS). Eolss publishers, Oxford, UK, 8p.

**Shankar P.V., Shaikh N.R. et Vishwas P.S. (2012).** Effect of Different Herbicides on the Nodulation Property of Rhizobial Isolates. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, **2**, pp. 293- 299.

**Sobti S., Belhadj H.A. et Djaghoubi A. (2015).** Isolation and Characterization of The Native Rhizobia Under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla. *Energy Procedia*, **74**, pp. 1434- 1439.

**Somasegaran P. et Hobben H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Edition : Softcover reprint of the hardcover. New York. 443p.

**Soussou S. (2013).** Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques *d'Hedysarum coronarium*. Thèse de Doctorat de Microbiologie, Parasitologie/ Agriculture Durable. Montpellier Supagro/ Université de Sousse. 192p.

**Sparvoli F., Bollini R. et Cominelli E. (2015).** Nutritional Value. *In* : Springer Science + Business Media , Grain Legumes, Handbook of Plant Breeding 10, New York, pp. 191-325.

## T

**Teggar N. (2015).** Etude de l'effet du stress salin sur la nodulation et sur quelques paramètres biochimiques et morphologiques de la lentille (*Lens culinaris* L). Mémoire de Magister d'Ecophysiologie végétale. Université d'Oran, 68p.

## V

**Vasconcelos M.W. et Gomes A.M. (2016).** The Legume Grains: When Tradition Goes Hand in Hand with Nutrition. *In*: Springer Science + Business Media, Traditional Foods, Integrating Food, New York, pp. 189- 207.

**Ventorino V., Caputo R., De pascale S., Fagnano M., Pepe O. et Moschetti G. (2012).** Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*. DOI : 10.1007/s 13213-011-0322-6.

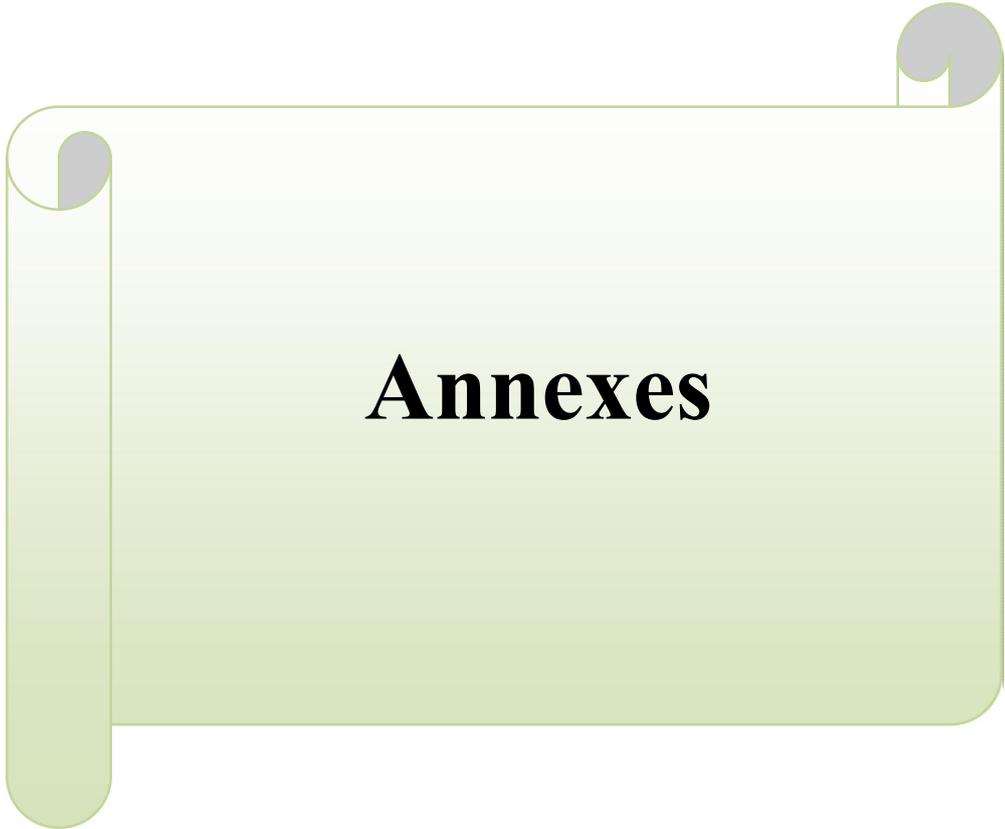
### Υ

**Yadav A.S. and Nehra K. (2013).** Selection/ Isolation of High Temperature Tolerant Strains of *Rhizobium* for Management of High Temperature Stress on *Rhizobium*- Legume Symbiosis. *International Journal of Microbial Ressource Technology*, **2**(1), pp. 47- 57.

### Z

**Zahran H.H. (1999).** *Rhizobium*- Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Sever Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**(4), pp. 968-989.

**Zancarini A. (2012).** Etude de l'interaction plante-communautés microbiennes de la rhizosphère chez l'espèce modèle *Medicago truncatula* par une approche multidisciplinaire : Contribution à la réflexion sur le pilotage des interactions par la plante. Thèse de Doctorat d'Ecophysiologie et Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne, 167p.



# **Annexes**

---

## Annexes

### Annexe 01 : Composition des milieux de cultures

#### Composition du milieu : Yeast Mannitol Agar (YMA)

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
H <sub>2</sub> O (QSP).....	1000ml
Ajuster le pH à .....	6,8

#### Composition du milieu: Yeast Mannitol Broth (YMB)

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
H <sub>2</sub> O (QSP).....	1000ml
Ajuster le pH à .....	6,8

## **Annexe 02 : Caractères botanique de *Vicia faba***

Le genre *Vicia* comportent 146 espèces sauvages et espèces cultivées dans le monde, principalement dans les régions à climat tempéré. Seules cinq espèces sont cultivées pour leurs graines en tant que alimentation humaine ou nourriture animale. Sur la base de la taille des graines, deux sous espèces sont distinguées, à savoir paucijuga et faba. Le type faba est divisé en *var. minor* avec de petites graines arrondies de 1 cm de long, *var. equina* avec des graines de taille moyenne de 1,5cm et *var. major* avec des graines larges et plates de 2,5cm (Schuster-Gájzagó, 2004).

## Annexe 03 : Diamètres des zones d'inhibition

Souches ATB	AKE1	AM11R	EA2	EB1	EC6	ES8	MEK6	MT2	RLV	UE28	UM2
TIC	0	10,64	0	0	0	0	16,52	0	0	0	40
AK	20,24	24,98	16,19	13,12	14,05	13,7	30,84	0	18,08	23,48	21,8
CZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30,98
ETP	47,74	21,07	28,46	15,89	14,9	15,66	54,86	25,33	24,69	31,04	43,08
OX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA	33,4	42,82	0	28,27	28,42	28,27	51,88	23,79	34,84	35,58	37,48
E	14,64	32,62	0	25,97	25,86	25,54	52,46	18,34	25,26	36,5	47,7
GEN	20,1	22,72	17,84	16,69	16,19	16,18	30,94	14,17	18,54	26,7	24,94
TOB	12,9	19,36	12,68	11,69	11,09	11,26	32,42	0	12,43	15,45	19,92
P	26,9	30,32	0	24,38	22,6	22,11	43,62	16,9	21,77	0	ND
NA	17,64	49,3	16,53	32,07	29,8	29,75	46,36	26,41	34,25	26,24	47,86
TE	65,32	56,66	24,9	42,31	41,08	40,57	82,62	0	36,04	53,1	56,76
AMC	34,86	37,46	0	17,69	17,4	17,1	28,08	0	17,48	43,98	0
AX	27,74	39,94	0	25,17	23,04	25,64	43,6	9,12	16,53	30,92	0
CTX	48,98	59,64	0	23,93	24,4	24,58	ND	20,05	46,48	ND	0
CAZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	24,18	0	0	18,45	18,12	19,13	24,06	17,03	0	29,58	0
FOX	24,22	ND	0	13,5	12,53	13,25	ND	0	40,42	26,06	0

## Résumé

L'étude de l'effet de la tolérance aux différents facteurs abiotiques (température, sels minéraux, sels métalliques, antibiotiques et pesticides) sur onze souches de *Rhizobium* de *Vicia faba*, provenant de différentes régions de Bejaia a été réalisée sur milieu YMA et YMB. Sur l'ensemble des souches testées 27,27% présentent une tolérance plus importante aux différentes températures.

Les taux de résistance aux différents sels sont enregistrés. Pour les sels minéraux, 81,81% des souches présentent une bonne croissance aux différentes concentrations en  $MgCl_2$  et  $MgSO_4$ , 45,45% en présence du  $NaCl$  et  $Na_2SO_4$  et 36,36% en présence du  $KCl$  et  $K_2SO_4$ . Toutes les souches testées présentent une tolérance aux différentes concentrations en métaux lourds (Cu, Pb, Cd et Al) tandis que, dans le cas du Zn, 90,90% des souches présentent une tolérance.

Le profil de résistance aux antibiotiques révèle un taux élevé pour céftazidime et oxacilline avec 100%, céfazoline et ticarcilline avec 90,90% et tobramycine, pénicilline et aztréonam avec 72,72%. L'effet des pesticides montre que la plupart des souches présentent une tolérance aux différentes concentrations testées.

**Mots clés :** *Vicia faba*, *Rhizobium*, facteurs abiotiques, Tolérance.

## Abstract

The study of the effect of tolerance to abiotic factors (temperature, minerals, metal salts, antibiotics and pesticides) on eleven *Rhizobium* strains of *Vicia faba*, from different regions of Bejaia was performed on YMA and YMB medium. Of all the tested strains 27.27% have a greater tolerance to different temperatures.

The rate of resistance to various salts is stored. For minerals, 81.81% of the strains showing good growth with different concentrations of  $MgCl_2$  and  $MgSO_4$ , 45.45% in the presence of  $NaCl$  and  $Na_2SO_4$  and 36.36% in the presence of  $KCl$  and  $K_2SO_4$ . All tested strains showed tolerance to different concentrations of heavy metals (Cu, Pb, Cd, and Al), while in the case of Zn, 90.90% of the strains have a tolerance.

The antibiotic resistance profile reveals a high rate for oxacillin and ceftazidime with 100%, cefazolin and ticarcillin with 90.90% and tobramycin, penicillin and aztreonam with 72.72%. The effect of pesticides shows that most strains show tolerance to different concentrations tested.

**Keywords:** *Vicia faba*, *Rhizobium*, abiotic factors, Tolerance.