

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
Spécialité Ecologie Microbienne



Réf :.....

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

MASTER

Thème

***Identification de bactéries associées au genre
Genista.***

Présenté par :

Tourene Malika

Soutenu le : **26 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^r LADJOUZI R.

M^r BELHADI D.

M^{me} SAIDANI K.

M^{lle} BOUDEHOUCHE W.

MAA

MAA

MAA

Doctorante

Président

Encadreur

Examinatrice

Co-promotrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Les travaux présentés dans cette étude ont été réalisés dans le Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Abderrahmane Mira - Bejaia. Au terme de ce travail,

Je tiens à remercier particulièrement mon promoteur, **M^r BELHADI D.**, pour son aide précieuse et ces conseils judicieux. Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance. Mes vifs remerciements s'adressent à **M^{lle} BOUDEHOUCHE W.**, d'avoir accepté de m'encadrer, merci pour sa présence journalière à mes côtés, ces conseils. Et pour m'avoir aidé à mener à bien ce travail.

A mes amis de promotion, j'adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Que toutes les personnes ayant contribué à la réalisation et l'aboutissement de ce modeste travail trouve ici l'expression de ma profonde et sincère gratitude.

Finalement mes très distincts remerciements reviennent à mes très chers parents pour m'avoir supportée et encouragée tout au long de mes études et pour m'avoir donné la curiosité intellectuelle nécessaire à la réussite de ce projet.

TOURENE Malika

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à : Mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de leurs sacrifices, leur amour inconditionnel et incommensurable, leur patience, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible.

« Aussi éternel que les étoiles dans le ciel est l'amour que je vous porte ».

A toute ma famille, mes amis. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Mika

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES CHIMIQUES

N: Azote

N₂: Nitrogène

NH₃: Ammoniac

NO₂: Nitrite

NO₃⁻: Nitrate

N₂O : hémioxyde d'azote

Nod : Nodulation

N1-N2 : Réactifs de Griess

BTB : Bleu de Bromothymol

E.P.S: Exopolysaccharides

E.P.E.I : eau peptonée exempte d'indole

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Both

LISTE DES FIGURES

N°	TITRE	PAGE
1	le dialogue moléculaire de a symbiose légumineuse-Rhizobium	12
2	Schéma résumant les différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse	13
3	Test de la catalase sur lame	15

LISTE DES TABLEAUX

N°	TITRE	PAGE
1	Exemples des différents types de microorganismes fixateurs d'azote	4
2	Taxonomie du <i>Rhizobium</i>	6
3	Taxonomie de <i>Genista</i>	11
4	Résultats du test du bleu de bromothymol	19
5	Résultats de l'activité catalase et de la production d'indole	20
6	Résultats de la croissance des bactéries à différentes températures	22

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

1- La fixation de l'azote	3
1-1- La fixation industrielle de l'azote	3
1-2- La fixation physique	3
1-3- La fixation biologique de l'azote (ou « diazotrophie »)	3
2- Les microorganismes qui fixent l'azote atmosphérique.....	3
2-1- Les fixateurs libres « non symbiotiques ».....	4
2-2- Les fixateurs symbiotiques	5
3- Le Rhizobium (le micro-symbiote).....	5
3-1- Caractères morphologiques.....	5
3-1-1- La forme végétative	5
3-1-2- La forme bactéroïde.....	5
3-2- Caractères biochimiques	5
3-3- Caractères physiologiques et culturels	6
4- Classification et taxonomie du Rhizobium	6
5- Effets des facteurs abiotiques sur la croissance Rhizobiums	7
5-1- Effet du pH.....	7
5-2- Effets de la température	8
5-3- Effets de la salinité.....	8
5-4- Effets des nitrates	8
6- Les légumineuses (Le macro-symbiote)	9
6-1- Classification des légumineuses	9

6-2 - Intérêt des légumineuses	10
6-3- Taxonomie et caractéristiques du genre <i>Genista</i>	10
7- Symbiose Rhizobium – légumineuses.....	11
7-1- La nitrogénase	11

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

1- Matériel biologique	14
2- Principaux milieux de culture utilisés	14
3- Revivification et conservation des souches.....	14
4- Caractérisation des souches de rhizobiums.....	14
4-1- Caractéristiques culturelles des colonies.....	14
4-2- Caractéristiques morphologiques des bactéries	14
4-3- Caractérisation biochimique	15
4-3-1- Test de Bleu de bromothymol	15
4-3-2- Activité catalasique.....	15
4-3-3- Production d'indole	15
4-3-4- Réduction des nitrates.....	15
4-3-5- Utilisation des sucres comme seule source de carbone	16
4-4- Caractéristiques physiologiques	16
4-4-1- Effet du pH sur la croissance bactérienne	16
4-4-2- Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	16
4-4-3- Effet de la salinité sur la croissance bactérienne	17

CHAPITRE III : Résultats et discussions

1- Caractères culturels et morphologiques	18
1-1- Caractères culturels.....	18
1-2- Caractères morphologiques.....	18

2- Caractérisation phénotypique	18
2-1- Caractéristiques biochimiques	18
2-1-1- Test du Bleu de Bromothymol (BTB)	18
2-1-2- Test de la catalase et de la production d'indole.....	19
2-1-3- Nitrate réductase	20
2-1-4- Utilisation des sucres	21
2-2- Caractéristiques physiologiques	21
2-2-1- Effet de pH.....	21
2-2-2- Effet de la température sur la croissance	21
2-2-3- Tolérance au NaCl	22
Conclusion	23

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Comme disait Antoine Laurent de Lavoisier « *dans la nature rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme* ». En effet, la biosphère perpétue un éternel échange de matière entre ses différents réservoirs qui sont l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère, c'est ce qu'on appelle les cycles biogéochimiques, dans ses cycles les éléments sont en constant déplacement. Parmi eux le quatrième élément essentiel à la vie l'Azote.

Bien qu'abondant dans l'atmosphère, l'azote est le facteur limitant le plus fréquent après l'eau, de la production agricole. Il représente un problème crucial auquel doit faire face l'agriculteur en fournissant à la plante l'azote assimilable lorsqu'elle en a besoin, tout en maintenant le stock du sol (Raven et *al.*, 2003). En outre, avec l'ascension des prix des engrais azotés et en vu des problèmes de pollution par les nitrates, l'importance des légumineuses à forte capacité fixatrice de l'azote devient évidente. Véritable don de la nature, les légumineuses font parties des espèces pouvant établir des symbioses bénéfiques en plus de leur capacité à croître sur des sites arides qui sont inadéquats et hostiles pour de nombreuses cultures (Mohamed et *al.*, 2000). *Genista* en fait partie, c'est un excellent candidat pour lutter contre la désertification qui touche environ quatre dixièmes des régions terrestres et selon la FAO (1993), 66% de ces zones écologiques se situent sur le continent Africain. Pour les régions où les sols sont généralement pauvres en azote, elles constituent des cultures stratégiques sur le plan économique, alimentaire et écologique non négligeables. En effet, dans son cycle, l'azote passe d'un état combiné à un état libre, d'un état minéral à un état organique. L'une de ces étapes est la fixation de ce dernier et c'est de loin l'étape la plus importante, elle est assurée par des procaryote.

Près de la moitié de la fixation biologique de l'azote moléculaire du globe se fait par le biais des associations symbiotiques fixatrices d'azote, Elles sont très diversifiées, certains microorganismes assurent cette fonction à l'état libre, tandis que d'autres doivent entrer dans un état de symbiose avec des plantes. Les plus connues et les plus étudiées sont celles établies entre des bactéries du sol de type *Rhizobia* et les plantes de la famille des Fabacées (légumineuses) (De Faria et *al.*, 1989).

Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. En retour, les bactéries tirent profit de l'interaction symbiotique en obtenant des hydrates de carbone produits par la plante pendant la photosynthèse.

L'utilisation des légumineuses est préconisée pour la restauration des sols dégradés, en jouant un rôle de plantes pionnières facilitant l'implantation végétales. Pour cela, il est particulièrement recommandé de chercher à identifier les couples symbiotique les plus

adapté et les plus efficaces, pour les introduire en vue de coloniser ces sites pauvres en contresignant le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permet de réduire l'usage des intrants chimiques très coûteux et polluants. Dans ce contexte l'association rhizobiums-légumineuses peut remplacer efficacement les engrais azotés.

Le but de notre travail réside dans l'identification des souches bactérienne, symbiotiques et fixatrices d'azote, nodulant des espèces de légumineuses appartenant au genre *Genista*. Les souches feront l'objet d'une série de tests phénotypiques afin de contribuer à leur caractérisation.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1- La fixation de l'azote

L'azote atmosphérique est fixé par voie industrielle, par voie physique, ou par voie biologique et naturelle.

1-1- La fixation industrielle de l'azote

Pour briser la triple liaison du diazote et le convertir en ammoniac, l'industrie utilise le procédé Haber-Bosch, ce qui nécessite une pression de 450 à 500 bars et il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par ce processus.

Environ 10 à 40 millions de tonnes d'ammoniac sont fabriquées chaque année par ce procédé. C'est environ 1/5 de ce que produisent les bactéries fixatrices d'azote sur toute la planète. L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates tels que nitrate de sodium (NaNO_3) ou nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). La moitié de l'engrais azoté utilisé en agriculture est absorbé par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé (Peret, 2007). Il existe deux processus naturels différents permettant la transformation de l'azote gazeux (N_2) en azote assimilable par les plantes (Hopkins, 2003).

1-2- La fixation physique

En temps d'orage, la formation d'oxyde d'azote se fait par le billet des éclairs, les hautes températures et pression engendrées permettent le clivage de la triple liaison du dinitrogène qui retombe au sol avec la pluie.

1-3- La fixation biologique de l'azote (ou « diazotrophie »)

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est l'une des premières étapes du cycle de l'azote. C'est un processus métabolique, réalisé exclusivement par des organismes procaryotes (azotobacter ou rhizobiums) possédant les enzymes nécessaires pour fixer l'azote atmosphérique (N_2), notamment une enzyme appelée la Nitrogénase. Cette enzyme permet de convertir le nitrogène (N_2) en azote ammoniacal (NH_3), qui lui est assimilable par la plante. Cette dernière peut constituer les molécules organiques nécessaires à sa croissance (notamment les protéines) (Hopkin, 2003 ; Schneider et *al.*, 2015).

2- Les microorganismes qui fixent l'azote atmosphérique

Les microorganismes qui fixent le nitrogène (N_2) sont tous des microorganismes diazotrophes. Ils sont réparti en deux groupes : les fixateurs libres tels que *Azotobacter*,

Klebsiella (Tourte et al., 2005) et les fixateurs symbiotiques tels que les *Rhizobiums* qui eux, ont besoin de la présence d'un végétal en croissance de la famille des légumineuses pour fixer l'azote, et ceci de manière très spécifique, c'est à dire que chaque espèce de rhizobium s'associe avec une espèce particulière de légumineuses (Madigan et Martink, 2007)

Tableau 1 : Exemples des différents types de microorganismes fixateurs d'azote (Roger et al., 1996)

Micro-organismes libres			
Aérobies	Hétérotrophes	<i>Azotobacter spp.</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ;	
		<i>Beijerinckia indica</i> ; <i>Azospirillum lipoferum</i>	
	Phototrophes: Cyanobactéries	Hétérocystées	<i>Nostoc</i> ; <i>Anabaena</i> ; <i>Calothrix</i> ; <i>Tohyothrix</i>
		Homocystées	<i>Trichodesmium</i> ; <i>Oscillatoria</i>
Unicellulaires		<i>Gloeotheca</i> ; <i>Gloeocapsa</i>	
Anaérobies	Hétérotrophes	<i>Clostridium pasteurianum</i> ; <i>Desulfovibrio vulgaris</i> ;	
		<i>Desulfotomaculum spp.</i> ; <i>Methanobacterium spp.</i>	
	Phototrophes	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ; <i>Rhodobacter capsulata</i> ;	
		<i>Chromatium vinosum</i>	
Microorganismes symbiotiques			
Légumineuses	à nodules racinaires	<i>Rhizobium meliloti</i>	
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
	à nodules caulinaires	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	
Symbioses actinorhiziennes		<i>Frankia</i>	
Symbioses à cyanobactéries	<i>Azolla</i>	<i>Anabaena azollae</i>	
	Cycas	<i>Anabaena cycadeae</i>	
	Lichens	<i>Nostoc</i>	
	Mousses et hépatiques	<i>Nostoc</i>	

2-1- Les fixateurs libres « non symbiotiques »

Représentés par les bactéries fixatrices libres (non associées avec une plante spécifique) comprennent des genres variés : bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azobacter vinelandii*, *Azospirillum*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium pasteurianum*) ou aérobies facultatives (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum rubrum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Renier, 2008).

2-2- Les fixateurs symbiotiques

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent la symbiose Rhizobium-légumineuse. En 1995, Ganry et Domergues ont divisés les fixateurs d'azote en deux groupes majeurs de bactéries phylogénétiquement différents. Depuis, la propriété symbiotique de fixation d'azote dans les nodules des plantes vasculaires est rencontrée chez les rhizobia (principalement *Alpha-Proteobacteria*) qui s'associent essentiellement avec des plantes légumineuses appartenant à la sous-famille des angiospermes (*Fabaceae*), et les *Frankia* (des *Actinobacteria*) qui s'associent avec un spectre plus large de plantes (Franche et *al.*, 2009).

3- Le Rhizobium (le micro-symbiote)

3-1- Caractères morphologiques

Les *Rhizobium* sont des bactéries capables d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses. Ayant la capacité d'envahir et de former des nodules sur les racines (ou parfois sur la tige) de ces dernières, dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique (N₂) a lieu (Pelmont, 1995).

Elles ont aussi la faculté d'améliorer la composition chimique et la qualité de la graine, ce sont des bactéries d'une très grande importance économique (Elsheikh, 1998).

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatifs, non sporulantes, on distingue deux formes :

3-1-1- La forme végétative : les bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994).

3-1-2- La forme bactéroïde : à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les Rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004). Ils ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

3-2- Caractères biochimiques

Les Rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes, ils utilisent des carbohydrates (sucres) 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 rhizobia n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacale ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

3-3- Caractères physiologiques et cultureux

Le *Rhizobium* est un microorganisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène. 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 (Somasegaran et Hoben, 1994).

Au laboratoire, les rhizobiums sont cultivés et se développent sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970), sur lequel les colonies apparaissent sous forme circulaire, convexes de 2 à 4 mm de diamètre, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides et peuvent être brillantes. Les colonies jaunes pâles sont rencontrées lorsque les cultures sont âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Les souches apparaissent au bout de 3 à 5 jours après incubation à 25-30°C.

4- Classification et taxonomie du *Rhizobium*

Les *Rhizobium* isolés jusqu'à présent appartenaient tous au groupe des *alpha-Proteobacteria*. D'après Somasegaran et Hoben(1994), on distingue trois groupes de rhizobia :

- les **Rhizobia** à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours.
- les **Mesorhizobium** à croissance moyenne qui produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-4 jours.
- les **Bradyrhizobium** à croissance lente qui produisent un trouble dans le milieu liquide dans 4-5 jours.

Tableau 2 : Taxonomie du *Rhizobium* (Frank, 1889)

Rang Taxonomique	Nomenclature
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alpha Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Rhizobiales</i>
Famille	<i>Rhizobiaceae</i>
Genre	<i>Rhizobium</i>

5- Effets des facteurs abiotiques sur la croissance Rhizobiums

Les facteurs édaphiques ou pédologiques sont des facteurs écologiques liés aux caractéristiques physiques et chimiques du sol. Il s'agit de la texture du sol, de sa structure, sa porosité, les pH extrêmes, le taux de nitrate dans le sol, de la teneur en eau, du degré d'acidité et de la teneur en éléments minéraux du sol et les souches Rhizobienne y sont très sensibles. Ce sont des contraintes environnementales importantes qui peuvent perturber la croissance des Rhizobiums et donc diminuent la fixation du N₂ et la productivité des légumineuses. (Abolhasaniet *al.*, 2010).

5-1- Effet du pH

Le pH du sol est un facteur environnemental important car il limite la réponse de la plupart des légumineuses à l'inoculation. Chaque bactérie a son optimum de croissance dans lequel elle se développe le mieux. Bien que les conditions neutres avec des pH qui se situent entre 6 et 7 et seraient de 5,6 à 6,8 soient généralement les plus favorables pour une symbiose efficiente (Somasegaran et Hoben, 1994), différentes espèces de rhizobiums montrent des degrés variables de résistance aux pH mesurés par leur capacité de survivre et même de se développer (Fox, 2005). En général, ce sont des bactéries neutrophiles, mais il existe des bactéries qui tolèrent des pH à des seuils extrêmes. Le pH critique pour la croissance de *Rhizobium japonicum* et de *Rhizobium lupini* est compris entre 4 et 6. Les rhizobiums présentent des réponses variées face aux variations du pH (El-Hilali, 2006). La réponse à l'acidité se distingue selon les souches. A un pH de 4,5 les espèces appartenant aux genres *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* sont assez tolérantes et se développent rapidement, alors que *Rhizobium leguminosarum* peut croître à pH 5 (Reven et *al.*, 2002). La tolérance à l'acidité chez les bactéries serait liée à leur aptitude à réguler leur pH cytoplasmique (Dommergues et *al.*, 1999). La majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, ce qui indique que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums. Cependant, l'aspect négatif que présente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse, indispensables pour la croissance des rhizobiums (El-Hilali, 2006).

5-2- Effets de la température

L'influence de la température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol et sur leur croissance, cette dernière est déterminée par la mesure de la turgescence des cellules et sur l'action de leurs enzymes (Cloutier *et al.*, 1992). La température optimale pour la plupart des Rhizobiums est entre 25 et 30°C (Kulkarni et Nautiyal, 1999). Les réponses à la température varient considérablement suivant les souches impliquées, Il existe des exceptions de tolérance selon les souches. Certains *Rhizobium sp.* peuvent survivre à des températures supra- optimales de 52,5 et 55° C pendant 9 et 3h respectivement (Kulkarni et Nautiyal, 1999) alors que, *Mesorhizobium* tolère une température de 48°C pendant 15min (Laranjo et Oliveira, 2006).

Les hautes températures engendrent la déshydratation des cellules et la dégradation des enzymes des voies métaboliques des bactéries, inhibent la nodulation (Dommergues *et al.*, 1999) et par conséquent réduisent l'activité fixatrice de N₂ .

L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées. En général, ces bactéries sont tolérantes aux basses températures de l'ordre de 4°C. Cependant, il arrive qu'elles entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation, parfois irréversible des enzymes (Cloutier *et al.*, 1992).

5-3- Effets de la salinité

La salinité est nuisible à la croissance et la pérennité des souches rhizobiennes dans le sol. La tolérance au sel des rhizobia est très variable et dépend, probablement dans une grande mesure, de l'efficacité de leurs mécanismes d'osmorégulation (Brhada et Le Rudulier, 1995). Il a été rapporté que les sels de type chlorure sont plus toxiques pour les rhizobiums que les sulfates (El-Hilali, 2006). La plupart des rhizobiums sont inhibés par des concentrations de 100 mM en NaCl, mais il existe des souches dont la croissance est inhibée par 300 mM en NaCl et d'autres pour qui la salinité élevée constitue un obstacle pour leur survie.

5-4- Effets des nitrates

Les nitrates peuvent être des polluants lorsqu'ils sont en excès dans le sol, ils peuvent atteindre les nappes d'eaux souterraines et les cours d'eau. Bien qu'elles fixent l'azote de l'air par son association avec les fabacées, dans le cas où l'azote minéral est présent en masse et en quantité considérable, les rhizobia n'infectent pas les racines des légumineuses, l'activité fixatrice de N₂ est inhibée (Dommergues *et al.*, 1999). Cette apport d'azote minéral conduit à la répression de la synthèse de la nitrogénase (Dommergues *et al.*, 1999).

6- Les légumineuses (Le macro-symbiote)

Anciennement appelées Légumineuses ou «Papilionacées», les *Fabaceae* sont les plantes supérieures plus importantes. Classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones à gousses (Sprent, 1995), c'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. Elles sont abondantes et diversifiées avec plus de 727 genres et 20000 espèces (Cronk et al., 2006). Cependant, cette particularité de porter des fruits en forme de gousse fait d'elles le point en commun qui existe entre les différentes espèces (Caratini, 1984). Cosmopolites et omniprésentes, elles colonisent aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe. Elles constituent le groupe le plus important des plantes participant à la fixation de l'azote avec l'aide des bactéries symbiotiques. La majorité forme la symbiose avec les microorganismes telluriques qui appartiennent à la classe α -proteobacteria (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*) (Raven et al., 2000).

6-1- Classification des légumineuses

Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles et ceci est réalisé en se basant sur la forme florale de ces dernières. Deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième est paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont, 2005).

La sous-famille des *Caesalpinioideae*, avec une fleur pseudo-papillonacée ; comptent environ 150 genres et 2200 espèces. Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement.

La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd et al., 2001). Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres et environ 2500 espèces.

En fin, la sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes et la plus grande avec 476 genres et environ 14000 espèces (Doyle and Luckow, 2003). Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2005). En effet, leur fleur irrégulière est composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd et al.,

2001). Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbacées, mais comprenant aussi des arbres et des arbustes, présents en régions tempérées et tropicales (Crété, 1965). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995).

6-2 - Intérêt des légumineuses

L'aptitude à la fixation symbiotique de l'azote est l'intérêt agronomique primaire des légumineuses. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001). En somme, de nombreuses espèces constituent des ressources non négligeables en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo). De ce fait cette famille présente une importance économique majeure.

6-3- Taxonomie et caractéristiques du genre *Genista*

Les Genêts (*Genista*) sont des arbrisseaux ou sous-arbrisseaux très répandus, originaires des régions méditerranéennes, d'Europe de l'Ouest et d'Europe du Nord, d'Afrique du Nord et d'Asie, comprennent 76 espèces de petits arbustes, très florifères. Arbuste fréquemment épineux, le plus souvent persistant, dont les tiges sont très ramifiées, couchées ou dressées, portent des feuilles étroitement lancéolées, entières ou à trois folioles, et des grappes ou petits bouquets de fleurs papilionacées jaunes qui donnent des gousses gonflées, vert pâle, puis brunes. On les rencontre généralement dans les broussailles; en forêt, ils occupent surtout les clairières et les vides, se multipliant quand les arbres disparaissent, ils favorisent la reconstitution du boisement (Lapie et Maige, 1914).

Tableau 3 : Taxonomie de *Genista* (Crété, 1965).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	<i>Végétal</i>
Sous règne	<i>Trachéobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Phylum (Division)	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Dicotyledones (Magnoliopsidia)</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Super famille	<i>Légumineuses</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	<i>Fabiodeae</i>
Tribu	<i>Genisteeae</i>
Genre	<i>Genista</i>

7- Symbiose Rhizobium – légumineuses

D'un point de vue étymologique le mot symbiose provient du grec sym (avec) et biose (vie) d'où sa définition : vie avec ou vie en commun (Leffevre, 2004). En effet, ce terme désigne une association plus ou moins forte s'établissant entre deux organismes différents vivant ensemble, dans laquelle au moins l'une des deux espèces est bénéficiaire.

La symbiose légumineuse/Rhizobium est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous sa forme réduite. En échange, cette dernière fournit à son symbiote une niche écologique et les nutriments nécessaires à leur développement (Raven et *al.*, 2000). Elle se caractérise par la présence d'organes particuliers, situés au niveau de la racine appelés nodosités, au sein desquelles la bactérie réduit l'azote atmosphérique en ion ammonium (NH_4^+) grâce à la Nitrogénase (Figure 3), (figure 4)

7-1- La nitrogénase

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (Rees et Howard, 2000). Catalysant la réduction de l'azote gazeux (N_2) en ion ammonium (NH_4^+), la nitrogénase est très sensible à la

présence d'oxygène car ce dernier l'inhibe et fonctionne donc plus aisément chez les anaérobies. De très grande taille, elle comprend plusieurs sous unités, associant des protéines, des atomes de fer, du Molybdène qui est un oligoélément et un composant structural de la nitrogénase et de soufre. La réaction de fixation est très coûteuse en énergie. En effet, ce complexe fonctionne en consommant 16 ATP pour fixer une molécule d'azote (Tourte et *al.*, 2005).

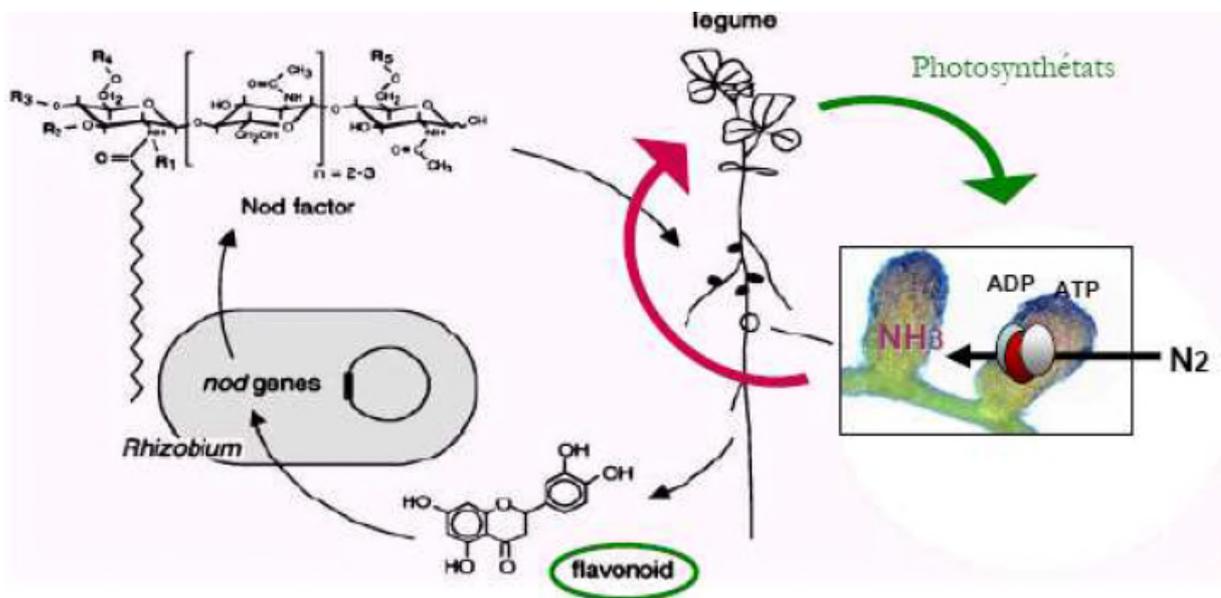


Figure 1 : le dialogue moléculaire de la symbiose légumineuse-Rhizobium (Rosenberg, 1997).

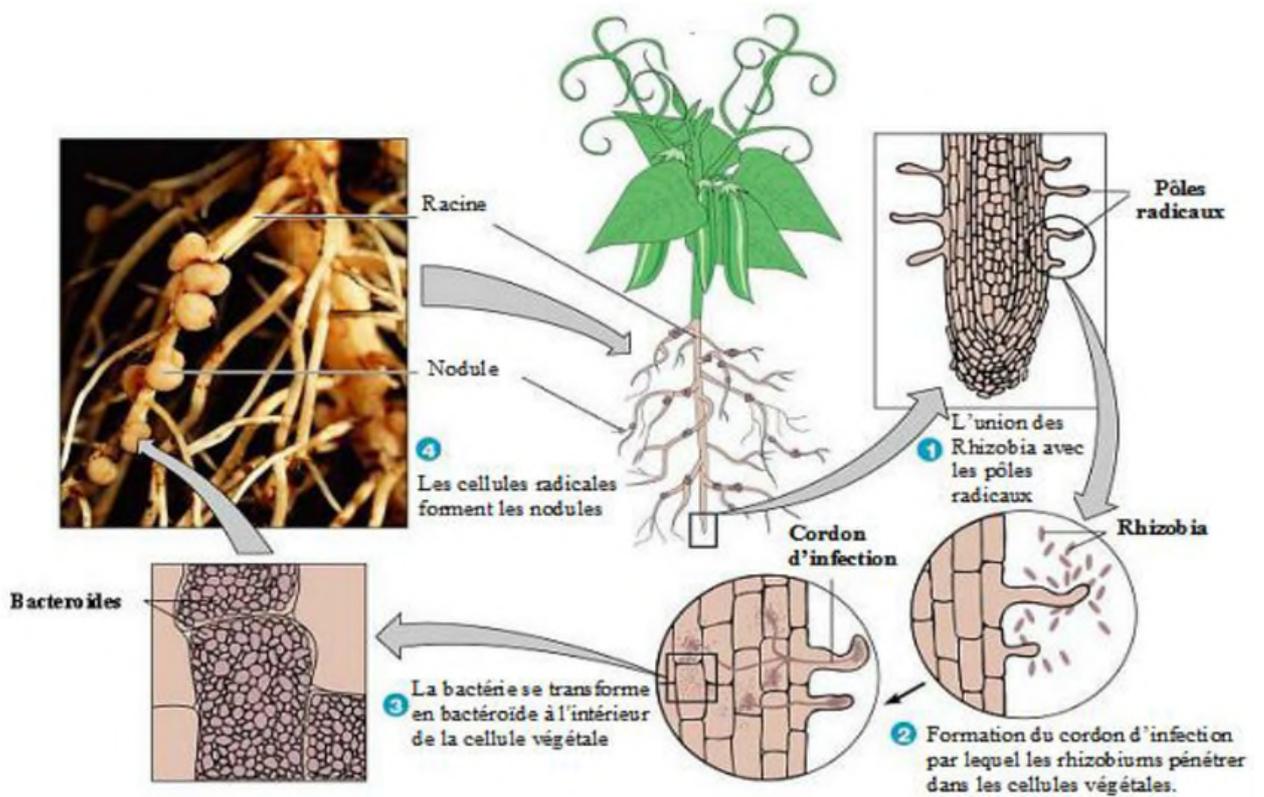


Figure 2 : Schéma résumant les différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobiale-légumineuse (Tortora et *al.*, 2003).

MATERIELS

ET

METHODES

1- Matériel biologique

L'étude est réalisée sur cinquante souches bactériennes appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne.

2- Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre (g/l) d'eau distillée. Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaires à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants :

- Milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth).
- Milieu solide YMA (Yeast Mannitol Agar).
- YMA+ Rouge de phenol (Yeast Mannitol Agar + Rouge de phenol)
- YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

3- Revivification et conservation des souches

Les souches sontensemencées sur milieu gélosé YMA en tubes inclinés et incubés à 28°C pendant plusieurs jours en vue d'une revivification, puis conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

4- Caractérisation des souches de rhizobiums

4-1- Caractéristiques culturelles des colonies

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu YMA après 7 jours d'incubation à 28°C. Ce test vise à étudier l'aspect, la forme, la couleur, l'opacité, l'élévation, la taille et la production des exopolysaccharides.

4-2- Caractéristiques morphologiques des bactéries

Il s'agit de la détermination de la forme, l'arrangement cellulaire et le Gram. Ainsi, une coloration de Gram a été utilisée pour mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et distinguer les bactéries dites Gram + des bactéries dites Gram -.

4-3- Caractérisation biochimique (Marchal et al., 1982)

4-3-1- Test de Bleu de bromothymol

Ce test permet de vérifier la capacité d'acidification ou d'alcalinisation des souches. Il se fait sur le milieu YMA additionné de l'indicateur coloré Bleu de Bromothymol (BTB) à une concentration de 0,0025% (w/v) (Annexe I). Après incubation à 28°C pendant 6 jours, le virage du milieu au jaune indique l'acidification du milieu et le virage au bleu indique l'alcalinisation du milieu.

4-3-2- Activité catalasique

Le test consiste à mettre les bactéries âgées de 48h en contact du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent l'enzyme catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène qui se manifeste par une effervescence (formation de bulles). (figure5)

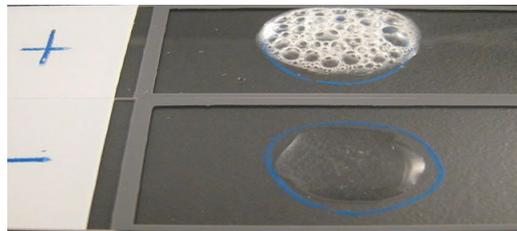


Figure 3 : Test de la catalase sur lame

4-3-3- Production d'indole

Certaines bactéries possèdent une tryptophane désaminase, enzyme qui dégrade le tryptophane en indole. Le test est effectué par l'inoculation par une suspension bactérienne du milieu eau peptonnée exempte d'indole. Les tubes à essai contenant ce milieu sont inoculés avec 0.1ml d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB. Après incubation à 28°C pendant 48h, on ajoute quelques gouttes de réactif de Kovacs à la surface du bouillon. On agite très légèrement. Une réaction positive se caractérise par la formation d'un anneau rouge en surface du bouillon en moins d'une minute. Par contre, une réaction négative se caractérise par une coloration brunâtre à la surface du milieu.

4-3-4- Réduction des nitrates

Ce test permet de mettre en évidence la présence de la nitrate réductase. Il est effectué par la culture d'une suspension bactérienne âgée de 48h dans des tubes qui contiennent du bouillon nitraté. Après 24h incubation à 28°C, la réduction des nitrates (NO_3) est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes de réactif NR1 et NR2. Dans le cas où

les bactéries possèdent la nitrate réductase, les nitrates (NO_3^-) seront réduits en nitrites (NO_2^-) ce qui se manifeste par une coloration rose ou rouge du milieu. Si le milieu reste incolore, ajouter un peu de poudre de zinc (réducteur des nitrates), si le milieu devient rouge, donc il reste des nitrates dans le milieu. La souche est considérée dans ce cas comme étant nitrate réductase négative (NR-). Dans le cas où le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries ont réduit les nitrates au-delà du stade nitrite ; les souches présentent une nitrate réductase très positive (NR+++), et elles possèdent les deux enzymes (la nitrate et nitrite réductases).

4-3-5- Utilisation des sucres comme seule source de carbone

L'utilisation des sucres comme source de carbone par les bactéries est effectuée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA additionné du rouge de phénol comme indicateur coloré et dont le mannitol a été remplacé à chaque fois par l'un des sucres suivants : Galactose, Glucose, Lévilose et Xylose. Le milieu à base du mannitol est utilisé comme témoin.

Les boîtes sont subdivisées en carrés et chaque carré a étéensemencé en spot à partir des colonies prélevées sur milieu YMA. L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'évaluation de la croissance des colonies bactériennes après incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures. Le virage de l'indicateur coloré du rouge vers le jaune est le résultat de l'acidification du milieu donc de l'utilisation des sucres.

4-4- Caractéristiques physiologiques

4-4-1- Effet du pH sur la croissance bactérienne

Le test est effectué dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA ajustés à des différents pH (4, 5, 8, 9 et 10). Les boîtes sont subdivisées en carrés et chaque carré a étéensemencé en spot à partir d'une culture réalisée dans le milieu YMB. La croissance bactérienne est évaluée par l'apparition de colonies bactériennes après 7 jours d'incubation à 28°C.

4-4-2- Effet de la température sur la croissance bactérienne

L'effet de la température d'incubation sur la croissance des souches est déterminé sur milieu YMA à pH = 6.8 aux températures suivantes : 45°C, 40°C, 37°C, 35°C.

Les lectures sont effectuées après 24h à 48h d'incubation, La croissance bactérienne est évaluée par lecture de la croissance des colonies bactériennes. (+ : il y a une pousse de colonie, - : pas de pousse de colonie).

4-4-3- Effet de la salinité sur la croissance bactérienne

L'effet du NaCl sur la croissance des souches est déterminé sur milieu YMA aux pourcentages croissants suivants : 1%, 2%, 3%, 4% et 5%. Les boîtes sont subdivisées en carrés et chaque carré a été ensemencé en spot à partir des colonies prélevées dans des tubes sur milieu YMB. La croissance bactérienne est évaluée par l'observation de la croissance des colonies bactériennes.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1- Caractères cultureux et morphologiques

1-1- Caractères cultureux

Les colonies apparaissent sur milieu YMA au bout de 5 jours. Ceci indique que leur vitesse de croissance est lente (Jordan 1982, 1984). Elle se distingue par une production d'exopolysaccharides (EPS) (Coronado et al., 1996). Elles ont une couleur blanche ou crème, de forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide et de petite taille.

1-2- Caractères morphologiques

L'examen microscopique des cellules bactériennes donne des bactéries de forme de bacille ou coccobacille à Gram négatif.

2- Caractérisation phénotypique

2-1- Caractéristiques biochimiques

2-1-1- Test du Bleu de Bromothymol (BTB)

Les résultats obtenus sur milieu YMA-BTB montrent qu'à l'exception des souches G1, G18, G20, G21, G23, G27 et G29 qui ont acidifié le milieu, toutes les souches testées alcalinisent le milieu (Tableau 4). Cette alcalinisation du milieu suggère l'appartenance de ces souches au genre *Bradyrhizobium* à croissance lente. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira et al., (1993).

Tableau 4 : Résultats du test du BTB

Souches	Alcalinisation	Acidification	Souches	Alcalinisation	Acidification
G1	-	+	G27	-	+
G2	+	-	G28	+	-
G3	+	-	G29	-	+
G4	+	-	G30	+	-
G5	+	-	G31	+	-
G6	+	-	G32	+	-
G7	+	-	G33	+	-
G8	+	-	G34	+	-
G9	+	-	G35	+	-
G10	+	-	G36	+	-
G11	+	-	G37	+	-
G12	+	-	G38	+	-
G13	+	-	G39	+	-
G14	+	-	G40	+	-
G15	+	-	G41	+	-
G16	+	-	G42	+	-
G17	+	-	G43	+	-
G18	-	+	G44	+	-
G19	+	-	G45	+	-
G20	-	+	G46	+	-
G21	-	+	G47	+	-
G22	+	-	G48	+	-
G23	-	+	G49	+	-
G24	+	-	G50	+	-
G25	+	-			

2-1-2- Test de la catalase et de la production d'indole

La plupart des souches étudiées présentent des caractéristiques biochimiques similaires. A l'exception des isolats G7, G9, G16, G33 et G49, la plupart possèdent la catalase (Tableau 5).

La production d'indole à partir du tryptophane est observée chez la plupart des souches sauf pour ses quelques G2, G6, G10, G13, G22 et G39 (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de l'activité catalase et de la production d'indole

Souches	EPEI	Catalase	Souches	EPEI	Catalase
G1	+	+	G27	+	+
G2	-	+	G28	+	+
G3	+	+	G29	+	+
G4	+	+	G30	+	+
G5	+	+	G31	+	+
G6	-	+	G32	+	+
G7	+	-	G33	+	-
G8	+	+	G34	+	+
G9	+	-	G35	+	+
G10	-	+	G36	+	+
G11	+	+	G37	+	+
G12	+	+	G38	+	+
G13	-	+	G39	-	+
G14	+	+	G40	+	+
G15	+	+	G41	+	+
G16	+	-	G42	+	+
G17	+	+	G43	+	+
G18	+	+	G44	+	+
G19	+	+	G45	+	+
G20	+	+	G46	+	+
G21	+	+	G47	+	+
G22	-	+	G48	+	+
G23	+	+	G49	+	-
G24	+	+	G50	+	+
G25	+	+			

2-1-3- Nitrate réductase

Le résultat du test de la réduction de nitrate est instantané. Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs de nitrate réductase (NR1+NR2), toutes les souches ont donné une couleur rouge qui confirme la réduction des nitrates en nitrites.

2-1-4- Utilisation des sucres

Les résultats des tests d'utilisation des glucides comme seule source de carbone et d'énergie montrent que toutes les souches assimilent le Galactose, le Glucose, le Lévilose ainsi que le Xylose, la dégradation des sucres par les souches étudiées est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique devient rouge et en milieu acide devient jaune.

2-2- Caractéristiques physiologiques

2-2-1- Effet de pH

Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des isolats et des souches de références testées sont capables de pousser entre le pH4 et pH10. Ceci montre que les souches testées dans cette étude présentent un large spectre de tolérance au pH, puisqu'elles sont capables de croître aussi bien à des pH acides qu'alcalins. Les résultats enregistrés tendent aux mêmes résultats avec ceux avancés par Maatallah et *al.*, (2002), qui ont aperçu la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH4 et pH supérieur à 7.5.

2-2-2- Effet de la température sur la croissance

Les résultats obtenus (Tableau 6) montrent que toutes les souches testées sont capables de croître entre 35°C et 45°C à l'exception des souches G2, G3, G9, G20, G21, G24, G27, G28, G39, G41, G47 et G49 qui n'ont pas pu se développer à la température 45°C. Ces résultats confirment la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia. Pour la plupart des Rhizobiums, l'intervalle de températures de croissance est situé entre 28°C et 31°C et nombreuses d'entre elles sont capables de croître à 37°C (Zahran, 1999).

Tableau 6 : Résultats de la croissance des bactéries à différentes températures

Souches	45°	40°	37°	35°	Souches	45°	40°	37°	35°
G1	+	+	+	+	G27	-	+	+	+
G2	-	+	+	+	G28	-	+	+	+
G3	-	+	+	+	G29	+	+	+	+
G4	+	+	+	+	G30	+	+	+	+
G5	+	+	+	+	G31	+	+	+	+
G6	+	+	+	+	G32	+	+	+	+
G7	+	+	+	+	G33	+	+	+	+
G8	+	+	+	+	G34	+	+	+	+
G9	-	+	+	+	G35	+	+	+	+
G10	+	+	+	+	G36	+	+	+	+
G11	+	+	+	+	G37	+	+	+	+
G12	+	+	+	+	G38	+	+	+	+
G13	+	+	+	+	G39	-	+	+	+
G14	+	+	+	+	G40	+	+	+	+
G15	+	+	+	+	G41	-	+	+	+
G16	+	+	+	+	G42	+	+	+	+
G17	+	+	+	+	G43	+	+	+	+
G18	+	+	+	+	G44	+	+	+	+
G19	+	+	+	+	G45	+	+	+	+
G20	-	+	+	+	G46	+	+	+	+
G21	-	+	+	+	G47	-	+	+	+
G22	+	+	+	+	G48	+	+	+	+
G23	+	+	+	+	G49	-	+	+	+
G24	-	+	+	+	G50	+	+	+	+
G25	+	+	+	+					

(+ : présence de colonies, - : absence de colonies).

2-2-3- Tolérance au NaCl

Les résultats obtenus montrent que de 1% à 5% de NaCl, la croissance des souches n'est pas affectée à l'instar d'un isolat, G2 qui montre une nette sensibilité à des concentrations faibles de NaCl allant de 1 à 2%, mais qui se développe à partir d'une concentration plus élevée allant de 3 jusqu'à 5%. La majorité des isolats demeure osmotolérants, il semble que ses bactéries développent des mécanismes de protection contre les pressions osmotiques par production de produits organiques ou inorganiques tels que le glutamate et K^+ (Botsford et *al.*, 1990).

CONCLUSION

Notre étude est une contribution à la recherche des caractéristiques phénotypiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des fabacées du genre *Genista*, une légumineuse cosmopolite capable de croître dans les sols semi arides, arides, pauvres en nutriment et dans des conditions physiologiques exceptionnelles. Cette caractérisation a pour but la détermination de la biodiversité phénotypique des bactéries symbiotiques de *Genista*.

Cinquante isolats nodulants *Genista* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique, basée sur l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les différents isolats présentent une croissance lente avec un aspect visqueux. Elles développent des colonies punctiformes, visibles après plus d'une semaine de culture à 28°C.

Les résultats du test nutritionnel sur milieu YMA-rouge de phénol montrent que les souches peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates comme source de carbone. L'examen microscopique des cellules bactériennes des isolats donne des bactéries de forme bacille et coccobacille à Gram négatif. La recherche des enzymes spécifiques pour la relation symbiotique démontre que les souches sont pourvues d'une nitrate réductase et de l'enzyme responsable de la production d'indole par la dégradation du tryptophane.

L'étude de l'effet des facteurs physiologiques montre que les isolats sont halotolérants et peuvent résister à une concentration élevée en NaCl allant jusqu'à 5% (855 mM). Cette tolérance serait probablement due au développement des mécanismes de régulation osmotique par les micro-symbiontes. Il apparaît aussi qu'ils peuvent croître en présence des températures élevées atteignant les 45°C qui leur confèrent les propriétés des bactéries thermo-tolérantes. Les résultats de l'effet du pH révèlent la croissance des isolats à des valeurs comprises entre pH4 et pH10.

En perspective, la collection des souches nodulantes l'espèce *Genista* est essentielle pour des travaux ultérieurs. La caractérisation phénotypique devra être soutenue par une caractérisation génotypique réalisée par des techniques de biologie moléculaire (hybridation ADN/ADN, séquençage de l'ADNr 16S) afin de situer avec précision leur statut taxonomique afin de pouvoir les classer et pour les utiliser dans le cadre de la réhabilitation des sites dégradés par la voie de la Bioremédiation.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abolhasani, M., Lakzian, A., Tajabadipou, A., Hanghnia, G. 2010.** The study of salt and drought tolerance of sinorhizobium bacteria to the adaptation to alkaline condition. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(5):882-886, 2010.
- Alexandre, A., Laranjo, M. et Oliveira, S. 2006.** Natural population of chickpea., 51 :128-136
- Babo, B. V., 2002.** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Université Laval, Québec.
- Brhada F., Le Rudulier D., 1995.** Osmorégulation chez les bactéries et chez Rhizobium en particulier: rôle de la glycine bêtaïne dans l'osmorégulation chez Rhizobium leguminosarum bv. viciae. In: Drevon J.J. (Ed): Facteurs limitant la fixation d'azote dans le Bassin Méditerranéen. INRA. Paris. pp 127-137.
- Caratini R; 1984-** Les plantes. Edit. Bordas, Paris, 194p.
- Cleland E E, Harpole W S. 2010.** Nitrogen enrichment and plant communities. New York Academy of Sciences. 1195: 46 –61.
- Cloutier J, Prevost D, Nadeau P et Antoun H. 1992.** Heat and Cold Shock Protein Synthesis in Arctic and Temperate Strains of Rhizobia. Applied and Environmental Microbiology. 58. Pp : 2846-2853.
- Coronado G.D, Thompson B, Tejada S, Godina R.** Attitudes and beliefs among Mexican Americans about type 2 diabetes. J Health Care Poor Underserved. 2004;15:576–88.
- Crété P. 1965.** Précis de botanique. Systématique des angiospermes. Tome II, 243.
- Cronk, Q., Ojeda, J., Pennington, R.T., 2006.** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Current Opinion in Plant Biology 9: 99-103
- De Faria SM, Lewis GP, Sprent JJ, Sutherland JM 1989.** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. New Phytol 111:607–619
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999.** Les arbres fixateurs de l'azote caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides .Ed . CIRAD, Edition Espaces, FAO .IR. Montpellier. France. 499p.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology 131: 900–10.
- Duhoux, M., and Nicole, M. 2004.** Biologie Végétale. Associations et Interactions chez les plantes. Dunod.

- El-Hilali I., 2006.** La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des micro symbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez lupins luteus. Thèse de doctorat. Université Mohammed – AGDAL .Faculté des sciences. Rabat
- Elsiddig A E, Elsheikh, 1998 :** Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review Ann. appl. Biol. (1998), 132 pp 507-524 Printed in Great Britain.
- Frank, B. 1889.** Uber die Pilzsymbiose der Leeguminosen Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 7:332-346.
- Gany F., Dommerges Y.R.** 1995. Arbres fixateurs d'azote champ ouvert pour la recherche. Agriculture et développement ed.7 : 38-55
- Guignard J.L., Dupont F., 2005.** Botanique. 13ème Edition Masson.
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie vegetale.Université ses sciences et Technologie de Lille. Edition de Boeck.
- Howard JB, et D.C. Rees (2000)** Structure of the nitrogenase protein components. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific
- Jordan D.C., 1984:** Rhizobiaceae. In N.R.Kriegand J.G.Holt(ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp 234-245.
- Jordan, D.C., 1982:** Transfer of rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, Int. J. Syst. Bacteriol. 32 pp 136-139.
- Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. & Stevens P. 2001** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck.
- Kulkarni S, Nautiyal CS. 1999.** Effects of Salt and pH Stress on Temperature-Tolerante Rhizobium sp. NBR1330 Nodulating Prosopis juliflora. Current microbiology. 40. Pp : 221-226.
- Lévêque C., Mounoulou J.C., 2001.** Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.
- Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002.** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (Cicer arietinum) growing in Moroccan soils. Agronomie. 22: 321– 329.
- Madigan M., Martink J., 2007.** Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France. pp 599 - 601, 676 - 681.

- Marchal N. ; Obre A. ; Button R. ; Boudon J.L. et Richard C.L. 1982).** Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris.482p.
- Mohamed, S.H., Smouni, A., Neyta, M., Kharchaf, D., et Filali-Malouf, A. 2000.** Phenotypic characteristics of root nodulation bacteris isolated from Acacia ssp.Grown in Libya.Plant and soil. 224: 171-183.
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement : adaptation physiologique. Vol 2. Office
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement adaptation physiologique. Ed Dunod. France.
- Peret B. 2007-** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical Casuarina glauca. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France.
- Publications Universitaires, PP 897-906.onal Biological Programme [by] Blackwell Scientific,164 P
- Pujic P., Normand P. 2009.** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. Biofector. 28. (298). pp 26-29.
- Raven P., Johnson G., Losos J., Singer S., 2007 -** Biologie, 1er edition ISBN Paris, 120p.
- Renier A. 2008.** Approche pluridisciplinaire de la symbiose *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa*, Thèse de Doctorat de l'Universite Montpellier II – France.
- Roger P., 1996.** La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le developpement? Conférence débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.
- Schneider A., Huyghe C., Coordinareurs., 2015 :** Les fabaceae pour des systèmes agricoles et alimentaires durables, Ed Quae, 462 P
- Somasegaran P., Hoben H.J. 1994.** Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology .P.450.Springer-Verlag.new York.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin. Strains in the rhizosphere of Egyptian clover in relation to salt stress and pattern of competition.464p.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Sringer verlage New York. Inc .pp 450.
- Sprent J.I., 1995.** Legum trees and shrubs in topic : N2 Fixation in perspective. Soil Biol. Biochem 27:401-407.
- Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003:** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. pp 826-830.
- Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005: Le monde des végétaux organisatio, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.

Tourte Y., Bordonneau M., et Tourte C., 2005. Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris.

Vincent, J.M., 1970: A manual for the practical study of the root-nodulebacteria. Internati

Références électroniques

- <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>
- [indesirables.htmlhttp://plantillustrations.org/species.php?id_species=457655:](http://plantillustrations.org/species.php?id_species=457655)

Annexes

Composition du milieu : Yeast-mannitol-Agar (YMA) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Agar.....	15g
H ₂ O.....	1L

Ajuster le pH à 6.8, Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu : Yeast-mannitol- Broth (YMB) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
H ₂ O.....	1L

Ajuster le pH à 6.8, Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Résumé : Cette étude est une contribution à la caractérisation phénotypique des bactéries symbiotiques et fixatrices d'azote, nodulant des espèces de légumineuses appartenant au genre *Genista*. Cinquante (50) souches sélectionnées ont fait l'objet d'une caractérisation. Les bactéries isolées font l'objet d'une caractérisation morphologique suivie d'une caractérisation physiologique et biochimique. Ces critères phénotypiques étudiés permettent de déterminer la similitude entre les souches de cette collection et les souches de référence. Ainsi, à travers l'analyse de l'ensemble des tests réalisés, les différents affichent des similitudes élevées avec le genre *Bradyrhizobium*.

Mot clés : *Genista*, nodulation, caractérisation phénotypique, *Bradyrhizobium*.

Abstract: This study is a contribution to the phenotypic characterization of symbiotic and nitrogen-fixing bacteria, nodulating legume species belonging to the *Genista* genus. Fifty (50) selected strains were characterized. Isolated bacteria are subject to morphological characterization followed by physiological and biochemical characterization. These phenotypic criteria studied make it possible to determine the similarity between the strains of this collection and the reference strains. Thus, through the analysis of all the tests carried out, the different ones display high similarities with the genus *Bradyrhizobium*.

Key words: *Genista*, nodulation, phenotypic characterization, *Bradyrhizobium*.