

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 des Sciences Biologiques de l'Environnement
Filière : Ecologie et Environnement
Option : Ecologie



Réf.....

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

MASTER

Thème

**Etude de l'effet de température sur la croissance des
souches rhizobiennes isolées de zones arides**

Présenté par :

IDIR Sofiane & OUBRAHAM Aissa

Soutenu le : 24 juin 2018

Devant le jury composé de :

Mr HAMLAT Mourad	MAA	Président
M ^{me} DJAFRI Linda	MAA	Examinatrice
M ^{me} BOULILA Farida	MCA	Promotrice
M ^{me} AHNIA Hadjira	Magister	Invitée

Année Universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

*Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, ainsi que notre respect pour notre promotrice **Mme Boulila Farida** pour son accueil au sein du laboratoire écologie microbienne et également pour sa bienveillance, ses conseils qu'elle nous a transmis durant la période de la réalisation de ce travail*

*Nous exprimons nos sincères remerciements pour notre co-promotrice **Mme AHNIA Hadjira** pour le précieux temps qu'elle nous a consacré, ses conseils et les connaissances qu'elle nous a transmises*

*Nous remercions vivement les membres de jury **Mr HAMLAT Mourad** et **Mme BOUALLAG Lynda** d'avoir examiné notre travail*

*Sans oublier de remercier les doctorantes du laboratoire écologie microbienne **Wafa, Lilia, Safia**, pour leur aide et leur encouragement*

*Nos remerciements à **Mr BELHADI Djellali** et **Mlle BOUREBABA Yasmina**, pour leur orientations dans le domaine de l'écologie microbienne*

J'adresse mes sincères remerciements aux camarades de la promotion écologie



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chères parents, BAHIA et BRAHAM qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études.

Que Dieu les garde pour moi en bonne santé et leurs donne une longue vie pour qu'ils assistent à tous mes succès.

À mes très chères sœurs : Chahinaz et Imane

À toute ma grande famille sans exception

À toutes mes amies sans exception.

À tous ceux qui ont une place dans mon cœur

À toute la promotion d'Ecologie 2017/2018



Sofiane

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents Liamine et Nora qui m'ont encouragé et suivi durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leur sacrifices, leur patience sans limite et l'éducation qu'ils m'ont donné je leurs dis merci mille fois

Je ne pourrais jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à : mes chers freres Fares et Redouane et mes sœurs Fouzia et Amina

Mes grands parents mohamed et randja et ma tante Lila

Et mes neveux Achraf Baya abd arrahim yasmine et nour el houda

Egalement je dédie ce travail a mes amis et mes camarades de la section écologie

Et tous ce qui ont contribué de près ou de loin a la réalisations de ce travail



Aissa

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Cycle de l'azote	02
1.1. Microorganismes fixateurs d'azote	03
1.1.1. Fixateurs libres	04
1.1.2. Fixateurs symbiotiques	04
2. Symbiose rhizobia-Légumineuses	04
2.1. Légumineuses	04
2.1.1. Classification des Légumineuses	05
2.1.2. Intérêt des Légumineuses	06
2.2. Rhizobia	07
2.3. Aspect génétique de la symbiose Légumineuses-rhizobia	08
2.4. Intérêt de la symbiose rhizobia-Légumineuses	09
3. Facteurs influençant la symbiose rhizobia-Légumineuses	09
3.1. Stress thermique	09
3.2. Stress salin et osmotique	09
3.3. Stress hydrique	10
3.4. Acidité	10
3.5. Métaux lourds	10
3.6. Effet de la carence en nutriment	10
3.7. Effet des pesticides	10
3.8. Stress hydrique	10

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique	11
2. Méthodes	11
2.1. Revivification des souches	11
2.2. Caractérisation phénotypique des colonies	11
2.2.1. Observation des caractères morphologique des souches étudiées	11
2.2.2. Caractérisation cellulaire	11
2.2.3. Caractérisation biochimique des souches étudiées	12
2.3. Effet de la température sur la croissance des souches	16
3. Analyse numérique des données	17

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractérisation phénotypique des souches étudiées	18
1.1. Morphologie des colonies	18
1.2. Caractérisation cellulaire	19
1.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes	19
2. Effet de la température sur la croissance des souches testées	22
3. Analyse numérique des données	23
<i>Conclusion et perspectives</i>	26
<i>Références bibliographiques</i>	27

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Cycle d'azote.....	3
Figure 2 : Processus de nodulation.....	8
Figure 3 : Méthode utilisé pour observer les souches à l'état frais	12
Figure 4 : Préparation des galeries	14
Figure 5: Aspect des colonies, exemple des souches S5 et S2, obtenues sur milieu YMA... 18	
Figure 6: Observation microscopique à l'état frais, prise comme exemple la souche S5 (Grossissement 10 ×40).....	19
Figure 7 : Coloration de Gram, prise comme exemple la souche S5 (Grossissement 10 ×100).....	19
Figure 8 : Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries (S9 et S5).....	21
Figure 9 : Effet de la température sur la croissance des souches testées.....	23
Figure 10 : Dendrogramme de la CAH.....	25

Liste des tableaux

Tableau I : Composition de la galerie API 20 NE.....	13
Tableau II : Caractères morphologiques des souches.....	18
Tableau III: Résultats de la caractérisation biochimique.....	21
Tableau IV : coefficient de similitude inter- souches étudiées	24

Introduction

L'Algérie comme toute la région méditerranéenne a une flore très spécifique et très diversifiée, relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide, semi-aride et aride. Elle se caractérise par une grande diversité de Légumineuses spontanées et cultivées.

Les zones arides sont connues par une longue saison de sécheresse (9 à 10 mois), une intense évaporation, des températures élevées, forte teneur en sels minéraux notamment NaCl et de manque de précipitations (Le Houérou, 2001).

Depuis longtemps, l'Homme des régions arides a utilisé des différentes espèces végétales adaptées à la sécheresse notamment des légumineuses pour leur efficacité dans la fertilisation et la restauration des sols. Ceci grâce à leur pouvoir à entrer en symbiose avec les rhizobiums (Graham et Vance, 2003).

La symbiose légumineuse – rhizobia permet de fixer l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges de légumineuses. En effet elle est très bénéfique sur plusieurs plans agronomique, économique et écologique; elle diminue l'utilisation des engrais azotés qui sont coûteux et polluants, et donc réduit leur danger sur l'environnement.

Cette symbiose légumineuse – rhizobia peut être perturbée par des facteurs abiotiques telles que les hautes températures, stress hydrique, l'acidité et d'autres facteurs surtout dans les zones arides (Sulieman et *al.*, 2013).

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de notre travail qui consiste à étudier l'effet de la température sur la croissance des souches rhizobiennes isolées de zones arides d'Algérie.

Synthèse bibliographique

1. Cycle de l'azote

Parmi les plus importants facteurs limitant la croissance et de développement d'un végétale on retrouve l'azote, qui représente 80% dans l'atmosphère terrestre (Cleland et Harpole, 2010).

Le bon fonctionnement du cycle d'azote (figure 1) se base sur des processus naturels de fixation, d'assimilation, d'ammonification, de nitrification et de dénitrification. Ces processus sont impliqués dans le recyclage de l'azote atmosphérique (Deronzier et *al.*, 2001).

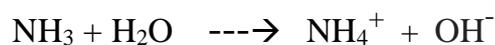
L'azote se transforme sans cesse d'une forme minérale à une forme organique. Les principaux producteurs de matière organique sont les plantes notamment les légumineuses qui utilisent l'azote fixé ou les ions NO_3^- pour fabriquer des protéines. Ces dernières rentrent dans la chaîne alimentaire. Les animaux transforment cette matière fournie par les plantes pour fabriquer leur propre matière organique; les protéines de la viande. Après leur mort, les microorganismes décomposent cette matière organique. Cette décomposition permet la production de l'azote sous forme minérale (minéralisation ou ammonification) (Burdass, 2002).

Elle se fait grâce à des microorganismes du sol (bactéries, mycètes). L'hydrolyse de cette matière fournie du CO_2 et de l'ammoniac (NH_3). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+ .

Hydrolyse de l'urée



Ammonification



Les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomas*, *Nitrobacter*), transforment le NH_4^+ en nitrate (NO_3^-) dans le sol qui peut être assimilé par les plantes. Toute en participant au recyclage d'azote.



Les légumineuses notamment les fourragères présentent un atouts par leur teneur élevée en azote et leur capacité d'apporter une fertilisation azotée naturelle (Aufreere et *al.*, 2012).

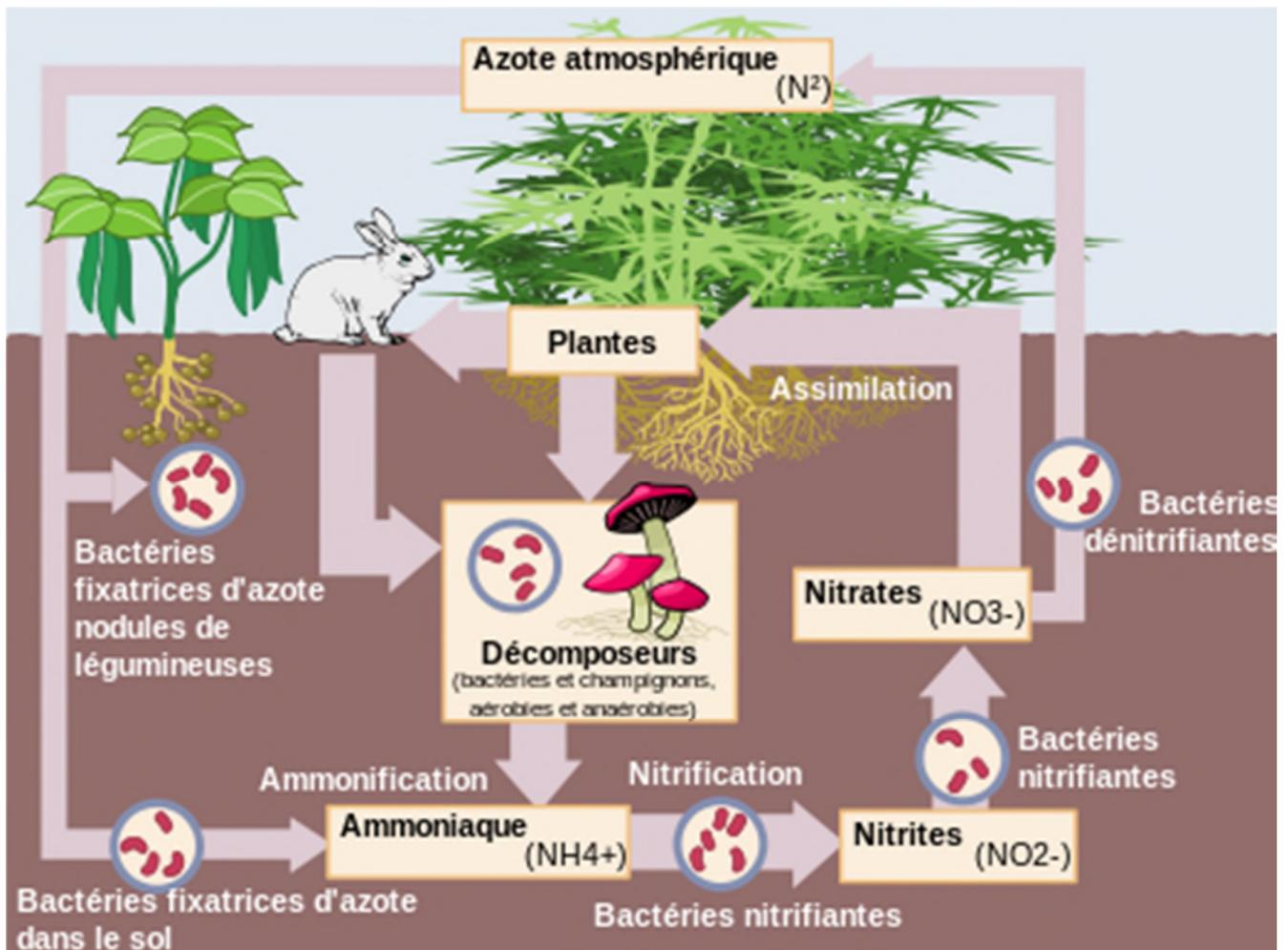


Figure 1 : cycle d'azote (Pujic, 2009)

1.1. Microorganismes fixateurs d'azote

La fixation biologique de l'azote est le processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère.

Cette transformation de l'azote atmosphérique en azote minéral s'effectue grâce aux microorganismes. Cette activité a été largement exploitée en pratique agricole. Elle est aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse (Zahran, 1999).

Les microorganismes fixateurs d'azote sont classés en deux groupes ceux qui vivent à l'état libre et d'autre qui sont symbiotiques (Pelmont, 2005).

1.1.1 Fixateurs libres :

Ces fixateurs libres appelés aussi bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques, vivant à l'état libre, et ne requièrent pas l'hôte pour effectuer le processus. On distingue deux groupes :

- ✓ Bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*
- ✓ Bactéries anaérobies : *Clostridium*, *Nitrobacter*

1.1.2. Fixateurs symbiotiques

Les fixateurs symbiotiques sont des microorganismes tels que des bactéries communément appelées rhizobia qui rentrent en symbiose avec des plantes (les légumineuses). Ces rhizobia fixent et réduisent l'azote atmosphérique au niveau des nodosités, qui sera alors utilisé par la plante. Cette association symbiotique légumineuses avec les rhizobia est considérée comme un processus indispensable à la plante pour acquérir une source d'azote, et en contrepartie la bactérie reçoit des composés carbonés et l'énergie nécessaire pour son développement (Torche et *al.*, 2010).

2. Symbiose rhizobia-Légumineuses :

Le processus d'une symbiose fixatrice d'azote (rhizobia-légumineuses) se traduit par la capacité des rhizobiums à induire la formation des nodules au niveau des racines ou des tiges d'une plante hôte.

Les légumineuses notamment celle qui sont arbustes établissent une symbiose avec des rhizobia fixateurs d'azote. Ce qui permet d'améliorer la fertilité du sol, faciliter la croissance d'autres espèces végétales et d'éviter l'érosion et la désertification (Rodriguez et Peirez, 2003).

La bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et *al.*, 2000).

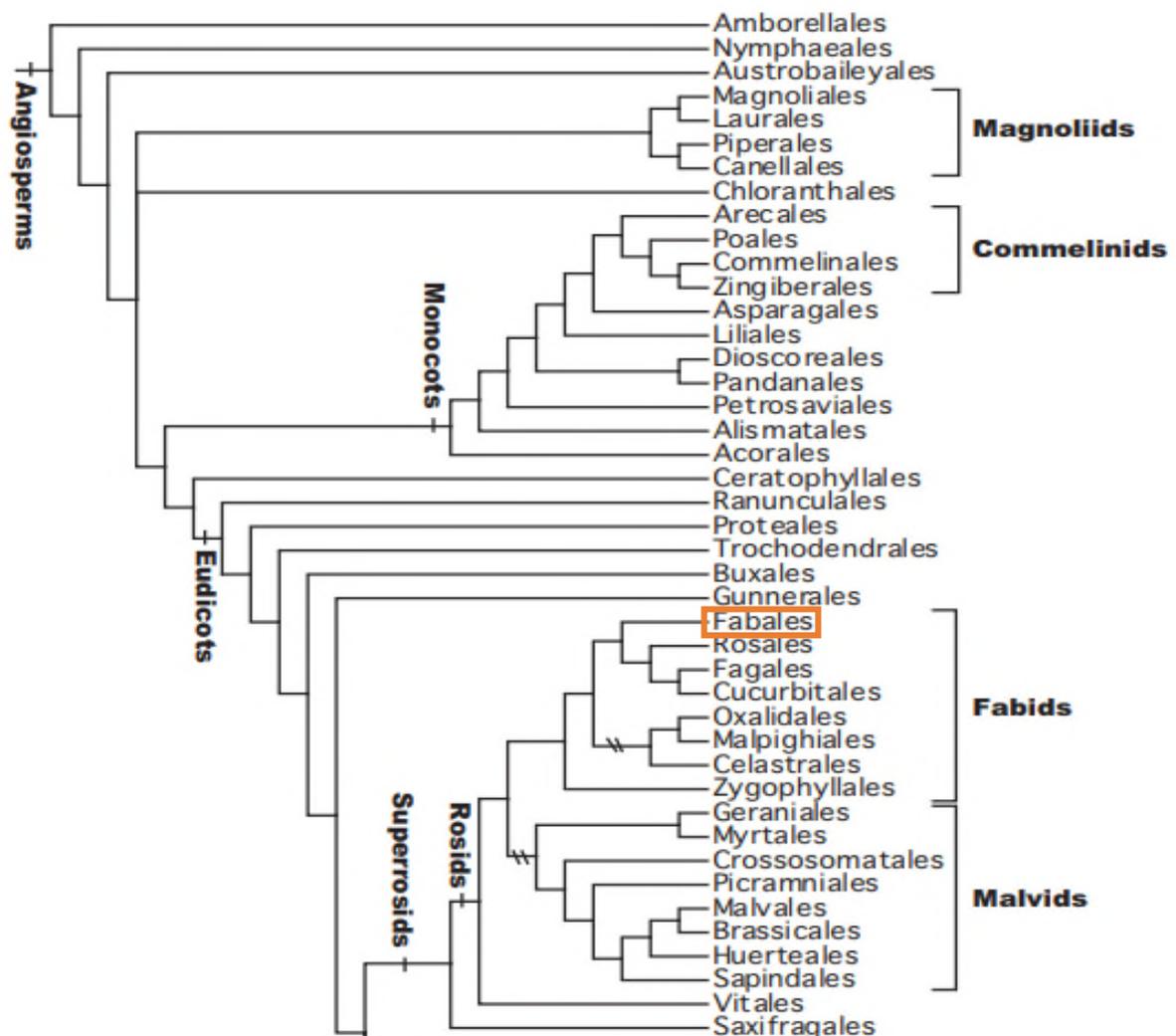
2.1. Légumineuses

La méditerranée est très riche et diversifier en plants notamment les légumineuse. Cette famille regroupe une importante variété d'espèces végétales cultivées partout dans le monde : le soja, l'arachide, le haricot, les pois, les fèves et les lentilles sont les légumineuses les plus cultivées. On peut distinguer deux types de légumineuses :

- les **Légumineuses fourragères** sont utilisées dans l'alimentation des herbivores (pâturage, foin, ensilage). On retrouve dans ce groupe : la luzerne, le lupin, le lotier, les trèfles et la vesce.
- les **légumineuses à grains comestibles par l'homme** : le soja, la féverole, la lentille, la fève, le haricot, le pois et le pois chiche.

2.1.1. Classification des Légumineuses

Selon APG IV 2016 (Angiosperm Phylogeny Group), la famille des légumineuses est classée comme suit.



La famille des *Leguminosae* est très diverse avec 3 sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, et *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003) et compte environ 20 000 espèces classées en 750 genres (Gepts et al., 2005). Cette dernière sous famille regroupe notamment des espèces cultivées les plus importantes économiquement comme le haricot, le soja, le pois, le pois chiche l'arachide ... etc.

❖ *Caesalpinioideae*

La plupart des *caesalpinioideae* sont des arbres ou des arbustes tropicaux subtropicaux avec une fleur pseudo-papilionacée, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces. 23% seulement des espèces parmi celles examinées pour leur nodulations.

❖ *Mimosoideae*

La plupart sont des arbres tropicaux avec une fleur régulière, petite. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées pour leur nodulations. (Maxted et Bennett, 2001).

❖ *Papilionoideae*

Cette sous famille est la plus abondante, renferme plus de 12600 espèces dans 429 genres (Judd et al., 2002). Ce sont principalement des plantes herbacées, vivaces ou annuelles et sont largement distribuées dans le monde (Räsänen, 2002).

Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum L*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris L*); mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage tels que la luzerne (*Medicago sativa L*) et le Sulla (*Hedysarum coronarium L*) (FAO, 1996).

2.1.2. Intérêt des Légumineuses

Les légumineuses sont des sources importantes de différents nutriments comme les protéines, les minéraux et les lipides. Elles sont aussi utilisées comme fourrage vert ou de plante de pâturage (Vascoucelos, 2016).

✓ Intérêt agronomique

Les légumineuses, ont un intérêt agronomique comme engrais vert (Borget, 1989). Elles participent à la fertilisation des sols par leur capacité de fixer l'azote atmosphérique. L'agriculture biologique a pour but de produire une alimentation en qualité tout en protégeant les ressources naturelles (Van Bol, 2000).

✓ Intérêt alimentaire

Les légumineuses fournissent pour l'alimentation humaine 32% des protéines végétales, et 32% des matières grasses, et pour l'alimentation animale elles fournissent 38% des protéines et 21% des lipides et glucides (Neyra, 1992).

✓ Intérêt économique

Les légumineuses, ont un intérêt agronomique comme engrais vert, cela permet de réduire l'utilisation des engrais chimique qui sont couteux et polluant, et l'augmentation de rendement des cultures.

2.2. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries qui possèdent une forme bâtonnet de Gram négatif, et strictement aérobie (Jordan, 1984). Ces bactéries forment une symbiose avec les légumineuses sur les quelles forme les nodules racinaires (Franck, 1989). Elles peuvent se trouver soit libre dans le sol soit en symbiose avec une légumineuse (Maidak et al., 1994).

Les rhizobia sous forme végétative sont de longueur 1,2 à 3 μm de et sur 0,5 à 0,9 μm de largeur, pourvus d'un flagelle polaire, ou de plusieurs flagelles péritriches. Les rhizobia pourvus de 2 à 6 flagelles sont caractérisés par une croissance rapide, tandis que les rhizobia à un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance lente. Le flagelle polaire les permet d'être mobiles (Worner, 1992).

À l'intérieur des nodules elles se transforment en bactéroïdes de forme. Les individus sont irréguliers et ont une taille plus grande que celle de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

❖ Classification actuelle des rhizobia :

Les rhizobia appartiennent au domaine Bacteria, au phylum proteobacteria. Ils se répartissent en 482 espèces et 13 genres (Wier, 2016), ces genres sont :

- *Rhizobium* qui contient 111 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 46 espèces
- *Ensifer (formerly Sinorhizobium)* contient 21 espèces.
- *Bradyrhizobium* contient 40 espèces.
- *Burkholderia* contient 120 espèces.
- *Azorhizobium* contient 2 espèces.
- *Microvirga* contient 16 espèces.
- *Phyllobacterium* contient 11 espèces.
- *Ochrobactrum* contient 18 espèces.
- *Methylobactérieum* contient 52 espèces.
- *Cupriavidus* contient 16 espèces.

- *Devosia* qui contient 22 espèces.
- *Shinella* qui contient 7 espèces.

2.3. Aspect génétique de la symbiose Légumineuses-rhizobia

Les deux partenaires légumineuses-rhizobia possèdent des gènes de symbiose qui ne devient fonctionnelles que seulement en symbiose (Djordjevic et *al.*, 1987).

Au début les deux partenaires légumineuses et rhizobia entrent en contact par l'émission des composés chimiques par les racines de la plante, et l'activation des gènes nod de la bactérie au niveau de la surface du poil racinaire (figure 2). Ces poils seront un lieu très favorable à la prolifération des bactéries, alors il se forme un passage apical et long qui s'appelle le cordant d'infection. Ensuite il y aura une division bactérienne et le début de l'organogenèse nodulaire. Les bactéries se transforment en bacteroides qui sont capables avec cette forme de réduire l'azote atmosphérique en ammonium (Wang et *al.*, 2012).

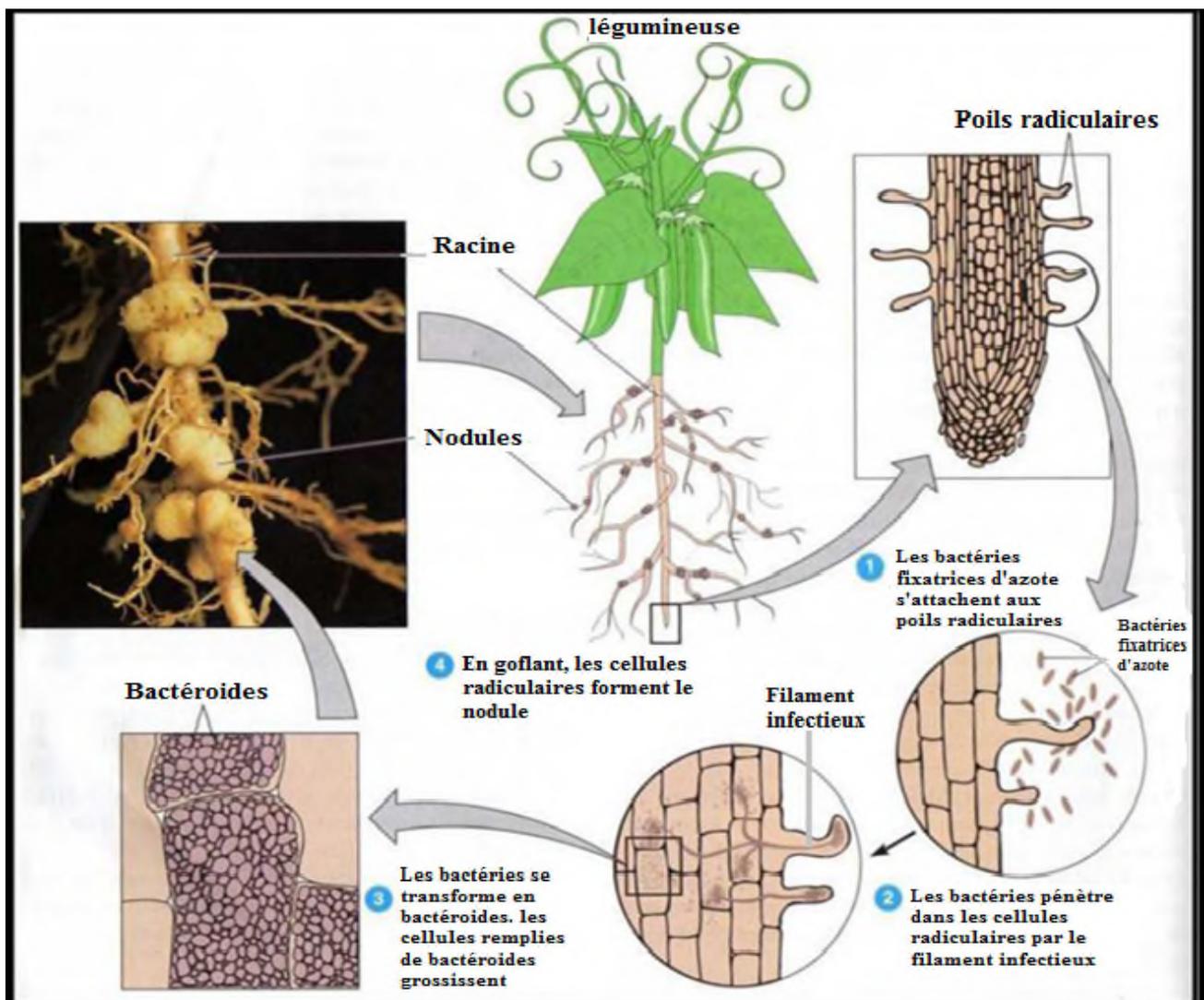


Figure 2: Processus de nodulation (Tortora et *al.*, 2003).

2.4. Intérêt de la symbiose rhizobia-Légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuse avec sa capacité remarquablement élevée de fixer l'azote atmosphérique, représente la solution pour l'accroissement de la production alimentaire dans les diverses régions de monde. Donc, elle peut contribuer considérablement à l'accroissement de la productivité agricole, à l'économie d'engrais coûteux en devise et en énergie (Neyra, 1997). Ainsi, elle fournit la plus grande quantité en azote biologique dans les systèmes d'exploitation agricole (O'Hara, 2002).

Elle aide aussi à la restauration de la fertilité des sols, à la réhabilitation de terre dégradée et à la limitation de la pollution des nappes phréatiques par les nitrates (Neyra, 1997)

Les rhizobia forment avec les légumineuses une association symbiotique qui est une des interactions les plus importantes entre deux partenaire plante et microorganisme (Madigan et Martinko, 2007).

3. Facteurs influençant la symbiose rhizobia- Légumineuses

Le bon fonctionnement de la symbiose rhizobia légumineuse peut être perturbé par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques, en limitant la croissance et développement des plantes.

3.1. Stress thermique

La fixation biologique de l'azote dans les zones tropicales et désertiques est perturbée par la température élevée (Michiels et *al.*, 1994).

La majorité des rhizobia ne peuvent pas se développer à une température plus de 37°C. La température de la croissance optimale des rhizobia est de 28 °C (Graham, 1992).

3.2. Stress salin et osmotique

La salinité est une menace pour l'agriculture dans les régions arides et semi-arides. Près de 40% de la surface terrestre mondiale peut être classée comme ayant des problèmes potentiels de salinité.

Le stress salin ou osmotique perturbe les symbioses rhizobia-légumineuses ainsi que la formation des nodules sur les racines des légumineuses.

3.3. Stress hydrique

En condition de déficit hydrique, la croissance et la survie des rhizobia sont affectées (Hungria et Vargas, 2000). La nodulation est réduite (Sangakkara et *al.*, 1996) et le fonctionnement de nodules (fixation de N_2) est diminué (Lazali, 2009).

3.4. Acidité

L'acidité du sol limite la fixation symbiotique de N_2 à la fois limitant la survie et la persistance du rhizobia dans les sols (Zahran, 1999).

3.5. Métaux lourds

Les métaux lourds sont toxiques même à une petite dose. Ces métaux affectent la croissance de la plante et la fixation d'azote par les microorganismes telluriques (Gusmão-Lima et *al.*, 2005).

3.6. Effet de la carence en nutriment

Le manque des nutriments peut perturber la fixation symbiotique d'azote, car il affecté directement la multiplication des rhizobia (Delgado et *al.*, 1994).

3.7. Effet des pesticides

Les pesticides affectent le sol et la structure biochimique des microorganismes, ce qui a un effet néfaste sur la symbiose entre le partenaire végétal et bactérien (Rennie et *al.*, 1985).

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

Neuf souches de rhizobia représentatives d'une collection appartenant au Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) ont été utilisées. Ces souches isolées de nodules racinaires de légumineuses des zones arides sont codées de 1 – 9. Une souche de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium cytisi* (Chahbourne et al., 2011) a été prise en considération à titre comparatif.

2. Méthodes

2.1. Revivification des souches

Les souches qui étaient conservées à -80°C ont été cultivées sur boîte pétri pendant plusieurs jours à 28°C afin de les revivifier et activer leur métabolisme.

2.2. Caractérisation phénotypique des colonies

Ces souches ont fait l'objet d'étude de quelques paramètres phénotypiques.

2.2.1. Observation des caractères morphologique des souches étudiées

Les souches étudiées y compris la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi* ont été cultivées sur milieu solide YMA contenant de l'extrait de levure et du mannitol (Annexe I) pendant 8 jours à 28°C.

L'observation macroscopique permet de déterminer les caractères cultureux tels que : la vitesse de croissance, la texture, la couleur de colonie, la taille et la forme des colonies des souches étudiées.

2.2.2. Caractérisation cellulaire

Les souches ont été cultivées sur milieu liquide YMB (Annexe I) pendant 8 jours à 28°C. La mobilité, la forme et le Gram ont été déterminés par observation au microscope optique. En effet l'observation d'une suspension bactérienne permet de mettre en évidence la forme et la mobilité des souches étudiées sous microscope optique (Gx100) (Figure 3).

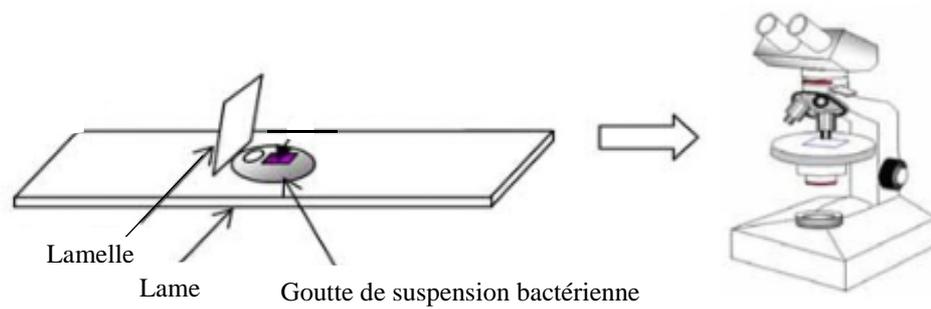


Figure 3 : Méthode utilisé pour observer les souches à l'état frais.

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux groupes distincts ; Gram + et Gram -, par leur affinité pour les colorants. À cet effet nous avons appliqué ce test sur les souches étudiées en suivant la technique classique qui consiste à :

- ✓ préparer un frottis sur une lame.
- ✓ recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- ✓ verser sur la lame la solution iodée (lugol) et laisser agir pendant 30 secondes.
- ✓ Rincer à l'alcool.
- ✓ laver à l'eau distillée pour arrêter l'action de l'alcool.
- ✓ recouvrir la lame par la fuschine et laisser agir pendant 1 minute.
- ✓ laver à l'eau distillée.
- ✓ observer au microscope (Gx100).

2.2.3. Caractérisation biochimique des souches étudiées

Afin de caractériser les souches biochimiquement un test de galerie Api 20 NE a été réalisé. La galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactérie. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substances déshydratés (Tableau I).

Tableau I : Composition de la galerie API 20 NE

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup)	Réactions/Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
NO ₃	Potassium nitrate	0.136	Réduction de Nitrates en nitrites	N1+N2/5min	
			Réduction de Nitrites en azote	Incolore	Rose-jaune
TRP	L-tryptophane	0.2	Formation d'indole (Tryptophane)	Zn/5min	
				Rose	Incolore
GLU	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUcose)	JAMES/immédiat	
				Incolore vert pâle/jaune	Rose
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	Bleu à vert	jaune
URE	Urée	0.76	UREase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56 0.072	Hydrolyse (β-glucosidase) (ESCulline)	Jaune	Gris/maron/noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galacopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-Nitro-Phényl-βDGalactopyranosidase)	Incolore	jaune
GLU	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acétyl Glucosamine)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1.4	assimilation (Maltose)	transparence	trouble
GNT	Potassium gluconate Acide	1.84	assimilation (potassium GlucoNate)	transparence	trouble
CAP	caprique	0.78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	Acide adipique	1.12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	Acide malique	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	Trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	Acide phénylacétique	0.8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble

- **Préparation et inoculation de la galerie**

La préparation de la galerie commence d'abord par mettre de l'eau distillée stérile sur le fond de la boîte (partie alvéolée). Toutes les alvéoles doivent être remplies pour reconstituer les milieux déshydratés et pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte (photo 1).

Pour l'inoculation, les cupules de la galerie sont remplies par une suspension bactérienne des souches étudiées.

Les cupules contiennent un milieu minimum comportant les éléments chimiques nécessaires à la croissance d'un organisme et les bactéries se développent seulement si elles sont

capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Tableau I).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests nitrate (NO_3) et tryptophane (TRP).



Figure 4 : Préparation des galeries

Dans cette partie les tests à réaliser sont deux types :

A. Type conventionnels : composé de 8 tests. Ces tests sont : test de nitrate (NO_3), test de tryptophane (TRP), test de glucose (GLU), test de l'arginine (ADH), test de l'urée (URE), test d'esculine citrate de fer (ESC), test de gélatine (GEL), et de test de nitrophényl- β D-galacopyranoside (PNPG).

❖ Test nitrate (NO_3)

Une goutte de chaque réactif de Griess NR1 et NR2 est ajoutée dans la cupule. La lecture se fait après 5 min :

- ✓ Une couleur rouge indique une réaction positive, qui signifie la réduction de nitrate en nitrite grâce au nitrate réductase

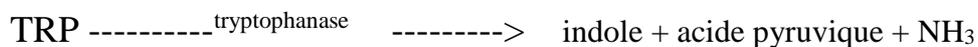


- Le résultat incolore indique une réaction négative, Ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu. Ce qui peut être dû soit à la bactérie n'a pas de nitrate réductase ou bien a existence de nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote atmosphérique.

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

❖ Test de tryptophane (TRP)

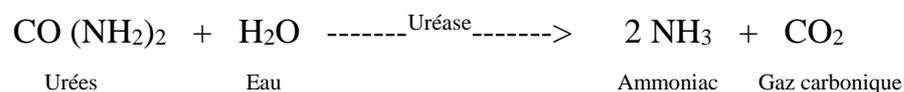
Dans ce test, nous recherchons la fermentation d'indole par les souches à partir de tryptophane. En effet une goutte de réactif KOVACS (Annexe II) est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant indique une réaction positive. Ceci expliqué par l'hydrolase de tryptophane en indole grâce à une tryptophanase. En conséquence les souches sont indole positif.



Alors que l'absence de coloration veut dire absence de tryptophanase, donc les souches sont indole négatif.

❖ Test d'urée (URE)

En présence d'eau et de l'uréase, l'urée est hydrolysée en ammoniac gazeux et en gaz carbonique selon la réaction enzymatique simplifiée suivante:



La couleur orange, rose, ou rouge montre que le test est positif

❖ Test de glucose (GLU)

Dans ce test nous recherchons si les souches étudiées sont fermentatives, aérobies ou anaérobies. La lecture de ce test se fait comme suit : si il y a une couleur jaune il y a fermentation du glucose qui indique que les bactéries sont anaérobies et fermentatives, est le test est positif. C'est la couleur est bleu à vert ceci montre que le test est négatif, donc pas de fermentation du glucose est les bactéries sont aérobie.

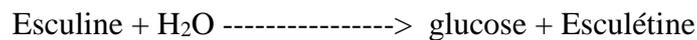
❖ Test d'arginine (ADH)

Dans ce test, nous recherchons la présence de l'enzyme de l'arginine dihydrolase qui est capable de dégrader l'arginine, indiquée par l'apparition de couleur orange, rose, ou rouge.

NB : Pour les trois tests GLU, ADH, URE, un remplissage de l'huile de paraffine a été ajouté pour former un ménisque convexe. La lecture et l'interprétation se font après 08 jours d'incubation à 28°C.

❖ **Test esculine citrate de fer (ESC)**

Dans ce test nous recherchons l'enzyme β -glucosidase. En effet, l'esculétine produite lors de l'hydrolyse de l'esculine et forme un précipité noir en présence de fer. La couleur jaune montre que le test est négatif et la couleur noir indique que le test est positif.



❖ **Test de gélatine (GEL)**

Le but de ce test est de chercher l'enzyme hydrolase gélatine, sa présence se manifeste par diffusion d'un pigment noir.

❖ **Test de nitrophényl- β D-galacopyranoside (PNPG)**

On recherche la présence de l'enzyme β D-galacopyranosidase, la couleur jaune indique que ce test est positif.

B. Type assimilation : composée de 12 tests. Ces tests sont : test de glucose (GLU), test de arabinose (ARA), test de mannose (MNE), test de mannitol (MAN), test de acétylglucosamine (NAG), test de maltose (MAL), test de potassium (GNT), test d'acide caprique (CAP), test d'acide adipique (ADI), test d'acide malique (MLT), test citrate (CIT), et de test d'acide phénylacétique (PAC).

Le trouble observé dans la cupule indique que la bactérie assimile le composant actif, la réaction est donc positive,

2.3. Effet de la température sur la croissance des souches

Dans cette partie, nous nous sommes intéressées à l'étude de la croissance des souches bactériennes à différentes températures sur milieu YMB. Les températures étudiées sont: 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 37°C à raison de 3 répétitions par souche.

Après 08 jours d'incubation, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 630 \text{ nm}$.

III. Analyse numérique des données

L'analyse des caractères phénotypiques permet de calculer le coefficient de similitude des souches selon la formule de Sneath et Collins (1974). Le calcul permet de comparer les souches deux à deux.

$$Cs = (A+C) / (A+B+C) \times 100$$

Cs : coefficient de similitude entre deux souches.

A : nombre de tests positifs communs aux deux souches.

B : nombre de tests différents entre deux souches.

C : nombre de tests négatifs commun aux deux souches.

Les résultats de l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont été convertis en une matrice pour un traitement numérique grâce au logiciel XL-STAT-Pro version 2018.2.50583.

Les variables qualitatives sont codées « 1 » pour le positif ou présent et « 0 » pour négatif ou absent. La classification ascendante et hiérarchique (CAH) a permis de classer les souches par degré de ressemblance en allant des plus proches aux plus éloignées.

Le calcul des distances euclidiennes indique l'indice de ressemblance entre les souches. Parmi les différents types d'analyse numérique qui révèlent la structure taxonomique, la plus utilisée est l'analyse des clusters (groupe d'échantillon ou de souches), sous forme d'un diagramme ramifié similaire à un arbre ou dendrogramme où plus les branches sont proches, plus les groupes de souches sont similaires.

Résultats et discussion

1. Caractérisation phénotypique des souches étudiées

1.1. Morphologie des colonies

Après ensemencement sur le milieu solide YMA et incubation des souches à 28°C, nous avons obtenu des colonies de formes arrondies, de couleur beige, opaques ou translucides et d'un aspect lisse ou bombé (Figure 5).

La vitesse de croissance est lente, des colonies de 2 à 4 mm pour les souches à S2, S8 et S9 apparaissent après 3 à 5 jours d'incubation. Les souches S1, S3, S4, S5, S6, S7 et la souche de référence *B.cytisi* donnant des colonies plus petites de 1 à 2 mm après 5 à 7 jour d'incubation (tableau II).

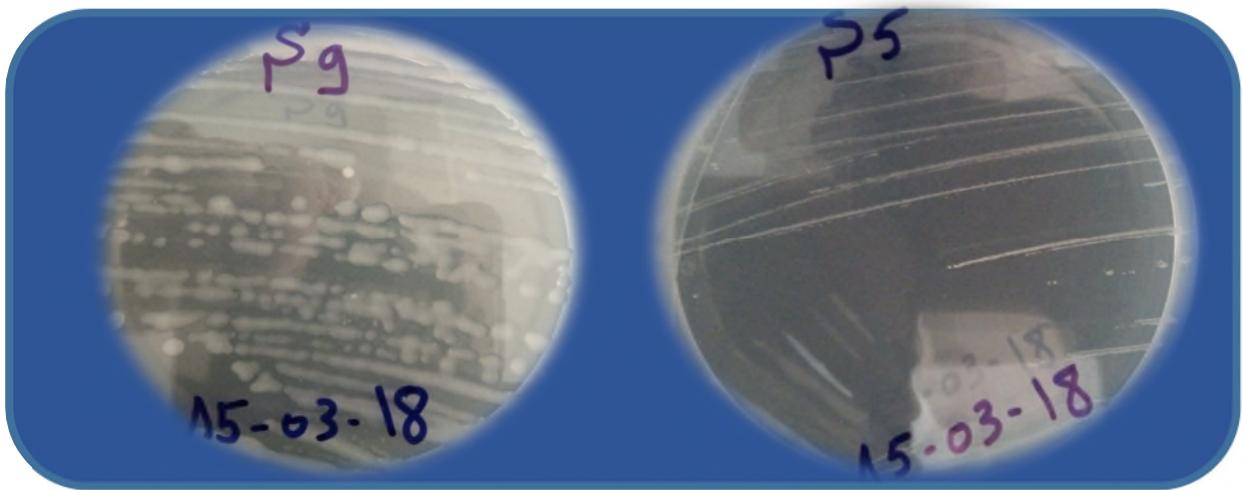


Figure 5 : Aspect des colonies, exemple des souches S5 et S9, obtenues sur milieu YMA

Tableau II : Caractères morphologiques des souches

	Diamètre	Forme	Aspect	Translucide/opaque	Vitesse de croissance	Exopolysaccharide (EPS)
S1	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S2	2 à 4 mm après 3 à 5 jours	Arrondie	Bombé	Opaque	3 Jours	Oui
S3	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S4	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S5	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S6	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S7	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non
S8	2 à 4 mm après 3 à 5 jours	Arrondis	Bombé	Opaque	3 Jours	Oui
S9	2 à 4 mm après 3 à 5 jours	Arrondie	Bombé	Opaque	3 Jours	Oui
<i>B.cytisi</i>	1 à 2 mm après 5 à 7 jours	Arrondie	Lisse	Translucide	6 Jours	Non

1.2. Caractérisation cellulaire

L'observation microscopique des suspensions bactériennes montre que les souches sont des bâtonnets aux extrémités arrondies et mobiles (Figure 6). La coloration de Gram a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif par l'apparition des bacilles roses (Figure 7). Cette caractérisation correspond à la description des rhizobia selon Jordan (1984).

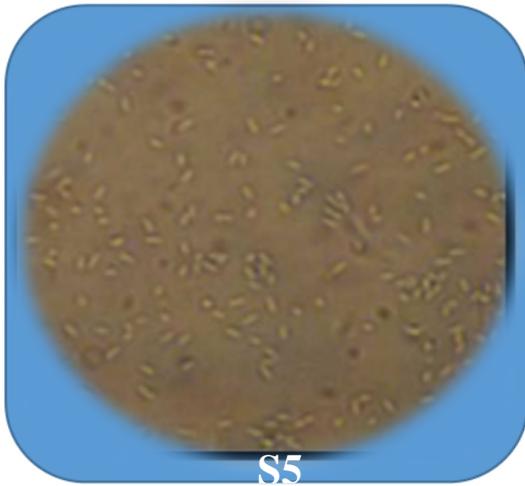


Figure 6 : Observation microscopique à l'état frais, prise comme exemple la souche S5 (Grossissement 10 ×40).

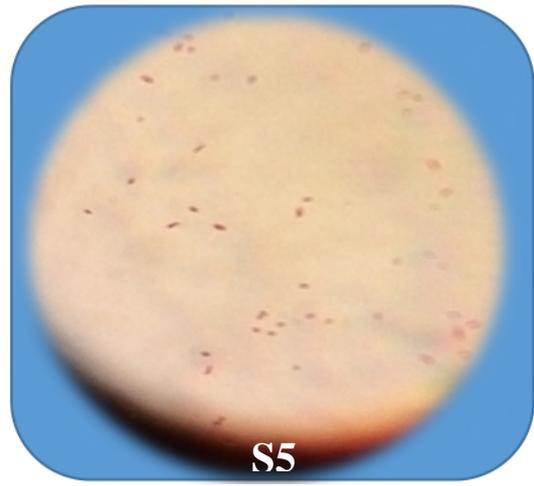


Figure 7: Coloration de Gram, prise comme exemple la souche S5 (Grossissement 10 ×100).

1.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Les résultats obtenus des galeries API 20 NE (Figure 8) sont présentés dans le Tableau III

❖ Tests conventionnels :

Les résultats du test conventionnel des sucres sont montrés dans le tableau III (en vert).

Après ensemencement et incubation à 28°C pendant 8 jours, deux réactifs Griess I et Griess II ont été ajoutés à la cupule de NO₃. Toutes les souches y compris la souche de référence possèdent la nitrate réductase qui permet de réduire le nitrate en nitrite.

Aucune production d'indole à partir du tryptophane c'est observée pour toutes les souches testées y compris la souche de référence. Ce résultat confirme ceux obtenus par Boulila (2002).

Concernant la fermentation du glucose, le résultat est négatif pour toutes les souches, ce qui indique que ces bactéries sont aérobies.

La couleur orange montre que toutes les souches y compris la souche *Bradyrhizobium cytisi* possèdent l'enzyme arginine dihydrolase.

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

En présence d'eau et d'enzyme, appelée uréase et, s'il fait suffisamment chaud, l'urée est hydrolysée en ammoniac gazeux et en gaz carbonique selon la réaction enzymatique simplifiée suivante:

La couleur noir du test ESC est expliqué par l'hydrolyse de l'esculine par les β -glucosidase, ceci a été observée pour toutes les souches, sauf les souches S6 et S7 ce qui explique que ces souches n'ont pas utilisé le fer pour l'hydrolyser l'esculine par les β -glucosidase.

Toutes les souches testées y compris la souche de référence ne possèdent pas la β -galactosidase, sauf la souche S4. L'apparence de couleur jaune montre qu'elle possède la β -galactosidase.

Le test de recherche de la protéase, montre que les souches S2, S4, S5, S6, S8, S9, possèdent cette enzyme par la diffusion de pigments noir. Cependant absente chez les souches S1, S3, S7 et *Bradyrhizobium cytisi*.

Ces différents résultats de tests biochimiques classiques montrent la diversité des souches étudiées.

Tableau III: Résultats de la caractérisation biochimique

Souches	NO ₃ /N ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
S1	+/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
S2	+/+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
S3	+/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S4	+/+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
S5	+/+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S6	+/+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
S7	+/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
S8	+/+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S9	+/+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Bradyrhizobium cystisi</i>	+/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-



Figure 8 : Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries (S9 et S5).

❖ **Tests d'assimilations** : Les résultats du test d'assimilation des sucres sont montrés dans le tableau III (en jaune).

Ce tableau indique que la plupart des souches assimilent le glucose, mannose, mannitol, et potassium gluconate.

Concernant les autres sucres, une variabilité d'assimilation de résultats est observée chez la plupart des souches. En effet, l'arabinose et le glucose sont assimilés par toutes les souches à l'exception de S7. Le mannose est assimilé par toutes les souches sauf la S6. Alors que, le mannitol et le potassium gluconate sont assimilés par toutes les souches.

La majorité des souches assimile N-acétyl- glucosamine à l'exception de S1, S2, S7 et *Bradyrhizobium cytisi*.

Le maltose est assimilé par toutes les souches, à l'exception des souches S2, S7.

Aucune assimilation d'acide caprique n'est observée chez toutes les souches testées y compris la souche de référence. Pour l'acide phénylacétique, nous avons observé l'absence d'assimilation chez toutes les souches à l'exception de S8.

Absence d'assimilation d'acide adipique chez la majorité des souches y compris *Bradyrhizobium cytisi*, sauf chez les souches S7, S8, S9.

Assimilation de l'acide malique chez les souches S1, S2, S4, S6, S8, S9, à l'inverse des souches S3, S5, S7 et *Bradyrhizobium cytisi*.

Ces résultats d'assimilation des sucres confirment la diversité des souches remarquée précédemment.

2. Effet de la température sur la croissance des souches testées

Les résultats de l'effet de la température sur la croissance des souches testées (Annexe III) sont illustrés dans la figure 9.

Ces résultats montrent une variabilité de comportement des souches isolées de zones arides vis-à-vis de la température.

En effet la majorité des souches montre une croissance entre 26°C à 32°C avec un optimum de croissance entre 28°C et 30°C pour toutes les souches. Certaines d'entre elles résistent au-delà de cette limite et leurs croissances persistent même à 37°C, tel que les souches S2, S8 et S9. En outre nous constatons la présence de deux blocs de courbe. Un bloc qui regroupe les S2, S8, et S9 avec une grande valeur de densité optique (DO) même aux températures élevés. Ces

souches possèdent d'exopolysaccharide (EPS) qui permettraient de résister aux hautes températures. Le deuxième bloc regroupe les autres souches y compris la souche de référence *B.cytisi*. Les hautes températures inhibent la croissance de ces souches. Il est à signaler que ces souches ne possèdent pas d'exopolysaccharide qui joueraient le rôle de biofilm en protégeant ces souches de stress thermique comme la indique Zahran et *al.*, (1999).

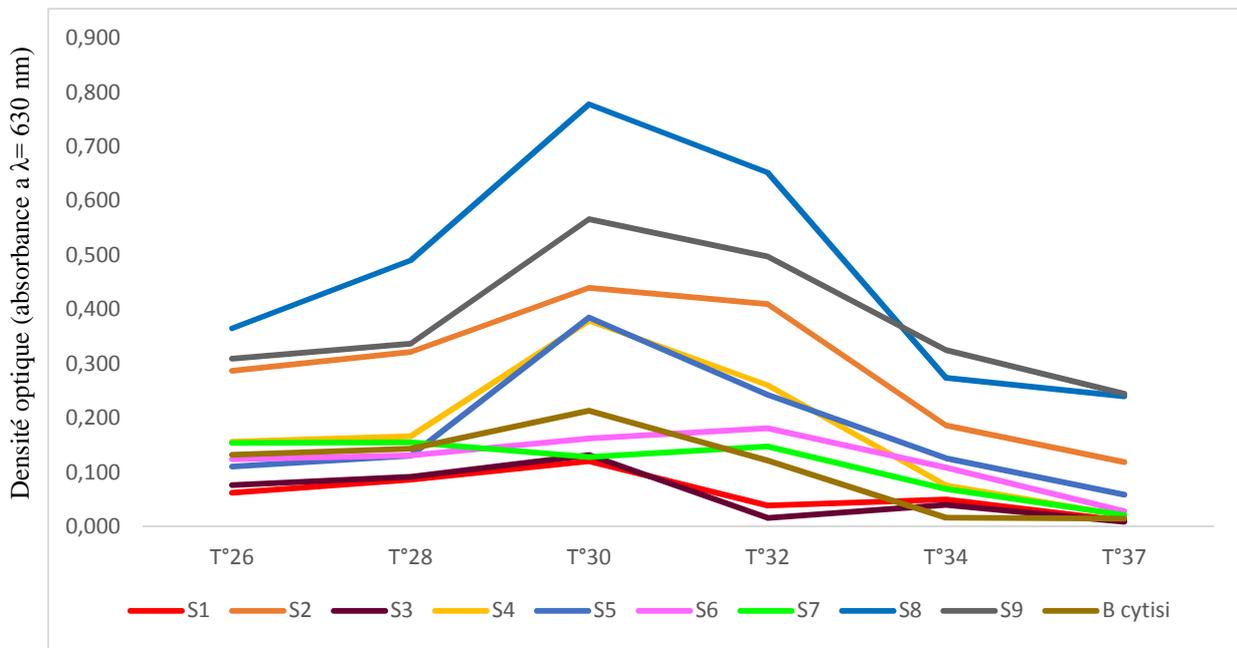


Figure 9 : Effet de la température sur la croissance des souches testées.

En outre, les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de Graham (1992) et Zahran (1999), qui ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles pouvant se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance est environ de 28°C. Les températures basses inhibent l'expression des gènes nod et donc l'infection et la nodulation (Zhang et *al.*, 1996). A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999).

3. Analyse numérique des données

L'analyse numérique a été établie à partir 32 caractères. Le calcul de coefficient de similitude a permis de classer les souches en fonction de leurs ressemblances (tableau IV).

Tableau IV : coefficient de similitude inter-souches étudiées

S1	100										
S2	78,12	100									
S3	90,63	71,87	100								
S4	87,5	84,37	81,25	100							
S5	96,68	78,12	96,87	90,62	100						
S6	87,5	75	84,43	87,5	90,62	100					
S7	81,25	71,87	81,45	68,75	78,12	78,12	100				
S8	75	93,75	71,87	78,12	75	71,87	59,37	100			
S9	75	87,5	75	78,12	81,25	78,12	65,62	59,37	100		
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	96,68	75	96,87	84,37	90,62	84,37	81,25	62,5	75	100	
les souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	

Les résultats montrent que les souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S8 et la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi* sont différentes comparées deux à deux, Il est à noter que les souches S1, S3 et S5 sont plus proches de *Bradyrhizobium cytisi*. En effet, ces souches partagent beaucoup de caractères en commun avec la souche de référence *Bradyrhizobium cytisi*.

❖ Les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques sont convertis en une matrice (Annexe IV) qui a permis d'établir une classification ascendante hiérarchique CAH (Figure10).

Les résultats obtenus de cette analyse montrent que les 9 souches testées y compris la souche de référence sont groupées d'abord en deux clusters A et B

- Le cluster A comporte les souches S2, S8 et S9 productrice d'exopolysaccharide et qui résiste à des températures même de 37°C.
- Le cluster B qui regroupe les souches S1, S3, S4, S5, S6, S7 et la souche de référence *B.cytisi* qui ne possèdent pas d'exopolysaccharide et ne résiste pas à des températures élevées

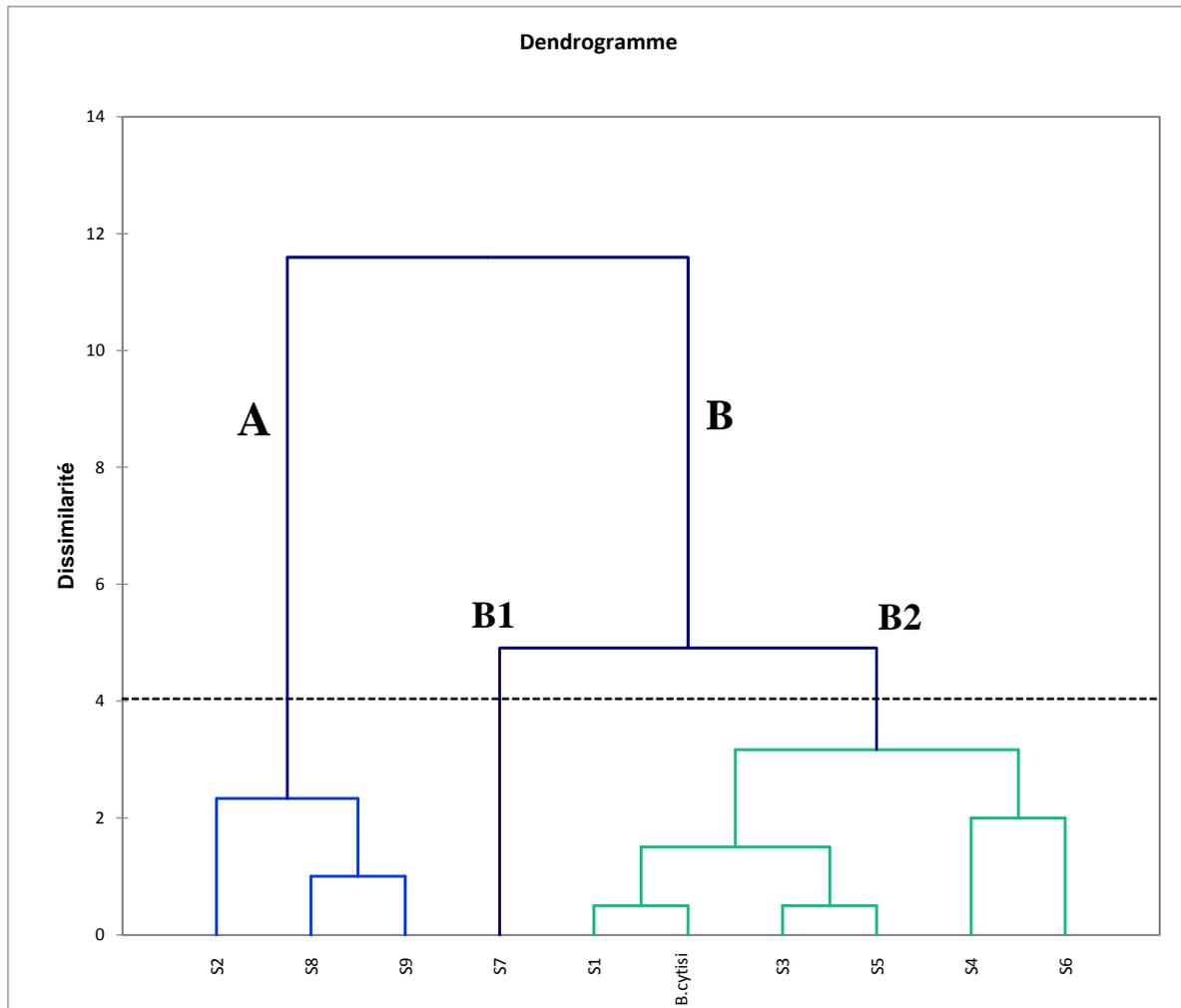


Figure 10: Dendrogramme de la CAH de neuf souches de rhizobia et une souche de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium cytisi*.

Le cluster B lui-même est subdivisé en deux branches B1 et B2, la branche B1 comportant S7 et la branche B2 constituées de S1, S3, S4, S5, S6 et *B.cytisi*.

Il à signaler à ce niveau que la souche S1 est la plus proche de *B.cytisi*, et S3 et S5 c'est leur groupe frère. Ce qui confirme les résultats de calcul de coefficient de similitude.

Conclusion et perspective

Dans le cadre de cette étude, nous avons contribué à la caractérisation phénotypique de neuf souches représentatives de collection de rhizobia appartenant au Laboratoire d'Ecologie Microbienne et comparé à une souche de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium cytisi*.

L'étude des caractères morphologiques a montré que les souches isolées sont de petits bâtonnets, mobiles et à Gram négatif. La caractérisation biochimique a révélé une variabilité de comportement vis-à-vis des tests effectués.

Les tests physiologiques des souches de rhizobia isolées de légumineuses des zones arides montrent que l'optimale de croissance se situe entre 28°C à 30°C pour la plupart des souches testées.

Les souches S2, S8 et S9 résiste à des températures allant jusqu'à 37°C. Ceci pourrait être très intéressant pour le projet de restauration des sols dégradés des zones arides.

En perspective, il serait nécessaire d'élargir le spectre d'étude des souches de rhizobia isolées de légumineuses sur d'autres régions arides et semi arides non étudiées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

- **APG IV, 2016.** An updated of the Angiosperm Phylogeny Group classifications for orders and families of flowering plants : APG IV (PDF). Botanical Journal of the Linnean Society 181(1): 1-20. doi:10.1111/boj.12385
- **Aufrere, J., Theodoridou, K., Et Baumont, R.** Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. Productions Animales, 2012, vol. 25, n° 1, p. 29.

-B-

- **Borget M. (1989).** "Les légumineuses vivrières". Edition Maisonneuve et Larousse.Paris 162p.
- **Boulila, F. (2002).** Contribution de la diversité des rhizobia isolés de *Medicago minima* de la région de Bejaïa. Thèse de Magister. Université Abderrahmane Mira. Bejaïa. 85p.
- **Bousseboua H., 2002.** Techniques d'étude des bactéries. Dans Microbiologie générale. Ed de l'université Mentouri, Constantine (Algérie), 145-157.
- **Burdass, D., 2002.** Rhizobium, Root Nodules and Nitrogen Fixation. In Society for General Microbiology.

-C-

- **Cleland E.E., Harpole W.S. (2010).** Nitrogen enrichment and plant communities. Academy of Sciences, New York. 1195. pp. 46-61.
- **Chahboune (r.), Carro (l.), Peix (a.), Barrijal (s.), Velázquez (e.) And bedmar (e.j.):** *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, **61**, 2922-2927.

-D-

- **Delgado M.J., Ligerof., Lluch C., 1994.** Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea. Faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* 26: 371-376.

- *Déronzier G., Schérite S., Racault Y., Canler J.P., Liénard A., Héduit A., Duchène P. (2001)*. Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités. Document Technique FNDAE n°25, 2^{ème} édition, Cemagref éditions, Antony. ISBN 2-85362- 555-9.
- *Djordjevic S. P., H. Chen, M. Bately, J. W. Redmond, and B. G. Rolfe. 1987*. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J Bacteriol* 169, 53 60.
- *Doyle, J.J. et Luckow, MA. (2003)*. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–10.

-F-

- *FAO. 2006*. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques.
FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).
- *FAO. (1996)*. Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO.
- *Frank, B., 1889*. Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7 pp 332 - 346.

-G-

- *Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F & Young N.D. (2005)*. Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228–1235.
- *Graham P. et C. Vance (2003)*-Legumes:importance and contraintes to greater use. *Plantphysiol.* 131:872- 877.
- *Graham P.H. (1992)*. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under diverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38 (6). pp 475-484.
- *Gusmão-Lima A.I., Figueira E., Almeida M.P., Pereira S.I.A. (2005)*. Cadmium tolerance platicity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxfying agent. *Can. J. Microbiol.* 51. pp 7-14.

-H-

- **Hungria M., Vargas M.A.T., 2000.** Environmental factors affecting Nitrogen fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*. 65: 151-164.

-J-

- **Jordan D.C., 1984.** Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams et Wilkins. Baltimore. USA. pp 234-244.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. & Stevens P. (2001)** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Ed 1: DEBOECK, p. 84-336.

-L-

- **Lazali M., 2009.** Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) cultivée sous contrainte hydrique: aspects morpho-physiologique et agronomiques. Thés de Magister. INA. El-Harrach. Alger. 72p
- **Le Houerou H. N ., 2001.** Biogeography of the aride steppe land north of the Sahara. *J.Arde Environ.*, 48: 103-128.

-M-

- **Madigan M., Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes. Edition: Person Education France. pp 599-601.
- **Maidak, B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Foge, J. Blandy, and C. R. Woese. 1994.** The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.* 22, 3485-3487.
- **Maxted N et Bennett, S.J. (2001).** Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39:132.
- **Michiels J., Verreth C., Vanderleyden. (1994).** Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (4). pp 1206- 1212.

-N-

- **Neyra M. (1992)** Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote legumineuse/Rhizobium.190
- **Neyra M. (1997).** Des microbes aux services des écosystemes.Microbiologie.Cahier ORSTOM.Dakar.11.pp.201-205.

-O-

- **O'Hara G.W., Howieson J.G., Graham P.H. (2002).** Nitrogen fixation and Agricultural Practice.Ed.Elsevier.pp.391-420.

-P-

- **Pelmont J. 1995.** Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Office des publications universitaires. 2. pp 541-572.
- **Pelmont J., 2005.** Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement. Ed. EDP Science. 798p.
- **Perret X., Staehelin C., Broughton WJ. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 180–201
- **Pujic P., Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantesactinorhiziennes. Biofature 298 pp 26-29.

-R-

- **Räzänen L.A., (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia and Prosopis. Thèse de doctorat. Université d'Helsinki. Finland.28p
- **Rennie, R. J., Howenp, R. J., Swunson, T. A. axpFr-oREs, G. H. A. 1985.** The effect of seed-applied pesticides on growth and N, fixation in pea, lentil and fababean. Can. J. Plant Sci. 65:23 28.
- **Rodriguez-Echeverria S, Pérez-Fernandez MA, Vlaar S, Finan TM (2003)** Analysis of the legume-rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. J Appl Microbiol 95:1367–1374

-S-

- *Sangakkara U.R., Hartwing U.A., Nosberger J., 1996.* Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic nitrogen fixation in faba bean and common bean. *Plant and Soil.* 184: 123-130.
- *Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.* Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc pp 450.
- *Suliaman S., Ha C.V., Schulze J. & Tran L.S.P. (2013)* Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *J. Exp. Bot.* 64 (10): 2701-2712.

-T-

- *Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., 2003.* Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc. 945p.
- *Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli B., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A. (2010).* Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hédysarum* : *H.pallidum* des f., *H. spinosissimum subs.capitatum*, *M. cornosum* des f. et *H.naudinianum* coss. *Scien. Technol. C-N°32.* pp 43-44.

-V-

- *Van Bol V., 2000.* Azote et agriculture durable, approche systémique en fermes pilotes. Thèse de doctorat : Laboratoire d'Écologie des Prairies, Université Catholique de Louvain-la-Neuve (Belgique).13p.

-W-

- *Wang, S.Y., Camp, M.J., 2000.* Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Sci. Hortic.* 85, 183–199.
- *Wang, D., Yang, S., Tang, F. and Zhu, H., 2012.* Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), pp.334-342.
- *Weir B.S. (2016).* The current taxonomy of rhizobia. NZ rhizobia. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.

- *Werner D., 1992.* Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

-Z-

- *Zahran H. H., 1999:* Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 63, N° 4 pp 968–989
- *Zhang Z.Q., Wong M.H., Nie X.P., Lan C.Y. (1998).* Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic. Associate. Biol. Technol. 64. pp 97-104.
- **References électroniques**
 - < <http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html> > (accès le 11/05/2018)
 - < <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> > (accès le 11/05/2018)

Annexes

Annexe I: Composition des milieux de cultures (Vincent, 1970).**Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)**

Mannitol	10 g
Extrait de levure.....	0 ,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0 ,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
NaCl.....	0 ,1g
Agar	15 g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	10 g
Extrait de levure.....	0 ,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0 ,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0 ,2g
NaCl.....	0.1 g
Eau distillé.....	1 l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20 min.

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

Acide parasulfanilique.....	8 g
Acide acétique 5N	1 l

Réactif de Griess II (NR II)

α-naphtylamine.....	6 g
Acide acétique 5N	1 l

Réactif de Kovacs

Alcool amylique5 g

Paradiméthylamino-benzaldéhyde 75 ml

HCl Pur..... 25 ml

Annexe III : La moyenne des Do obtenue aux différentes températures

	t°26	t°28	t°30	t°32	t°34	t°37
S1	0,062884	0,086958	0,096067	0,010833		0,010833
S2	0,287279	0,321817	0,3816	0,119167		0,119167
S3	0,076513	0,091833	0,073111	0,008833		0,008833
S4	0,132742	0,143975	0,176267	0,015217		0,015217
S5	0,156958	0,166408	0,218333	0,0205		0,0205
S6	0,111017	0,130858	0,330133	0,059		0,059
S7	0,124217	0,13135	0,1586	0,028333		0,028333
S8	0,154222	0,078661	0,1292	0,021333		0,021333
S9	0,365683	0,490389	0,486333	0,4495		0,4495
S10	0,309278	0,337422	0,409778	0,244833		0,244833

Annexe IV

Tableau : matrice des caractères morphologique et physiologique codés, pour l'analyse ascendante hiérarchique (CAH).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	B.cytisi
T° 26	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
T° 28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T° 30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T° 32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T° 34	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
T° 37	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
mobilité	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
flagelle	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
forme bâtonné	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NO3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TRP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
URE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ESC	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
GEL	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
PNG	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
GLU	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
ARA	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
MNE	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
MAN	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NAG	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
MAL	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
GNT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADI	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
MLT	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
CIT	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
PAC	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G(-)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EPS	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

Résumé

Les légumineuses ont un grand rôle dans la restauration des sols et dans la fixation de l'azote. La température dans les zones arides et semi arides c'est un obstacle majeur pour la croissance, le développement de la végétation et sur la symbiose entre légumineuses et rhizobia. Ce travail a été réalisé sur neuf souches de rhizobia et une souche de référence de genre *Bradyrhizobium cytisi* à titre comparatif afin de déterminer l'effet de la température sur leur croissance, les souches S2, S8 et S9 pourraient être très intéressantes pour le projet de restauration des sols dégradés des zones arides.

Mot clé : légumineuse, rhizobia, symbiose, zone aride

Abstract

Leguminous plants have a prominent role in the restoration of the soil and in the fixation of the azote. the temperature in the arid zones and in the semi arid ones constitutes a serious impediment for the growing, development of the vegetation and about the symbiosis between leguminous plants and rhizobia. This work was carried out on nine strains of rhizobia and a reference strain of genus *Bradyrhizobium cytisi* for comparative purposes to determine the effect of temperature on their growth, strains S2, S8 and S9 could be very interesting for the project of restoration of degraded soils of the arid zones.

Key word: leguminous, rhizobia, symbiosis, arid zone