

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Spécialité : Toxicologie Industrielle et Environnementale.



Réf :

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

MASTER

Thème

**Recherche de souches performantes de
rhizobia en vue de production de
biofertilisants.**

Présenté par :

MEBARKI Yanis & MEZNAD Abdelhak

Déposé le :

Le jury d'évaluation est composé de :

M. HAMLAT Mourad	MCB	Président
Mme. BOULILA Farida	Professeure	Encadreur
Mme. MANKOU Nadia	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

REMERCIEMENTS

Le travail maintenant terminé, et en écrivant ces lignes, nous tenons à les dédier à toute personne ayant apporté un soutien physique, matériel, moral, ou scientifique durant cette période.

Nous tenons à remercier Madame **BOULILA Farida**, notre promotrice qui a su faire preuve de patience, et nous a apporté son aide durant la réalisation de ce mémoire. Et les années passées à nous enseigner.

Nous remercions aussi Monsieur **HAMLAT Mourad**, qui a accepté de présider le jury chargé d'évaluer ce travail.

Nos remerciements vont aussi à Madame **MANKOU Nadia**, pour avoir accepté d'examiner ce travail, ainsi que ces deux années d'enseignements qui nous ont grandement servis, vous avez tout notre respect et notre affection.

Merci au personnel du Laboratoire d'écologie microbienne de nous avoir accueillis, nous tenons à remercier particulièrement **MENDIL Ouidad**, qui nous a été d'une grande aide lors de la réalisation de nos expériences et tests.

Merci à Monsieur **DJOUDI Ferhat**, chef du département de Microbiologie, de nous avoir accordé une place dans un des laboratoires de son département.

Et un grand merci à tous nos enseignants, qui nous ont beaucoup aidés lors de notre parcours, il y a peut-être eu quelques difficultés sur la route, mais nous pensons avoir acquis une maturité suffisante pour écrire ces lignes en toute honnêteté, et sans obligations.

DÉDICACES

A mes parents, qui m'ont tout offert, m'ont accompagné durant toutes ces années, me donnant aide et conseils en toute situations.

A ma tante Nehla, qui m'a apporté un soutien indéfectible durant tout mon parcours universitaire, merci, du fond du cœur.

A mon oncle, Afic, pour ses conseils, nos discussions et nos débats qui ont refaits le monde.

Aux autres membres de ma famille, que je n'oublie pas.

A mes amis, anciens comme nouveaux, Walid, Wahib, Mahdi, et d'autres, votre aide ne peut être sous-estimée, ou sous-évaluée.

A mon binôme, Abdelhak, sans le dire à l'autre, nous avons décidés d'être binôme en Master depuis la L2 ! merci pour sa patience, son travail, sa confiance, et son amitié.

A tout ceux que j'aime et qui m'aiment !

Yanis.

DÉDICACES

Avant tous à ma tante Djamilla et son mari Abderrezak qui m'ont tant offert, qui n'ont pas cessé de me témoigner affection, pour leur amour, soutien, et leurs encouragements continue.

A mes chers parents, mes sincères sentiment pour leurs patience illimité, mon profond amour pour leurs sacrifices, qui n'ont eu de cesse de me témoigner leur amour indéfectible et leurs soutien.

A mes chers frères et sœurs pour leurs conseils et orientations, qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

À tout le reste de la famille : Grand-père et Grand-mère, oncles, tantes, cousins, cousines qui m'ont apporté leurs soutien et conseilles tous au long de mon parcours universitaire.

A mes amis pour leurs aides et ambiances qui ont toujours régnés entre nous.

A mon binôme, Yanis avec qui j'ai eu l'honneur et le plaisir de faire mon parcours universitaire, pour son travail, sa patience, et son amitié.

A tous mes amis, mes collègues de promotion en souvenir de nos bons moments.

Ainsi qu'aux personnes que j'aime.

Abdelhak.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- L'AZOTE 3

I-1. CYCLE DE L'AZOTE 3

I-2. FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE 4

II- LEGUMINEUSES 5

II – 1. INTERET DES LEGUMINEUSES 7

III – RHIZOBIA 8

III-1. TAXONOMIE DES RHIZOBIA 8

IV-NODULATION 12

IV-1. FORMATION DES NODULES 12

IV-2. PROCESSUS DE NODULATION 13

V-UTILISATION DE RHIZOBIA COMME INOCULUM 14

VI- SYMBIOSE RHIZOBIA-LEGUMINEUSE 16

VII-ENGRAIS VERT ET BIOFERTILISATION 18

VII -1. POTENTIEL POUR AUGMENTER LE RENDEMENT 18

VII -2. AUTRES EFFETS FAVORABLES 19

VII – 3. EFFET SUR LE RENDEMENT 19

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I- MATERIEL BIOLOGIQUE 20

II- METHODES	21
II-1. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE	21
II-2. REVIVIFICATION DES BACTERIES	21
II-3. CARACTERISATION CELLULAIRE ET CULTURALE	21
II-4. CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE	22
II-4-1. PRE-CULTURE	23
II-4-2. DENOMBREMENT	23
II-4-3. CULTURE	24
II-4-4. EFFET DU PH SUR LA CROISSANCE DES SOUCHES ETUDIEES	24
II-4-5. EFFET DU NaCl SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE	24
II-4-6. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE	24

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I- CARACTERISATION CELLULAIRE ET CULTURALE	25
II- CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE	26
II-1. EFFET DU PH	26
II-2. EFFET DU NaCl	27
II-3. EFFET DE LA TEMPERATURE	29
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	31
ANNEXE	

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Cycle de l'azote.

Figure 02 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage codant par ARNr 16s

Figure 03 : Processus de nodulation rhizobium-légumineuse.

Figure 04 : Schéma de l'évolution des différents nodules de légumineuses et les principales étapes de la nodulation.

Figure 05 : cellule Malassez (Anonyme)

Figure 06 : Aspect des colonies sur milieu YMA.

Figure 07 : Effet du pH sur les souches étudiées.

Figure 08 : Effet de la salinité sur les souches étudiées.

Figure 09 : Effet de la température sur la croissance bactérienne.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Quantité d'azote accumulée dans les légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture.

TABLEAU II : Souches employées pour l'étude

TABLEAU III : Caractérisation culturale des colonies.

TABLEAU IV : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différents pH.

TABLEAU V : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différents niveaux de salinité.

TABLEAU VI : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différentes températures.

LISTE DES ABREVIATIONS

DO : Densité optique

EPS : Exo polysaccharides

N₂ : Diazote

NO : Oxyde nitreux

NO₂⁻ : Nitrite

NO₃⁻ : Nitrate

CO₂ : Dioxyde de carbone

N₂O : Protoxyde d'azote

CPS : Poly saccharides capsulaires

LPS : Lipo poly saccharides

YMA : Yeast Mannitol Agar

YMB : Yeast Mannitol Broth

pH : Potentiel hydrogène

NaCl : Chlorure de Sodium

mM : Millimole

nod : gène de nodulation

BNL : Bactérie Nodulant Légumineuses

INTRODUCTION

L'Algérie est un pays méditerranéen ayant une grande superficie et une grande variation climatique ainsi qu'une diversité de la flore et de la faune. Tout comme ses voisins nord africains, l'Algérie fait face à divers épreuves et menaces climatiques, telles que la sécheresse, la dégradation des terres et la désertification. L'Algérie abrite plusieurs espèces de légumineuses spontanées, certaines sont utiles comme aliment pour le bétail (Benouaret et *al.*, 2014a), d'autres sont cultivées en agriculture pour la consommation humaine (Mayer et *al.*, 2017).

Depuis des temps anciens, bien avant l'établissement des sciences telles qu'on les connaît aujourd'hui, nos ancêtres, fermiers, cultivaient des légumineuses afin de subvenir à leurs besoins en nourriture. Ils découvrirent rapidement que les sols se dégradèrent après récolte, et ont ainsi découverts qu'il était important de « laisser le sol se reposer » en ne plantant rien durant quelques saisons. Plus tard, ils découvrirent que certaines plantes amélioraient la qualité du sol lorsqu'elles étaient plantées. Des années plus tard, il fut établi que le manque de plusieurs éléments minéraux particulièrement l'azote, était responsable de cette dégradation.

Ils ont aussi découvert que, bien que l'azote soit le principal élément de notre atmosphère, représentant 79% de l'air, il n'était disponible qu'en quantité limitée dans les sols, en faisant un élément d'autant plus vital (Newton, 1998).

Les inquiétudes environnementales grandissantes sur l'utilisation des engrais azotés industriels, coûteux et polluant de l'environnement, additionné à cela les tendances actuelles en termes d'environnement et du réchauffement climatique et le penchement vers une agriculture verte et durable, font des légumineuses un atout important pour la fertilité des sols. Elles sont le moyen principal d'apport en azote dans les écosystèmes désertiques et cela par la symbiose fixatrice d'azote, rhizobium – légumineuses qui représente le mécanisme majeur du BNL dans les régions arides et leur utilisation à des fins agronomiques et écologiques est prometteur (Peoples, et *al.*, 2009).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour but de rechercher la croissance de plusieurs souches bactériennes symbiotiques nodulant des légumineuses spontanées de tribu *Genisteeae* sous l'effet de certains facteurs abiotiques en occurrence la température, le pH et la salinité. Ceci permettra de sélectionner des souches performantes pour une éventuelle utilisation comme biofertilisant dans des projets de fertilisation et de restauration des sols pauvres et ou dégradés.

Ce document comporte trois chapitres ; en premier une synthèse bibliographique qui présente les rhizobia, les légumineuses, la relation entre ces deux partenaires et les engrais verts et biofertilisants. Le chapitre : matériel et méthodes où les souches utilisées et les tests effectués sont exposés, et un dernier chapitre présentant les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Cette étude rentre dans le cadre de projet de recherche socio-économique intitulé « Diversité des bactéries nodulant des légumineuses spontanées arbustes et production d'inoculum comme biofertilisant dans la réhabilitation des écosystèmes dégradés », animé par l'équipe interaction plantes-microorganismes symbiotiques du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Béjaia.

CHAPITRE I :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I - L'azote

L'azote est le principal composant de l'atmosphère, il en représente 79% du volume total, sous la forme de diazote gazeux (N_2). Il est également l'un des constituants essentiels de tous les organismes vivants puisqu'il entre dans la composition de plusieurs molécules biologiques dont les bases azotées des acides nucléiques ou encore la fonction amine (NH_2 -) des protéines. Toutefois, malgré son apparente disponibilité de par son abondance dans l'atmosphère, le N_2 n'est assimilable que par certains organismes procaryotes, nommés diazotrophes. La quantité d'azote réduit disponible pour l'ensemble des organismes vivants est donc limitée, ce qui en fait l'un des nutriments les plus limitant au sein des écosystèmes terrestres (Newton 1998).

I-1. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote représente l'un des plus importants cycles biochimiques sur notre planète. En effet, la réduction du N_2 peut intervenir par trois voies principales à savoir les processus naturels non biologiques en occurrence le volcanisme, la combustion et les éclairs ; les processus naturels biologiques impliquant les diazotrophes ; mais aussi à travers l'activité humaine grâce au processus industriel de fixation de l'azote (Bockman et *al.*, 1990).

L'azote prend de nombreuses formes dans son trajet à travers l'écosystème (Figure 01). En effet, d'après Roy (2005) la première étape est l'ammonification, la deuxième est la nitrification ensuite la dénitrification :

- ❖ **Ammonification** : Les matières organiques azotées se transforment en sels ammoniacaux.
- ❖ **Nitrification** : L'oxydation de l'azote qui s'effectue premièrement sur l'ammoniaque (NH_3) qui est transformée en nitrite (NO_2^-) par la nitratisation grâce à l'action des bactéries nitreuses : *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrospira*, *Nitrosoglea*...etc. Et deuxièmement les nitrites (NO_2^-) sont transformés en nitrate (NO_3^-) par la nitritation, grâce à l'action des bactéries nitriques : *Nitrobacter*, *Nitrocystis*, *Bacteroderma*, *Macroderma*,... etc.
- ❖ **Dénitrification** : Cette étape produit principalement du diazote (N_2), mais de faibles quantités d'oxyde nitreux (NO) sont aussi libérés dans l'atmosphère.

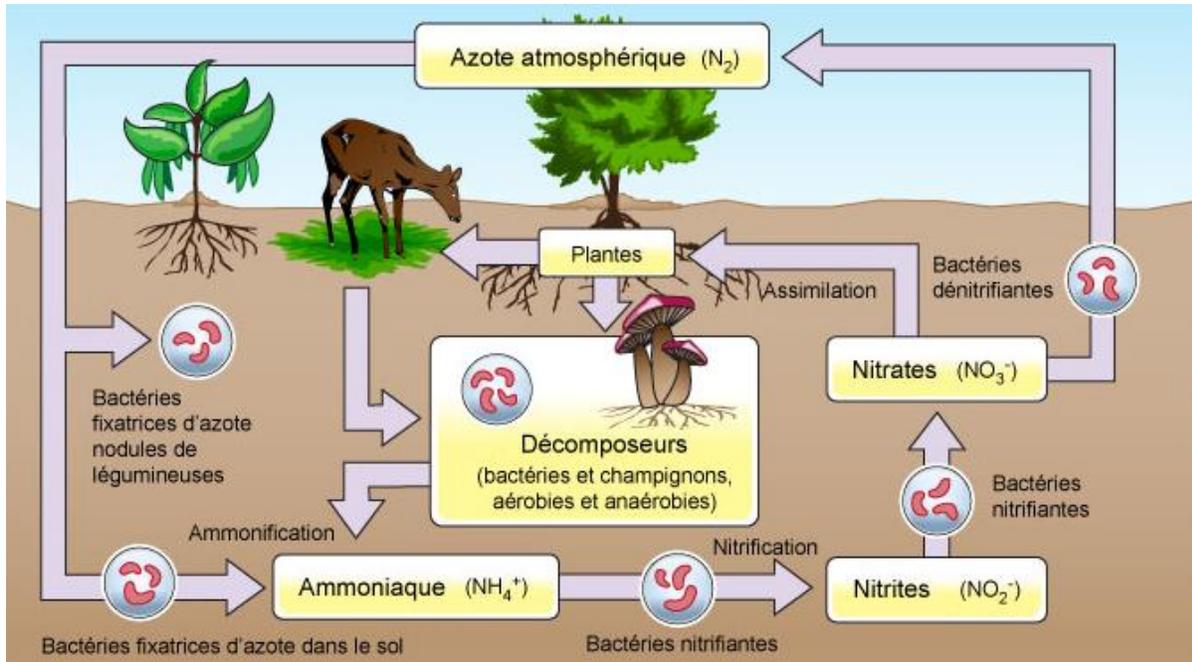


Figure 01 : Cycle de l'azote (Anonyme 1)

I-2. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est une activité microbienne aussi importante pour la photosynthèse que pour le maintien de la vie sur le globe terrestre. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. En l'absence de fertilisation azotée, la fixation biologiques de l'azote est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger, 1996). Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote, seuls les procaryotes (diazotrophes) le peuvent, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommée nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkins, 2003).

Deux types de diazotrophes sont connus :

- **Microorganismes fixateurs libres**

Diverses bactéries à l'état libre dans le sol ou dans l'eau, sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Les plus répandues sont des hétérotrophes. On les rencontre en conditions anaérobies ou micro-aérophiles comme *Clostridium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, et *Azospirillum* mais

aussi en conditions d'aérobies comme *Azotobacter*. Beaucoup vivent et se multiplient en s'adjoignant aux surfaces des racines comme *Klebsiella Pneumoniae*, *Bacillus sp*, et *Clostridium* (Iniguez et al., 2004). D'autres, comme le cas d'*Azospirillum* sont associés à certaines plantes telles que le maïs et le sorgho (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000).

- **Microorganismes fixateurs symbiotiques**

Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses, les bactéries (les rhizobiums) s'installent dans les racines des plantes ; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie ; celle-ci capte l'azote de l'air et le fournit à son hôte (Pousset, 2003). Cependant chez les plantes non légumineuses, le symbionte est une bactérie filamenteuse, à titre d'exemple *Frankia*, qui fait partie du groupe des actinomycètes (Hopkins, 2003).

II- Légumineuses

Les Légumineuses ou *Leguminosae* (*Fabaceae*) représentent une large famille chez les Angiospermes, comprenant plus de 765 genres et 19500 espèces (Quezel et Santa, (1962).

Selon Quezel et Santa, (1962), la famille des légumineuses est classée comme suit :

Règne :	<i>Eucaryote</i>
Phylum :	<i>Planta</i>
Sous règne	<i>Végétaux (phanérogame)</i>
Embranchement :	<i>Spermaphytes (plantes à graines)</i>
Sous embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe :	<i>Rosida</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Leguminosae</i>

Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (Andrews, 2017).

- ❖ ***Caesalpinioideae*** qui comprend environ 150 genres et 2200 espèces, rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Très peu de membres de cette sous-famille sont capables de noduler, soit 30% seulement contre 90% chez les deux autres sous-familles ; Ex : *Chamaecrista fasciculata* est une des espèces nodulées (Maxted et Bennett, 2001).

- ❖ *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres et environ 2500 espèces avec notamment les genres *Acacia* et *Albizia* (Benouaret et al., 2014).
- ❖ *Papilionoideae* représentent le groupe le plus diverse avec environ 430 genres et plus de 12000 espèces, Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes (plantes annuelles), mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, présents en régions tempérées et tropicales. De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), ou encore la cacahuète (*Arachis hypogea*) (Benouaret et al., 2014).

Le bassin méditerranéen est le berceau de la diversification d'un grand nombre d'espèces végétales parmi elles les légumineuses appartenant à la tribu *Genisteeae*. En outre, les arbustes légumineux sont dominants dans une série d'écosystèmes arides et extrêmes où ils constituent un microhabitat stable facilitant l'établissement et la croissance de la végétation herbacée (Pugnaire, 1996 ; Rodríguez-Echeverría et al., 2012). Ceci, à leur tour, les rend utiles pour la revégétalisation des écosystèmes déficients en eau et qui ont une faible disponibilité d'azote, de phosphore et d'autres nutriments (Herrera, et al 1993).

Retama sphaerocarpa et *Retama monosperma* sont classés dans la tribu des *Genisteeae* de la famille des *Fabaceae*. Ce sont des arbustes presque sans feuilles avec des tiges photosynthétiques à feuilles persistantes natives de la région méditerranéenne, de l'Afrique de l'Est et du Nord et dans la péninsule ibérique (Haase, et al., 1996). Ces espèces végétales présentent un intérêt écologique pour la fixation des dunes, la fertilisation des sols et la revégétalisation des écosystèmes semi-arides et arides (Caravaca, et al., 2003 ; Rodríguez-Echeverría et Pérez-Fernández, 2005). En raison de leur capacité à fixer le N₂ en association symbiotique avec les rhizobiums (Valladares, et al., 2002) et de leur système racinaire profond, qui fonctionne à plus de 20 m de profondeur à la recherche de l'eau, les légumineuses du genre *Retama* pourraient être utiles comme outil de restauration, en fournissant des plantations à long terme sans aide artificielle et en permettant une succession primaire (Haase, et al., 1996 ; Singh, et al., 2002).

Des études précédentes sur les rhizobiums associés aux *Retama* ont montré que cette plante établit une relation symbiotique exclusivement avec des *Bradyrhizobium*. Des isolats bactériens provenant de nodules de *R. sphaerocarpa* poussant dans des zones semi-arides du centre de l'Espagne ont d'abord été caractérisés comme des organismes à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* (Rodríguez-Echeverría, et al., 2003), puis classés comme *Bradyrhizobium canariense* (Ruiz-Díez, et al., 2009). Boulila et al., (2009) ont analysé la diversité génétique des rhizobiums nodulant *R. sphaerocarpa* et *R. reatam* originaire de sept zones éco-climatiques du nord-est de l'Algérie. Ces souches rhizobienne ont été classées dans le genre *Bradyrhizobium*.

En Algérie, plusieurs travaux ont montré que les légumineuses du genre *Retama*, *Cytisus*, *Lupinus*, *Calicotome*, *Spartium* *Genista* appartenant à la tribu des *Genisteeae*, sont nodulés par des souches de *Bradyrhizobium* sp. et *Bradyrhizobium algeriense* (Boulila et al.,2009, Ahnia et al.,2014 ; Ahnia et al.,2018 ; Salmi et al.,2018 ; Boudehouche et al.,2020.)

II – 1. Intérêt des légumineuses

De nombreux travaux ont démontré l'utilité et l'intérêt des légumineuses dans différents domaines :

❖ Intérêts écologiques

Les légumineuses sont utilisées dans la restauration des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres. Ce pouvoir est rendu possible grâce à l'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses (Zahran et Willis, 2009).

Les légumineuses contribuent aussi à la réduction de l'émission de gaz à effet de serre, à la diminution de l'utilisation des engrais azotés responsables à la fois des émissions de CO₂ et de N₂O (Rispaïl et al., 2010).

❖ Intérêts économiques

En termes d'importance économique, les légumineuses sont au deuxième rang après les graminées (céréales) dans la fourniture des cultures vivrières destinées à l'agriculture mondiale. Elles sont une source majeure de protéines et de lipides pour la consommation humaine et animale (Masson et Gintzberger, 2000).

❖ Intérêts médicaux et pharmaceutiques

Selon une enquête ethnobotanique dans la région Nord-Est de la Libye *Retama* est recommandée pour le traitement de l'hypertension (Ishurd et al., 2004), et des troubles gastro-intestinaux (Chereti et al., 2009). En Algérie *Retama* a été utilisée contre le rhumatisme, les piqûres de scorpion et blessures, sous forme d'infusions, poudres, tisanes ou compresses (Ould el hadj et al., 2003).

III – Rhizobia

Les rhizobiums sont des bactéries du sol qui forment des nodules fixateurs d'azote sur les racines, ou occasionnellement sur les tiges des légumineuses. Ils sont des bactéries bacilles de taille 0,5-1,0 x 1,2-3,0 μm , ne formant pas de spores, Gram négatif, mobiles grâce à des flagelles péritriches. (Somasegaran et Hoben, 1994). Pendant plusieurs années, toute bactérie formant des nodules racinaires fixatrice d'azote était considérée comme rhizobia. Néanmoins, deux groupes distincts de rhizobia à croissance rapide et à croissance lente ont été reconnus en 1932 par Fred et al. (Young, 1996).

Basés sur les données disponibles à l'époque, Norris (1995) a suggéré que les rhizobia à croissance lente, qui n'acidifient pas le milieu de croissance, semblent être associés avec légumineuses des régions tropicales, tandis que les rhizobia à croissance rapide semblent s'associer avec les légumineuses des régions tempérées. Ces bactéries symbiotiques, échangent des signaux moléculaires avec la plante hôte, qui lui confère les sucres. En contrepartie, le partenaire bactérien réduit l'azote atmosphérique en ammoniac (Yaw Boakye et al., 2016).

III-1. Taxonomie des rhizobia

La classification des rhizobiums, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche polyphasique qui ne retient pas uniquement les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique. En effet, l'approche polyphasique se base sur la caractérisation phénotypique et une caractérisation génotypique et une caractérisation phylogénétique. Ainsi les rhizobia appartiennent à la classe des α -et des β -Protéobactéries (voir la figure 2) :

- Les rhizobiums de la classe α -Proteobacteria appartiennent à l'ordre des *Rhizobiales* et se répartissent en 11 genres à savoir : *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*,

Phyllobacterium, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*).

- Alors que les rhizobiums de la classe β -*Proteobacteria* appartiennent à l'ordre des *Burkholderiales* et se répartissent en deux genres, *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Peix et al., 2015).

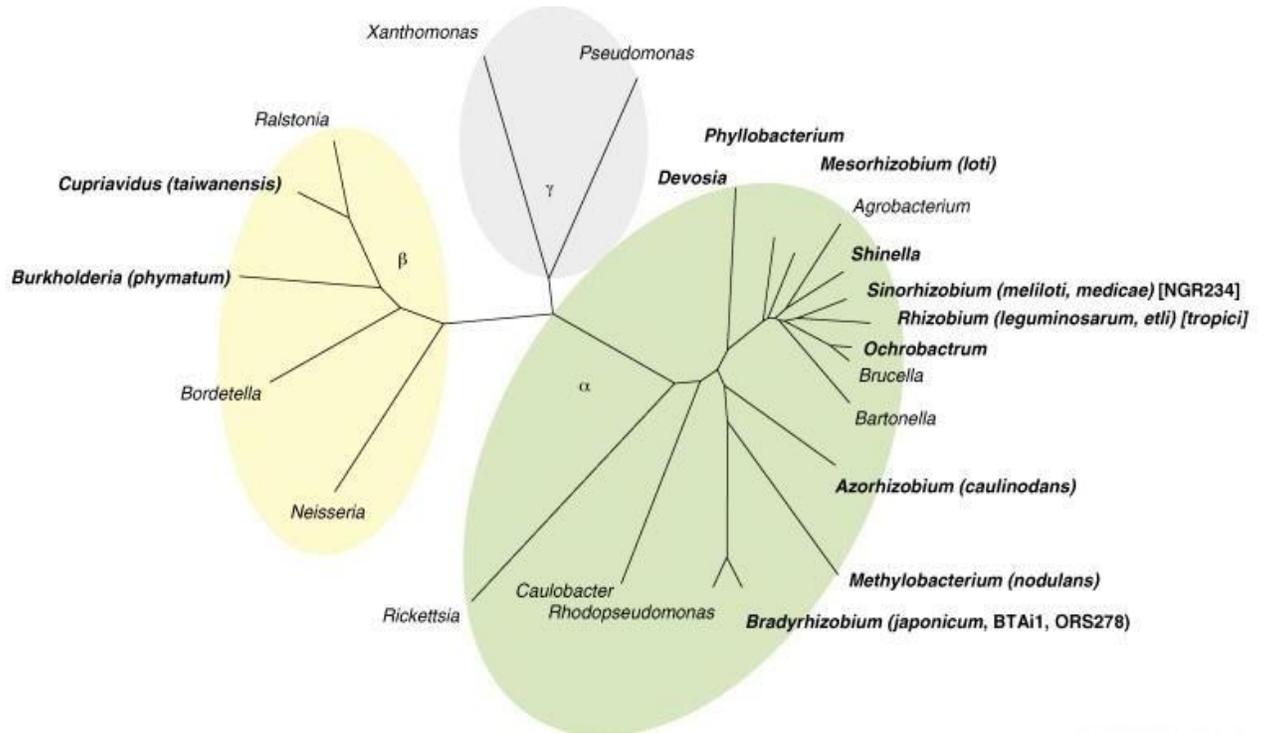


Figure 2 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage codant par ARNr 16s (Masson Boivin et al. 2009).

Weir, a établi une compilation de tous les rhizobia qui existent jusqu'à maintenant en voici quelques genres (Anonyme 2) :

Le genre *Rhizobium*

Rhizobium leguminosarum Frank 1889. Ce nom décrivait à l'origine uniquement les symbiotes de la tribu *Viciae*. Cependant, il est devenu clair que les bactéries des nodules du trèfle (*R. trifolii*) et des nodules du haricot *Phaseolus* (*R. phaseoli*) ne pouvaient pas être distinguées de manière fiable de *R. leguminosarum*, sauf par leur gamme d'hôtes. La position proposée par Jordan (1984) indique qu'il y a trois biovars de l'espèce *R. leguminosarum*. Le biovar *viciae* nodule la tribu *Viciae* (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens*), le biovar *trifolii* nodule *Trifolium*, et le biovar *phaseoli* nodule *Phaseolus*.

Les gammes d'hôtes des trois biovars sont très distinctes et semblent s'exclure mutuellement. En effet, on n'a jamais trouvé de souches qui soient de bons symbiotes efficaces à la fois du pois et du trèfle par exemple. Les gènes de fixation de l'azote et de nodulation, y compris les déterminants de la gamme d'hôtes, sont portés par des plasmides, de sorte que la désignation du biovar est en fait une description du plasmide plutôt que du fond chromosomique de la souche (Young, 1996)

Il existe un genre *Neorhizobium* décrit par Mousavi et al. 2014, incluant notamment *Rhizobium galegae*, mais elle n'est pas encore incluse comme genre à part et n'est pas très utile sans plus d'analyses (Weir, 2016).

Le genre *Ensifer*

Chen et al. (1988), sur la base d'une étude taxonomique numérique, ont proposé que *R. fredii* et les rhizobia du soja apparenté soient déplacés vers un nouveau genre, *Sinorhizobium*, avec deux espèces *S. fredii* et *S. xinjiangensis* parce que leurs caractéristiques phénotypiques étaient si différentes des autres rhizobia, y compris *R. meliloti*. Cependant, ceci n'est pas cohérent avec les données moléculaires, qui indiquent clairement une relation étroite entre *R. fredii* et *R. meliloti* (Jarvis et al., 1992), et *Sinorhizobium* tel que défini par Chen et al. (1988) n'a jamais été largement accepté. Cependant, le nom a été relancé par de Lajudie et al. (1994) avec une définition plus large qui inclut maintenant l'ancien *R. meliloti*, *R. fredii*, et deux nouvelles espèces de *Sinorhizobium* dans ce nouveau sens est bien soutenu par les données de l'ARNr (Figure 2).

Par la suite, des recherches ont montré que le genre *Ensifer* (Casida 1982) et *Sinorhizobium* appartiennent au même taxon, *Ensifer* ayant été décrit en premier, son nom prend donc priorité (Young, 2003).

Le genre *Mezorhizobium*

Les espèces de ce genre constituent la branche la plus éloignée au sein des rhizobiums à croissance rapide, et mérite certainement cette classification dans un nouveau genre. Lors de la réunion de l'International Subcommittee on Rhizobium and Agrobacterium qui s'est tenue à Saint-Pétersbourg en juin 1995, le nom "*Mesorhizobium*" a été proposé (Lindström et al., 1995).

Ce nom a été initialement suggéré par Chen et collègues, caractérise les souches ayant une croissance intermédiaire entre les "fast-growers" typiques (*Rhizobium*) et les "slow-growers" (*Bradyrhizobium*) (Young, 1996). Ce groupe fut décrit formellement pour la première fois par Jarvis et al., 1997.

Le genre *Bradyrhizobium*

Bien que l'existence de deux groupes distincts de bactéries de nodule racinaires fût reconnue depuis le début du siècle (Fred et al., 1932), la création du nouveau genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) a été le premier changement accepté dans la nomenclature rhizobienne depuis cinquante ans. Outre la croissance lente sur les milieux standards, *Bradyrhizobium* se distingue de *Rhizobium* par une foule d'autres différences physiologiques, et la distinction est encore plus nette au niveau génétique. Tous les bradyrhizobiums forment un groupe étroitement lié en termes de séquence d'ARN ribosomique, très distinct des autres rhizobiums. La surprise est que ce groupe comprend également un certain nombre de bactéries qui ne sont pas des rhizobia et qui ont été placées dans d'autres genres : *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter*, *Blastobacter* et *Afipia*.

En 2013, Ahnia et al., ont soumis un article à la revue SAM (Systematic and Applied Microbiology) décrivant une nouvelle espèce de bradyrhizobium (*Bradyrhizobium algeriense*), l'article a été accepté et publié en 2018, donnant ainsi le nom de l'Algérie à une espèce de *bradyrhizobium*. Cette espèce a été validée par le comité International Subcommittee on *Rhizobium* and *Agrobacterium* en 2019.

IV-Nodulation

Les rhizobia stimulent les légumineuses à développer des nodules racinaires, que les bactéries infectent et habitent. De ce fait, les deux partenaires, rhizobia-légumineuse, établissent une coopération métabolique : les bactéries réduisent et fixent l'azote moléculaire en ammoniac pour la plante qui l'utilise pour la synthèse des protéines ; en contrepartie la plante, grâce à la photosynthèse, fournit à la bactérie l'énergie nécessaire pour son fonctionnement (Long, 1989).

IV-1. Formation des nodules

Les nodules se développent (voir figure 3) en une série complexe d'étapes (Newcomb, 1981). Les rhizobia sont chimiotactiles vers les racines des plantes, probablement en partie grâce à des attractifs végétaux spécifiques (Caetano-Anolles et *al.*, 1988). À la surface de la racine, les bactéries modifient la croissance des poils épidermiques de la racine, de sorte qu'ils se développent déformés, voire enroulés (Dazzo et Gardiol, 1984). Pendant ce temps, les cellules du cortex de la racine, sous l'épiderme, commencent à se diviser (Newcomb, 1981). Les bactéries piégées dans un cheveu de racine enroulé, ou entre un cheveu et une autre cellule, prolifèrent et commencent à infecter les cellules extérieures de la plante ; ce faisant, la cellule végétale envahie est stimulée pour produire une gaine de paroi cellulaire, le "fil d'infection" (Callaham et Torrey, 1981). Au fur et à mesure que les divisions cellulaires dans la racine de la plante établissent le corps du nodule, les fils d'infection se ramifient et pénètrent dans les cellules cibles individuelles du nodule. Les bactéries sont libérées dans le cytoplasme de la plante elle-même, enveloppées dans la membrane plasmique de la plante (Robertson et *al.*, 1978). Les bactéries et les cellules végétales se différencient et commencent la fixation symbiotique de l'azote et l'échange de métabolites (Sutton et *al.*, 1981 ; Verma et Long, 1983).

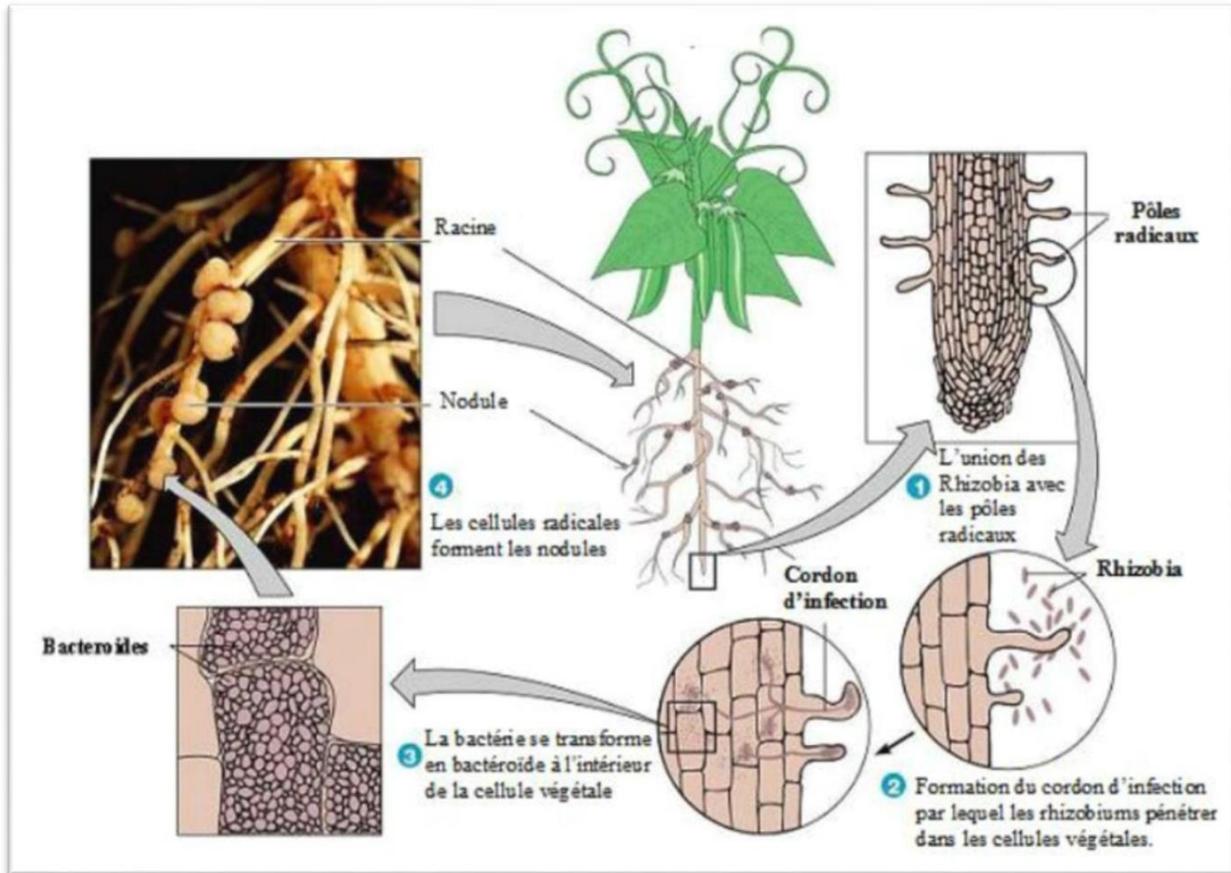


Figure 3 : Processus de nodulation rhizobium-légumineuse (El-hilali, 2006).

IV-2. Processus de Nodulation

L'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les plantes hôtes nécessite une communication moléculaire entre les deux partenaires. Ainsi, ce processus comprend 4 étapes (Baba Arbi, 2016) :

- **Pré infection**

Le processus d'infection débute par une multiplication des bactéries au niveau de la racine (Cooper 2007).

Les bactéries sont attirées par des produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes (molécules signales) exsudées par les racines. Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et d'autres molécules qui sont sécrétées par la plante hôte. Ces molécules induisent la production des facteurs Nod par les rhizobia, qui déclenchent le programme de nodogénèse chez la plante

hôte (Subramanian et *al.* 2007). La reconnaissance de ces bactéries se fait grâce à des facteurs de surface tel que la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS) ; les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) chez la bactérie et la lectine et autres adhésines chez la plante (Cohen et *al.*, 2001).

Ensuite, le poil se recourbe de façon caractéristique et compriment les bactéries engagées dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi et un filament d'infection se développe (Hirsch et *al.* 2001).

- **Phase d'infection et de formation des nodules**

Une fois pénétrées dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un filament d'infection. Ce dernier va poursuivre sa progression en se ramifiant et déversant des bactéries dans les cellules du méristème nodulaire nouvellement formé (Franche et *al.*, 2009).

- **Maturité du nodule**

Les rhizobia se libèrent du filament d'infection et sont enveloppées dans une membrane dérivée de la plante, appelé symbiosome (Franche et *al.* 2009).

Les bactéries arrêtent finalement de se diviser et se transforment en bactéroïdes entourés d'une membrane, nommée membrane péribactéroïdienne qui a pour rôle de stabiliser le système hôte/bactéroïde ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et seront considérées comme des corps étrangers et donc détruites par la cellule hôte (Masson-Boivin et *al.* 2009).

- **Phase de dégénérescence**

Chez les nodosités âgées, les cellules végétales dégèrent. Les membranes des symbiosomes seront désagrégées, les bactéroïdes se transforment en bactéries, ces dernières sont libérées dans le sol, et la plante résorbe les produits (Mergaert et *al.* 2001).

V-Utilisation de rhizobia comme inoculum

L'application de souches de rhizobia efficaces sur des cultures de légumineuses peut non seulement induire une augmentation du rendement de ces cultures mais aussi une amélioration de

la teneur en azote du sol, et par conséquent contribuer à réduire l'utilisation de fertilisants azotés chimiques qui sont polluants et dispendieux. D'après Dufresne (2004), la méthode d'inoculation des légumineuses la plus utilisée est l'enrobage des graines à semer avec un grand nombre de cellules d'une souche de rhizobia, ceci afin de favoriser l'infection et la nodulation des racines dès qu'elles émergent des graines.

Avant d'être utilisée comme inoculum, une souche doit d'abord être sélectionnée en répondant à plusieurs critères dont son efficacité et sa spécificité pour la légumineuse ciblée. La souche de rhizobia sélectionnée doit aussi s'adapter à de multiples contraintes abiotiques dont la variation de pH, la sécheresse et la salinité des sols (Zahran 1999). Elle doit être aussi compétitive dans le sol, la rhizosphère et pour la nodulation du système racinaire et être caractérisée par un taux de survie élevé dans le sol même en l'absence de la plante hôte (Sanginga *et al.* 1994 ; Deaker *et al.* 2004).

Les inocula commerciaux sont généralement commercialisés sous une forme solide avec des rhizobia qui sont mélangés à un substrat broyé de pH neutre afin de protéger les cellules bactériennes durant le stockage et faciliter leur adhésion sur les graines, comme exemple de substrat on citera notamment la tourbe non acide qui est un support facile à produire et capable de maintenir de grandes concentrations de bactéries viables (Smith, 1992 ; Albareda *et al.* 2008).

La vermiculite est aussi un bon support car elle est facilement stérilisable et offre une bonne aération et de l'espace pour la prolifération bactérienne (Graham-Weiss *et al.* 1987). L'enrobage des graines avec l'inoculum bactérien avant le semis facilite le contact entre les cellules de rhizobia et la semence au cours de germination mais évite aussi de devoir recourir à un amendement onéreux de l'ensemble du terrain (Deaker *et al.* 2004). Toutefois un inoculum peut être appliqué aussi sous la forme d'une culture bactérienne liquide généralement fraîchement diluée au moment de l'application par exemple dans la raie des semis (Tittabutr *et al.* 2007). Contrairement aux engrais inertes qui sont relativement stables et faciles à conserver, l'inoculum est un produit biologique vivant qui nécessite un certain nombre de précautions pour sa conservation et son emploi, la conservation de l'inoculum se fait généralement à 4°C et au moment de l'application, il est recommandé de travailler dans un local frais, à l'abri du soleil. Il est aussi important de noter que l'obtention d'un effet positif sur les plantes inoculées n'est pas systématique. En effet, le type de réponse obtenu à l'inoculation peut varier selon la qualité de l'inoculum, des caractéristiques symbiotiques des plantes hôtes ciblées ou encore des propriétés du sol et/ou de la présence ou non

de rhizobia indigènes plus compétitifs mais moins bons fixateurs d'azote (Herrmann et Lesueur 2013).

VI- Symbiose rhizobia-légumineuse

La symbiose entre différents organismes a joué un rôle clé dans l'évolution et, en effet, le terme "symbiogenèse" est un concept évolutif qui fait référence à "l'apparition de nouvelles physiologies, de nouveaux tissus, de nouveaux organes et même de nouvelles espèces comme conséquence directe de la symbiose" (Margulis et Chapman, 1998 ; O'Malley, 2015).

Chez les plantes, il existe deux types d'associations avec des eubactéries diazotrophes du sol qui sont pertinentes pour la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique dans un nouvel organe développé chez la plante, le nodule. Les bactéries filamenteuses à Gram positif *Frankia* sont des endosymbiontes fixateurs d'azote des plantes qui sont collectivement appelées plantes actinorhiziennes. En revanche, les bactéries Gram-négatif connues sous le nom de rhizobia, fixent l'azote dans les nodules racinaires des légumineuses et de la non-légumineuse *Parasponia* (Long, 1989). La symbiose fixatrice d'azote dans les nodules racinaires des légumineuses est la plus étudiée et elle joue un rôle important dans l'apport d'azote dans les écosystèmes agricoles et naturels. Le nodule racinaire des légumineuses a été considéré comme "le meilleur exemple de morphogenèse symbiospécifique" (Chapman and Margulis, 1998).

Les rhizobiums peuvent utiliser des voies intracellulaires ou intercellulaires pour infecter racines des légumineuses (figure 4). Dans le premier cas, l'infection se produit au niveau des poils de la racine où se forment les fils d'infection. Le fil d'infection se développe vers l'intérieur jusqu'à ce qu'il atteigne les cellules du primordium du nodule. Le mode d'infection intracellulaire se produit dans la plupart des symbioses rhizobia-légumineuses étudiées. Il est étroitement contrôlé par l'hôte. L'infection intercellulaire peut avoir lieu par le biais de blessures naturelles, où les racines latérales émergent par des cassures de l'épiderme (infection par fissure), ou elle peut se produire directement entre les cellules de l'épiderme ou entre une cellule de l'épiderme et un cheveu de racine adjacent (González-Sama et al., 2004 Ibáñez et al., 2017).

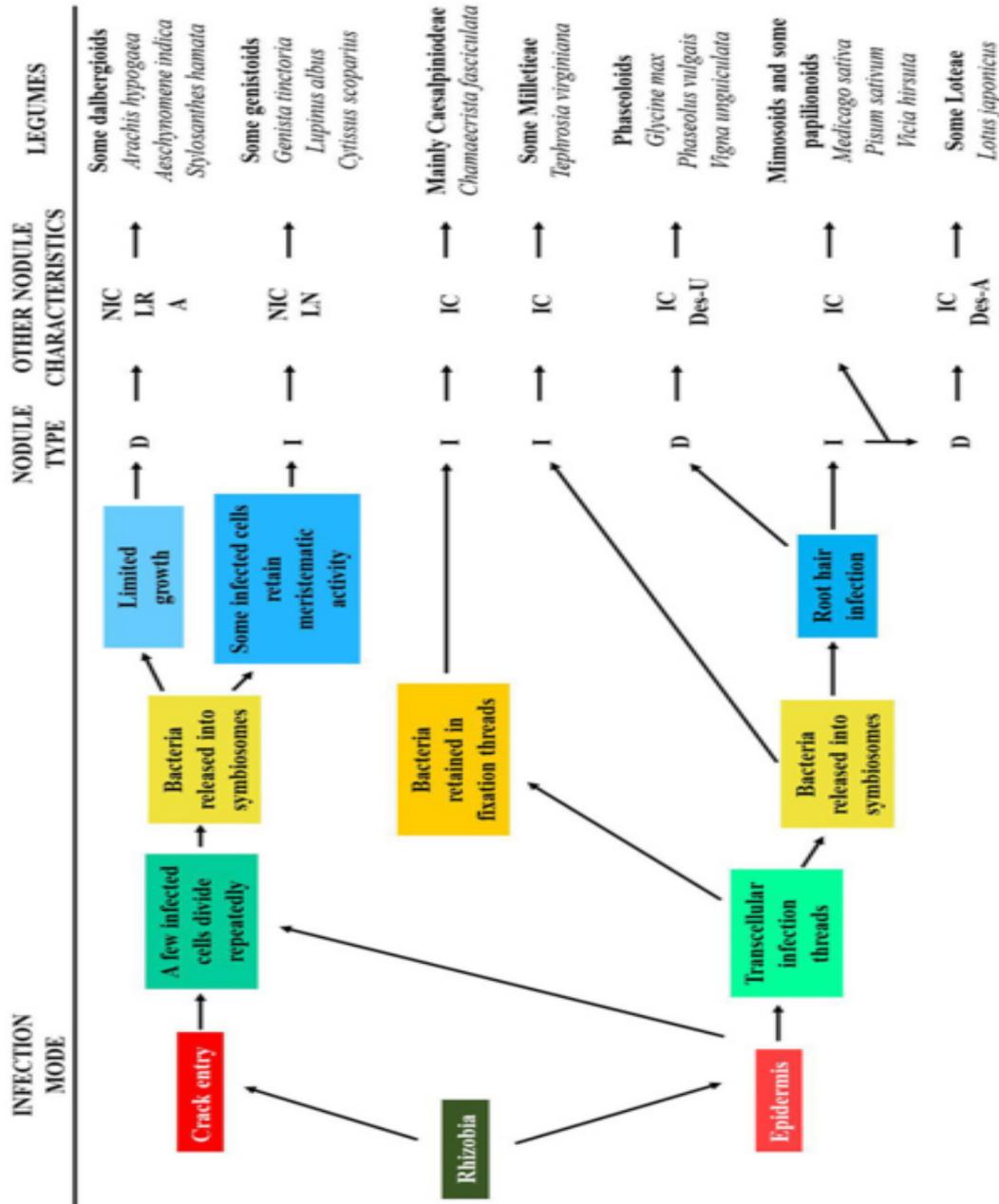


Figure 4 : Schéma de l'évolution des différents nodules de légumineuses et les principales étapes de la nodulation. Oono et al. (2010).

VII-Engrais vert et biofertilisation

De nombreuses légumineuses ont traditionnellement été utilisées comme engrais vert en riziculture (Tableau I). La découverte des légumineuses à nodules caulinaires aptes à se développer dans les sols submergés (Dreyfus et Dommergues 1981, Alazard et Duhoux 1987) et présentant une activité fixatrice de N₂ élevée, a ravivé l'intérêt des chercheurs pour l'utilisation des engrais verts.

TABLEAU I : Quantité d'azote accumulée dans les légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture (Buresh et De Datta 1991)

	Poids sec	N accumulé	
	t ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹ jour ⁻¹
110 cultures de 16 espèces cultivées pendant 30 à 178 jours (moyenne 52 jours)			
Moyenne	4.3	99	1,9
Maximum	13.3	267	5,1
Minimum	0.2	7	0,2
32 cultures de 11 espèces cultivées pendant 30 à 45 jours (moyenne 40 jours)			
Moyenne	2.5	63	1,6
Maximum	6.7	143	3,2
Minimum	0.2	7	0,2

* Calculée à partir des valeurs présentées par Buresh & DeDatta 1991

VII -1. Potentiel pour augmenter le rendement

Le potentiel azoté des légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture a le plus souvent été estimé à partir de mesures de biomasse et l'hypothèse que 50 à 80% de l'azote accumulé provenait de la fixation de N₂.

Les valeurs d'azote accumulé par des cultures de légumineuses traditionnelles utilisables comme engrais vert en riziculture et cultivées jusqu'à maturité ont une valeur moyenne de 114 kg N ha⁻¹. La quantité d'azote accumulé varie avec le type de légumineuse. Les valeurs publiées après 1985 exprimées en kg N ha⁻¹ varient de 40 à 225 pour les légumineuses aquatiques à nodules caulinaires, de 33 à 115 pour les légumineuses à graines traditionnelles, et de 24 à 39 pour les légumineuses arborescentes (Ladha et al. 1988b).

VII -2. Autres effets favorables

Les effets favorables de l'utilisation des légumineuses en engrais vert autres que l'apport d'azote sont de trois types :

- Amélioration des propriétés physico-chimiques du sol (Becker et *al.* 1988) et, en particulier, l'augmentation des teneurs en matière organique et en azote total (Bouldin, 1988), de la teneur en Zn assimilable (ICAR, 1977), de la capacité de rétention de l'eau et de l'agrégation du sol, une propriété importante dans les sols de rizière utilisés en alternance pour une culture exondée.
- Le contrôle de certaines mauvaises herbes, parasites et maladies.
- Le piégeage de l'azote minéralisé dans les jachères de saison sèche permettant une diminution des pertes d'azote par dénitrification lors de la submersion du sol en saison des pluies.

VII – 3. Effet sur le rendement

Les estimations d'augmentation de rendement après l'incorporation d'un engrais vert sont comprises entre 30 et 100 kg de grain par tonne (poids frais) de légumineuse incorporée (Roger et Watanabe 1986). L'incorporation d'une légumineuse à nodules caulinaires de 40 à 60 jours permet des augmentations de rendement en riz de l'ordre de la tonne par hectare. L'efficacité de l'azote de l'engrais vert (kg de grain produit /kg d'azote appliqué) diminue avec la quantité appliquée et est similaire à celle de l'engrais minéral pour des applications de 50-60 kg ha-1.

CHAPITRE II :
MATÉRIEL ET
MÉTHODES

I- Matériel biologique

Afin de réaliser cette étude, nous avons choisi 7 souches de rhizobia à croissance lente du genre *Bradyrhizobium*. Elles ont été isolées à partir des nodules racinaires de 7 espèces de légumineuses arbustes de la tribu de *Genisteeae* (voir tableau II). Ces souches représentatives de plusieurs collections appartiennent au laboratoire d'écologie microbienne (LEM). A titre de comparaison, trois souches de référence appartenant au même genre ont été choisies. Parmi elles *Bradyrhizobium algeriense* RST89 nodulant *Retama sphaerocarpa* appartenant également au LEM.

TABLEAU II : Souches employées pour l'étude :

Souches	Code	Plante hôte	Références
<i>Bradyrhizobium</i> sp. RSA104	RSA104	<i>Retama sphaerocarpa</i>	Boulila et al., 2009
<i>Bradyrhizobium</i> sp. RR16	RR16	<i>Retama retam</i>	Boulila et al., 2009
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CTS8	CTS8	<i>Cytisus villosus</i>	Ahnia et al., 2014
<i>Bradyrhizobium</i> sp. A16	A16	<i>Lupinus micranthus</i>	Collection du LEM
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CA45	CA45	<i>Calicotome spinosa</i>	Salmi et al., 2018
<i>Bradyrhizobium</i> sp. GT166	GT166	<i>Genista tricuspidata</i>	Boudehouche et al., 2020
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SP1	SP1	<i>Spartium junceum</i>	Collection du LEM (Thèse de doctorat en cours)
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST89 _T	BA	<i>Retama sphaerocarpa</i>	Ahnia et al., 2018
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA76 _T	BE	<i>Glycine max</i>	(Kuykendall, et al., 1992)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6 _T	BJ	<i>Glycine max</i>	(Jordan, 1982)

II- Méthodes

II-1. Préparation des milieux de culture

Pour réaliser cette étude, nous avons préparé deux milieux de culture selon Vincent, (1970) : le premier Milieu Yeast-Mannitol-Agar qui est solide et le deuxième est un milieu de culture liquide (YMB). Leur composition est comme suit :

Milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA) en g/l :

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	1000ml
Ajuster le PH à 6,8	

Milieu Yeast-Mannitol-Broth (YMB) en g/l :

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	1000ml
Ajuster le PH à 6,8	

II-2. Revivification des bactéries

Les souches bactériennes conservées dans des cryotubes au congélateur à -20°C, sontensemencées sur boîte de Pétri afin de les revivifier ensuite incubées à 28°C pendant 8 jours. Cette opération effectuée dans des conditions d'asepsie permet également la vérification de la pureté des souches.

II-3. Caractérisation cellulaire et culturale

A partir d'une culture fraîche, nous avons pris une suspension bactérienne afin d'observer la forme et la mobilité des souches.

La caractérisation morphologique et culturale des souches étudiées a été effectuée sur boîte de Pétri par observation des colonies de ces souches cultivées sur YMA. Les caractères étudiés sont : la forme de la cellule, la mobilité, le Gram, le contour, la taille, la couleur, la présence ou absence d'EPS (Exopolysaccharides), l'élévation, et enfin, l'aspect.

Nous avons aussi procédé à une coloration de Gram, dont voici le protocole :

- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre.
- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

II-4. Caractérisation physiologique

La possibilité d'utiliser des souches étudiées comme biofertilisant dépend de la connaissance des conditions de leur culture ainsi que de leur caractérisation physiologique ce qui permet de sélectionner des souches performantes.

Pour la caractérisation physiologique des souches, nous avons préparé des pré-cultures et effectué un dénombrement afin d'ensemencer toutes les cultures avec le même inoculum.

Les paramètres étudiés sont le pH, le NaCl et la température. Tous les tests pour chaque souche ont été répétés trois fois.

II-4-1. Pré-culture

Nous avons procédé à l'ensemencement des souches bactériennes depuis les boîtes de Pétri vers des tubes à essai, contenant 5ml de milieu de culture YMB. Ces pré-cultures ont été incubées pendant quelques jours jusqu'à l'apparition de troubles.

Par la suite, ces pré-cultures ont été utilisées pour ensemencer des flacons contenant 100ml de milieu de culture YMB, que nous avons aussi incubés à 28°C pendant 5 jours.

II-4-2. Dénombrement

Nous avons effectué un dénombrement des bactéries avec une cellule de Malassez (voir figure 5). Une simple règle de 3 nous a permis d'avoir le volume exacte à prélever de chaque culture bactérienne afin d'ensemencer les tubes de tous les tests avec un inoculum contenant 10^7 cellules /ml.

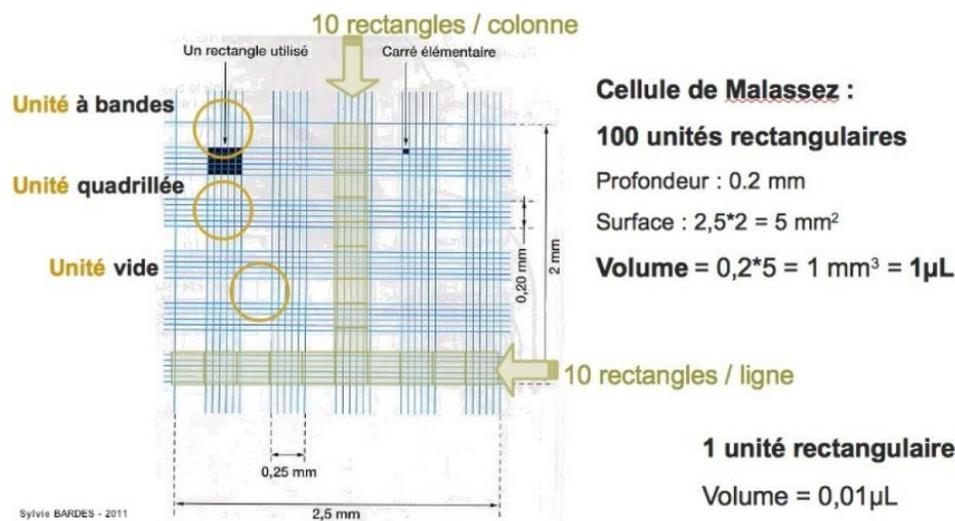


Figure 5 : cellule Malassez (Anonyme 3)

II-4-3. Culture

Après le dénombrement, nous avons procédé à l'ensemencement des tubes à essai de 5ml de milieu YMB par les différentes souches bactériennes afin d'évaluer leur croissance sous l'effet de la température ou du pH ou du NaCl.

II-4-4. Effet du pH sur la croissance des souches étudiées

Les souches étudiées sont ensemencées dans des tubes de 5ml de milieu YMB à des pH variables. La gamme du pH choisie est : 4,5,6,7,8,9 et 10.

La croissance bactérienne est évaluée après 5 jours d'incubation à 28 °C par lecture de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 620nm.

II-4-5. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les souches bactériennes sont ensemencées dans des tubes à essai de 5ml contenant du milieu de culture YMB préparé à des différentes concentrations de NaCl : 100 mM, 200mM, 300mM, 400mM.

Estimation de la croissance bactérienne est alors effectuée après 5 jours d'incubation à 28°C grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm.

II-4-6. Effet de la température sur la croissance bactérienne

Dans le but d'évaluer l'effet de la température sur la croissance des souches, nous les avons ensemencées dans des tubes de 5ml de milieu de culture YMB. Les températures choisies sont : 28°C, 30°C, 32°C, 34°C et 36°C. L'incubation a été réalisée pendant 5 jours.

La lecture des densités optiques (DO) au spectrophotomètre a été faite à une longueur d'onde de 620nm.

CHAPITRE III
RÉSULTATS ET
DISCUSSIONS

I- Caractérisation cellulaire et culturale des souches

Le tableau III présente les résultats de la caractérisation cellulaire et culturale effectuée sur 7 souches symbiotiques nodulant plusieurs espèces de légumineuses appartenant à la tribu de *Genisteeae* et 3 souches de références. Ces résultats indiquent que toutes les souches sont des bâtonnets mobiles à Gram négatif. L'observation des colonies montre que toutes les souches ont un aspect opaque à l'exception de *Bradyrhizobium* sp. SP1, *Bradyrhizobium* sp.RSA104 et *Bradyrhizobium* sp.GT166. La taille des bactéries varie entre des colonies punctiformes de 0.5mm de diamètre (voir figure 6.a) à des colonies de 1mm de diamètre (voir figure 6.b) à la souches SP1 de 2mm de diamètre par bactérie (voir figure 6.c). En outre, la plupart de ces souches possèdent des colonies contenant des exopolysaccharides particulièrement *Bradyrhizobium* SP1 isolé de *Spartium* sp (figure 6.c) ce qui explique la grande taille de ses bactéries.

L'ensemble des résultats montrent que les caractères phénotypiques des souches étudiés répondent aux critères des *Bradyrhizobium* tels que donnés par Jordan et *al.*, (1984), Boulila et *al.*, (2009) ; Ahnia et *al.*, (2014).

TABLEAU III : Caractérisation cellulaire et culturale des souches :

Souches	Forme des bactéries	Mobilité	Gram	Contour	Taille des colonies	Couleur	E.P.S	Élévation	Aspect
RSA104	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	0.5mm	Blanche	+	Bombé	Translucide
RR16	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	1mm	Blanche	+	Bombé	Opaque
CTS8	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	0.5mm	Crème	+	Bombé	Opaque
A16	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	1mm	Crème	+	Bombé	Opaque
CA45	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	1mm	Crème	+	/	Opaque
GT166	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	1mm	Crème	+	Plat	Translucide
SP1	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	2mm	Blanche	++	Plat	Translucide
RST89t	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	0.5mm	Crème	-	Bombé	Opaque
USDA78t	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	0.5mm	Crème	+	Plat	Opaque
USDA6t	Bâtonnet	Mobile	-	Circulaire	1mm	Crème	-	Bombé	Opaque

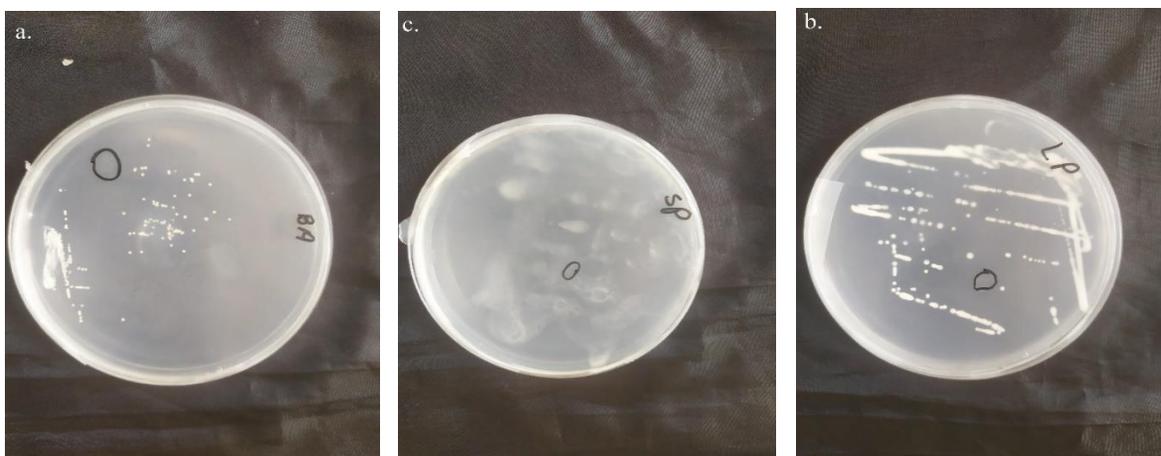


Figure 6 : Aspect des colonies sur milieu YMA.

II- Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié la croissance bactérienne des 7 souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de nodules racinaires nodulant les *Genisteae* ainsi que trois souches de références sous l'effet de plusieurs paramètres abiotiques en occurrence le pH, le NaCl et la température.

II-1. Effet du pH

L'effet du pH sur la croissance des bactéries est illustré dans la figure 7. Ces résultats montrent que toutes les souches ont une capacité de croissance à tous les pH étudiés, y compris les deux extrêmes que sont le pH 4 et le pH 10.

Nous remarquons aussi que la souche RSA104 isolées de nodules racinaires de *Retama sphaerocarpa* présente la plus faible croissance à tous les pH. Alors que, la souche SP1 isolée de nodules racinaires de *Spartium junceum* présente une croissance très élevée à tous les pH, mais semble tout comme les autres favoriser les milieux Alcalins.

Il est à signaler que la majorité des souches semblent favoriser les milieux alcalins et croissent même à pH 10. En outre, certaines souches comme SP1 (*Spartium junceum*), RR16 (*Retama reatam*) et CTS8 (*Cytisus villosus*) présentent leur optimum de croissance à pH 10.

Cette tolérance à l'alcalinité a été déjà signalée par (Boudehouche, 2021) qui a travaillé sur les *Bradyrhizobium* sp. isolés de *Genista tricuspidata*, *G.ferox* et *G.numidica*.

Il a été rapporté que l'acidité est plus néfaste que ne l'est l'alcalinité (Coventry et Evan 1989). Van Rossum, et al., (1994) ont indiqué que les bactéries à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* peuvent tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 alors qu'elles sont sensibles aux pH acides.

Ces résultats montrent également que la souche CA45 (*Calicotome spinosa*) et la souche RSA104 (*Retama sphaerocarpa*) présentent leur optimum de croissance à pH 4, un milieu très acide.

Plusieurs études ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité contrairement aux *Bradyrhizobium* qui ne sont pas affectés par un faible pH du sol, et que les rhizobia peuvent tolérer des pH allant de 4.5 à 9 (Jordan, 1984).

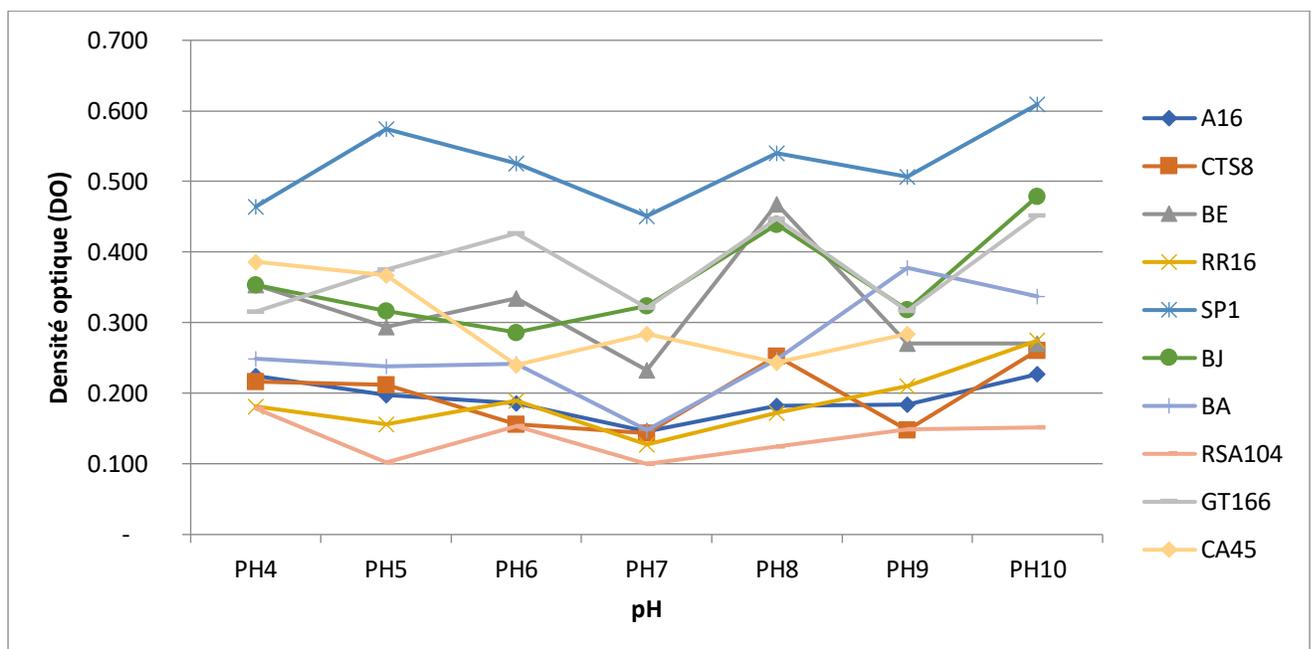


Figure 7 : Effet du pH sur les souches étudiées.

II-2. Effet du NaCl

L'effet de la salinité sur la croissance des souches étudiées est illustré dans la figure 8.

Ce graphique nous montre que la majorité des souches étudiées ne croissent pas bien en milieu salin. En effet, la croissance de *Bradyrhizobium* sp. CT8, RSA104 y compris *Bradyrhizobium japonicum* diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl.

En outre, ces résultats indiquent que la souche SP1 isolée de *Spartium junceum* et GT166 isolée de *Genista tricuspidata*, RR16 isolée de *Retama reatam* et BA *Bradyrhizobium algeriense* présentent un optimum de croissance à 300mM du NaCl. Alors que, cette concentration est néfaste pour le reste des souches. La tolérance de certaines souches au NaCl a été déjà signalé par Boudehouche (2021) ayant travaillé sur *Bradyrhizobium* sp. isolés de *Genista tricuspidata* et ferox qui présentent une bonne croissance à des concentration très élevées allant jusqu'à 513 mM.

Il a été rapporté par Kassem et al., (1985) que la tolérance des rhizobia peut varier largement même entre les souches de la même espèce.

La tolérance des bactéries aux fortes concentrations en sel est due à la capacité que possèdent les bactéries à produire des osmolytes organiques protecteurs principalement les ion K^+ , glycine, betaïne, proline, glutamate, et divers glucides qui maintiennent la turgescence de la cellule et limitent les dégâts causés par le sel (Gouffi, et al., 1999).

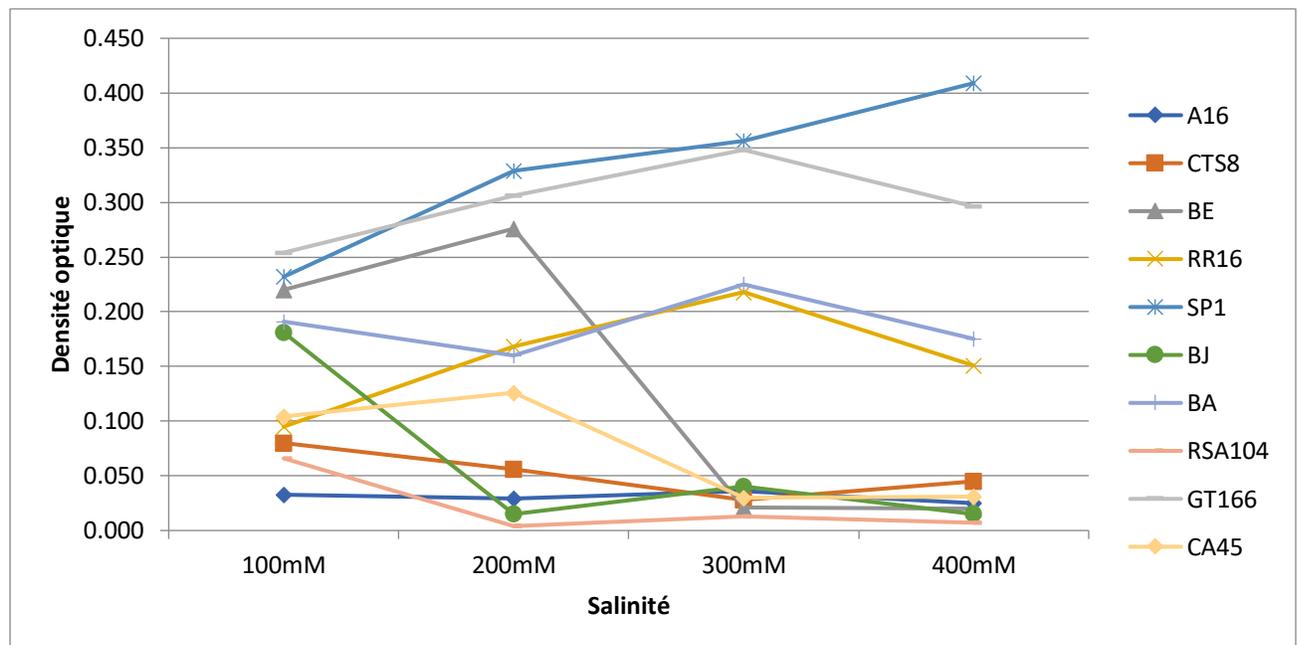


Figure 8 : Effet de la salinité sur les souches étudiées.

II- 3. Effet de la température

L'effet de la température sur la croissance des souches étudiées, nodulant les *Genisteeae*, est illustré dans la figure 9. Cette dernière nous montre que toutes les souches présentent un optimum de croissance entre 32 et 34°C à l'exception de SP1 isolée de nodules racinaires de *Spartium junceum* qui a son optimum de croissance à 30°C.

Là aussi, comme les deux derniers tests, le graphique montre que la souche SP1 croît le mieux presque à toutes les températures. Alors que RSA104 isolée de *Retama sphaerocarpa* présente la croissance la plus faible à toutes les températures.

Il est à signaler que la croissance diminue pour toutes les souches à partir de 34°C. Néanmoins, la souche présentant la plus grande croissance à 36 °C semble être GT166 isolée de nodules racinaires de *Genista tricuspidata* bien que SP1 (*Spartium junceum*) et BA (*Bradyrhizobium algeriense*) présentent tout de même une bonne croissance à cette même température.

Cette thermotolérance de certaines souches nodulant *Genisteeae* a été également rapporté par Boudehouche (2021) qui a montré que la plupart des souches nodulant *Genista ferox*, *G. tricuspidata* et *G. numidica* tolèrent des températures situées entre 32°C et 40°C. En outre, Chaich et al., (2017) ont montré également les rhizobia nodulant *G. saharae* de Ouargla au sud de l'Algérie continuent de croître à 40°C.

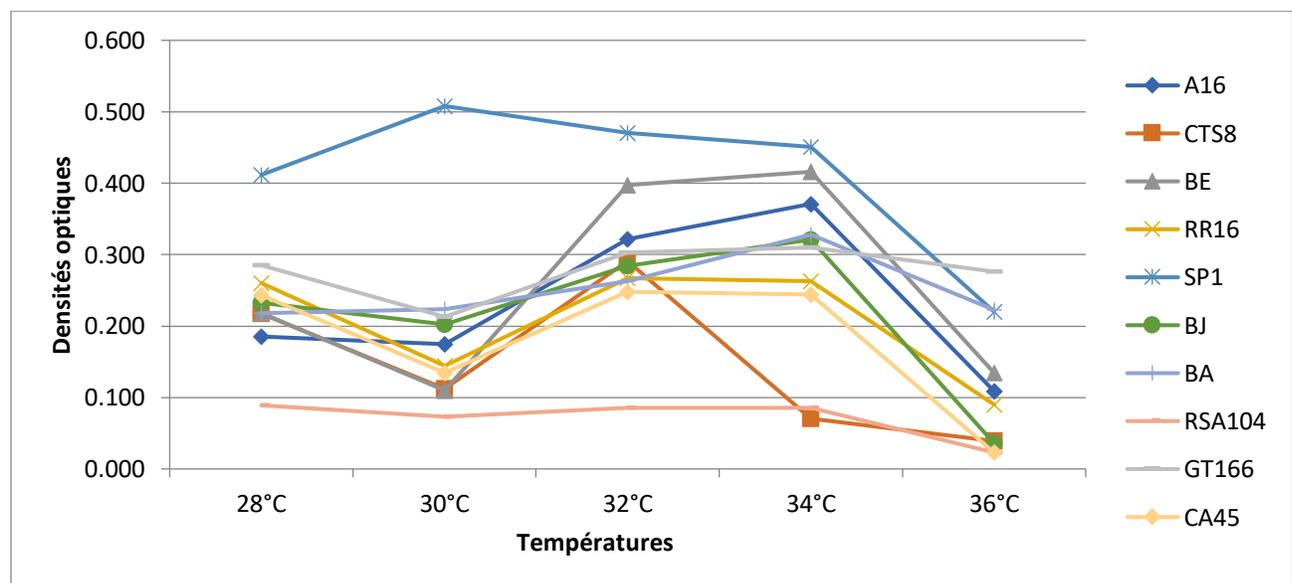


Figure 9 : Effet de la température sur la croissance bactérienne.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Notre présente étude est une contribution au projet de recherche relatif à l'utilisation des souches rhizobiennes comme biofertilisant utile pour la réhabilitation des sols dégradés.

Cette contribution consiste à caractériser du point de vue morphologique et physiologique les 7 souches, appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, isolées à partir de nodules racinaires de légumineuses arbustes à savoir *Retama sphaerocarpa*, *R. reatam*, *Cytisus villosus*, *Lupinus micranthus*, *Spartium junceum* et *Calicotome* sp. appartenant à la tribu de *Genisteeae*.

La caractérisation culturale de ces souches répond aux caractéristiques connues des *Bradyrhizobium*.

L'effet de la température sur la croissance des souches étudiées montre un caractère thermotolérant des souches. En effet, la plupart des souches ont un optimum de croissance entre 32°C et 34°C. Parmi les souches étudiées GT166 isolée de nodules racinaires de *Genista tricuspidata* et SP1 isolées de *Spartium junceum* présentent une bonne à croissance à 36 °C, seraient des candidates pour les recherches approfondies afin de les utiliser comme biofertilisant dans la réhabilitation des sols des régions arides.

L'effet du pH sur la croissance des souches étudiées a montré que la plupart de ces souches présente une très bonne croissance à tous les pH notamment les pH extrêmes.

Concernant l'effet du NaCl, les résultats sont prometteurs et confirment ceux de l'effet de la température. En effet, les souches SP1, GT166 et RR16 présentent un optimum de croissance à 300mM. Là aussi, ces souches pourraient, après les analyses approfondies, être des candidates importantes pour le projet de réhabilitation des sols dégradés des régions arides.

En perspective, nous proposons de :

- Elargir l'étude de l'effet de la salinité et de la température sur les souches sélectionnées, SP1 et GT166, à des concentrations et des températures plus élevées.
- Compléter cette étude par des tests sur plante et sur champs des souches sélectionnées afin de rechercher leur comportement et leur performance en association avec leur macrosymbiote

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Afzal, M., Khan, Q. M., & Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117, 232-242.

Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., ... & Rey, L. (2014). *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse Bradyrhizobium strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.

Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J. M., Rey, L., ... & Imperial, J. (2018). *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 333-339.

Alazard, D., & Duhoux, E. (1987). Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraaspera*. *Biology and fertility of soils*, 4(1), 61-66.

Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771-2779.

An, D. S., Im, W. T., Yang, H. C., & Lee, S. T. (2006). *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 443-448.

Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 705.

Anonyme 1 : Johann Dréo, <http://johann.dreo.fr>

Anonyme 2 : Weir, B.S. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

Anonyme 3 : <http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-1ere-2015-2016/at15-cytometrie-directe-de-levures.html>

B

Baba arbi S, (2016), Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotique des légumineuse spontanées *Medicago littoralis Rhode et Melilotus indicus (L)*. Présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (wilaya de Ouargla). Thèse de magister université Annaba, PP 31-34.

Becker, M., Ladha, J. K., & Ottow, J. C. G. (1988). Stem-nodulating legumes as green manure for lowland rice. *Philipp. J. Crop Sci*, 13(3), 121-127.

Benouaret, R., Goujon, E., & Goupil, P. (2014). Grape marc extract causes early perception events, defence reactions and hypersensitive response in cultured tobacco cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77, 84-89.

Bergman, K. O. S. T. I. A., Gulash-Hoffee, M. A. R. Y., Hovestadt, R. E., Larosiliere, R. C., Ronco 2nd, P. G., & Su, L. I. H. E. (1988). Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *Journal of bacteriology*, 170(7), 3249-3254.

Boakye, E. Y., Lawson, I. Y. D., & Danso, S. K. A. (2016). Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*, 69(2), 89-99.

Bockman O.C., Kaarstad O., Lie O.H., Richard I., (1990). Agriculture et fertilisation : les engrais- leur avenir. Ed. Norsk Hydroa, Oslo, Norvège. 258p.

Boudehouche, W., Parker, M. A., & Boulila, F. (2020). Relationships of Bradyrhizobium strains nodulating three Algerian Genista species. *Systematic and applied microbiology*, 43(3), 126074.

Bouldin, D. R. (1988). Effect of green manure on soil organic matter content and nitrogen availability. *Sustainable agriculture: Green manure in rice farming*, 151-164.

Buresh, R. J., & De Datta, S. K. (1991). Nitrogen dynamics and management in rice-legume cropping systems. *Advances in Agronomy*, 45, 1-59.

C

Casida Jr, L. E. (1982). Ensifer adhaerens gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(3), 339-345.

Caetano-Anolles, G., Crist-Estes, D. K., & Bauer, W. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of Bacteriology*, 170(7), 3164-3169.

Callaham, D. A., & Torrey, J. G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1647-1664.

Caravaca, F., Alguacil, M. M., Figueroa, D., Barea, J. M., & Roldán, A. (2003). Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management*, 182(1-3), 49-58.

Cardoso, D. B. O. S., Pennington, R. T., De Queiroz, L. P., Boatwright, J. S., Van Wyk, B. E., Wojciechowski, M. F., & Lavin, M. (2013). Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany*, 89, 58-75.

Cellier, P., Schneider, A., Thiebeau, P., & Vertès, F. (2015). Impacts environnementaux de l'introduction de légumineuses dans les systèmes de production.

Chaïch, K., Bekki, A., Bouras, N., Holtz, M. D., Soussou, S., Mauré, L., ... & Cleyet-Marel, J. C. (2017). Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2), 111-120.

Chapman, M. J., & Margulis, L. (1998). Morphogenesis by symbiogenesis. *International Microbiology*, 1(4), 319-326.

Chen, W. X., Yan, G. H., & Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 392-397.

Chianu, J., Nkonya, E. M., Mairura, F. S., Chianu, J., & Akinnifesi, F. K. (2011). Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agronomy for sustainable development*, 31(1), 139-154.

Cohen, M. F., Sakihama, Y., & Yamasaki, H. (2001). Roles of plant flavonoids in interactions with microbes: from protection against pathogens to the mediation of mutualism. *Recent research developments in plant physiology*, 157-173.

Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1355-1365.

Coventry, D. R., & Evans, J. (1989). Symbiotic nitrogen fixation and soil acidity. *Soil acidity and plant growth.*, 103-137.

D

Dazzo, F. B., & Gardiol, A. E. (1984). Host specificity in Rhizobium-legume interactions. In *Genes involved in microbe-plant interactions* (pp. 3-31). Springer, Vienna.

Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology—a review. *Soil biology and biochemistry*, 36(8), 1275-1288.

De Souza Moreira, F. M., Cruz, L., De Faria, S. M., Marsh, T., Martínez-Romero, E., de Oliveira Pedrosa, F., ... & Young, J. P. W. (2006). Azorhizobium doebereineriae sp. nov. microsymbiont of Sesbania virgata (Caz.) Pers. *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 197-206.

De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., ... & Gillis, M. (1994). Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus Sinorhizobium and Description of Sinorhizobium meliloti comb. nov., Sinorhizobium saheli sp. nov., and Sinorhizobium teranga sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 715-733.

Djordjevic, M. A., Schofield, P. R., & Rolfe, B. G. (1985). Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Molecular and General Genetics MGG*, 200(3), 463-471.

Dreyfus, B., & Dommergues, Y. (1981). Tropical Legume Sesbania Rostrata. *FEMS Microbiology Letters*, 10, 313-317.

Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988). Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 89-98.

Dudley, M. E., Jacobs, T. W., & Long, S. R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta*, 171(3), 289-301.

Dufresne, G. (2004). *Valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants à base de rhizobium: optimisation du procédé de fermentation avec Sinorhizobium meliloti* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

Dwivedi, S. L., Sahrawat, K. L., Upadhyaya, H. D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., ... & Ortiz, R. (2015). Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in agronomy*, 129, 1-116.

E

Elkan, G., & Upchurch, R. G. (Eds.). (1997). *Current Issues in Symbiotic Nitrogen Fixation: Proceedings of the 5th North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference, held at North Carolina, USA, August 13-17, 1995* (Vol. 72). Springer Science & Business Media.

F

Farida, B., Géraldine, D., Abdelghani, B., Djellali, B., Said, B., & Gisèle, L. (2009). Retama species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(4), 245-255.

Fields, S. (2004). Global nitrogen: cycling out of control. *Environmental Health Perspectives*. 112, A55663.

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1), 35-59.

Frank, B. (1889). tiber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. d. deut. bot. Gesellsch*, 7, 338.

Fred, E. B., Baldwin, I. L., & McCoy, E. (2002). *Root nodule bacteria and leguminous plants* (No. 5). UW-Madison Libraries Parallel Press.

G

González-Sama, A., Lucas, M. M., De Felipe, M. R., & Pueyo, J. J. (2004). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist*, 371-380.

Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V., & Blanco, C. (1999). Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1491-1500.

Graham-Weiss, L., Bennett, M. L., & Paau, A. S. (1987). Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2138-2141.

Gualtieri, G., & Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Molecular Evolution*, 181-194.

H

Haase, P., Pugnaire, F. I., Fernández, E. M., Puigdefábregas, J., Clark, S. C., & Incoll, L. D. (1996). An investigation of rooting depth of the semiarid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. by labelling of ground water with a chemical tracer. *Journal of Hydrology*, 177(1-2), 23-31.

Herrera, M. A., Salamanca, C. P., & Barea, J. (1993). Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 59(1), 129-133.

Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(20), 8859-8873.

Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 320-326.

Hirsch, A. M., Lum, M. R., & Downie, J. A. (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant physiology*, 127(4), 1484-1492.

Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M., & Kersters, K. (1988). *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 406-416.

Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. 2Ed. Beock Université. Bruxel. pp. 470-499.

I

Ibáñez, F., Wall, L., & Fabra, A. (2017). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1905-1918.

Iniguez, A. L., Dong, Y., & Triplett, E. W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(10), 1078-1085.

J

Jarvis, B. D. W., Downer, H. L., & Young, J. P. W. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 93-96.

Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895-898.

Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., JR Alves, B., & Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for sustainable development*, 32(2), 329-364.

Jordan, D. C. (1962). The bacteroids of the genus *Rhizobium*. *Bacteriological Reviews*, 26(2_pt_1-2), 119-141.

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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.

Jordan D. C., 1984 Rhizobiaceae. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. Ed. N R Krieg. pp 234-256. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

K

Kanso, S., & Patel, B. K. (2003). *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2), 401-406.

Kassem, M., Capellano, A., & Gounot, A. M. (1985). Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-75.

Kaye, J. P., & Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(4), 139-143.

Knosel, D.H. "Genus *Phyllobacterium*." In: N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, The Williams & Wilkins Co, Baltimore (1984) pp. 254-256.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z., & Kondorosi, A. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Molecular and General Genetics MGG*, 193(3), 445-452.

Köpke, U., & Nemecek, T. (2010). Ecological services of faba bean. *Field crops research*, 115(3), 217-233.

Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., & Udell, S. E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501-505.

L

Ladha, J. K., Padre, A. T., Punzalan, G. C., Watanabe, I., & De Data, S. K. (1988). Ability of wetland rice to stimulate biological nitrogen fixation and utilize soil nitrogen. In *Nitrogen fixation: hundred years after: proceedings of the 7th International Congress on N [Triple-bond] Nitrogen Fixation, Koln (Cologne), FRG, March 13-20, 1980/edited by H. Bothe, FJ de Bruijn and WE Newton*. Stuttgart: G. Fischer, 1988..

Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (Eds.). (2005). *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens Kew.

Libbenga, K. R., & Harkes, P. A. A. (1973). Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. *Planta*, 114(1), 17-28.

Lindström, K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 365-367.

Lindström K, van Berkum P, Gillis M, Martinez E, Novikova N and Jarvis B 1995 Report from the roundtable on *rhizobium taxonomy*. In *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Ed. I

Liu, W. Y. Y., Ridgway, H. J., James, T. K., Premaratne, M., & Andrews, M. (2012). Characterisation of rhizobia nodulating *Galega officinalis* (goats rue) and *Hedysarum coronarium* (sulla). *New Zealand Plant Protection*, 65, 192-196.

Long, S. R. (1989). *Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground*. *Cell*, 56(2), 203-214.

Long, S. R. (1996). *Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective*. *The Plant Cell*, 8(10), 1885.

Legume Phylogeny Working Group, Bruneau, A., Doyle, J. J., Herendeen, P., Hughes, C., Kenicer, G., ... & van Wyk, B. E. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248.

Ludwig, R. A. (1986). *Rhizobium* sp. strain ORS571 grows synergistically on N₂ and nicotinate as N sources. *Journal of bacteriology*, 165(1), 304-307.

M

Makkar, N. S., & Casida Jr, L. E. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 37(4), 323-326.

Margulis, L., & Chapman, M. J. (1998). Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends in microbiology*, 6(9), 342-345.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*, 17(10), 458-466.

Maxted, N., 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 p:1-32.

Mazoyer, M., & Roudart, L. (2017). *Histoire des agricultures du monde. Du néolithique à la crise contemporaine*. Média Diffusion.

Menna, P., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2934-2950.

MERGAERT, P., VAUBERT, D., GYÖRGYÉY, J., JAHNI, G., MAUNOURY, N., EGAÑA, C. C., ... & KONDOROSI, E. Utilisations d'arrays d'ADNc pour l'étude du développement des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*.

Miché, L., Moulin, L., Chaintreuil, C., Contreras-Jimenez, J. L., Munive-Hernández, J. A., Del Carmen Villegas-Hernandez, M., ... & Béna, G. (2010). Diversity analyses of Aeschynomene symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environmental microbiology*, 12(8), 2152-2164.

Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., ... & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and applied microbiology*, 37(3), 208-215.

N

Nakagawa, Y., Sakane, T., & Yokota, A. (1996). Transfer of “*Pseudomonas riboflavina*” (Foster 1944), a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 16-22.

Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis. *International Review of Cytology*, Supplement 13, G. H. Bourne and J. F. Danielli, eds. (New York: Academic Press), pp. 246-298.

Newton, I. (1998). *Population limitation in birds*. Academic press.

Nilsen, E. T. (1992). Partitioning growth and photosynthesis between leaves and stems during nitrogen limitation in *Spartium junceum*. *American Journal of Botany*, 79(11), 1217-1223.

Noisangiam, R., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Toshiki, U., Minamisawa, K., & Teaumroong, N. (2012). Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6236-6250.

Norel, F., Desnoues, N., & Elmerich, C. (1985). Characterization of DNA sequences homologous to *Klebsiella pneumoniae* nifH, D, K and E in the tropical *Rhizobium* ORS571. *Molecular and General Genetics MGG*, 199(2), 352-356.

Norris, D. O. (1965). Acid production by rhizobium a unifying concept. *Plant and Soil*, 22(2), 143-166.

Nouar, M., Riabi, K., (2014) Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes de la légumineuse *hedysarum pallidum* Desf, poussant dans deux sites différents. Mémoire de Master. Université de Constantine 1.

O

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144.

O'Malley, M. A. (2015). Endosymbiosis and its implications for evolutionary theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10270-10277.

Oono, R., Schmitt, I., Sprent, J. I., & Denison, R. F. (2010). Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytologist*, 187(2), 508-520.

P

Patt, T. E., Cole, G. C., & Hanson, R. S. (1976). Methylobacterium, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 226-229.

Pawlowski, K., Ratet, P., Schell, J., & De Bruijn, F. J. (1987). Cloning and characterization of nifA and ntrC genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of Sesbania rostrata: regulation of nitrogen fixation (nif) genes in the free living versus symbiotic state. *Molecular and General Genetics MGG*, 206(2), 207-219.

Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., ... & Jensen, E. S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1), 1-17.

Pousset, J. (2003). *Agricultures sans herbicides*. France Agricole Editions.

Pugnaire, F. I., Haase, P., & Puigdefabregas, J. (1996). Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology*, 77(5), 1420-1426.

Q

Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, pp 475-476.

R

Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullivant, S., & Grayston, G. F. (1978). Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *Journal of Cell Science*, 30(1), 129-149.

Rodríguez-Echeverría, S., & Pérez-Fernández, M. A. (2003). Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 807-814.

Rodríguez-Echeverría, S., & Pérez-Fernández, M. A. (2005). Potential use of Iberian shrubby legumes and rhizobia inoculation in revegetation projects under acidic soil conditions. *Applied Soil Ecology*, 29(2), 203-208.

Rodríguez-Echeverría, S., Fajardo, S., Ruiz-Díez, B., & Fernández-Pascual, M. (2012). Differential effectiveness of novel and old legume–rhizobia mutualisms: implications for invasion by exotic legumes. *Oecologia*, 170(1), 253-261.

Roger, P. A. (1993). Les biofertilisants fixateurs d'azote en riziculture : Potentialités, facteurs limitant et perspectives d'utilisation. *Bas-fonds et Riziculture. M. Raunet (ed.)*, 327-348.

Roger, P. A., & Watanabe, I. (1986). Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Nitrogen Economy of Flooded Rice Soils*, 39-77.

Roger, P., (1996). La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement ? Conference débats de l'ORSTOM. Paris Xe France.

Rossen, L., Johnston, A. W. B., & Downie, J. A. (1984). DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes *nodAB* and *C* required for root hair curling. *Nucleic acids research*, 12(24), 9497-9508.

Roy, R. N., Misra, R. V., Lesschen, J. P., & Smaling, E. M. (2005). Evaluation du bilan en éléments nutritifs du sol. Approches et méthodologies.

Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejía, M. A., de Felipe, M. D. R., & Fernández-Pascual, M. (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of microbiology*, 191(1), 35-46.

Ryan-Salter, T. P., Black, A. D., Andrews, M., & Moot, D. J. (2014, January). Identification and effectiveness of rhizobial strains that nodulate *Lupinus polyphyllus*. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* (pp. 61-66).

S

Salmi, A., Boulila, F., Bourebaba, Y., Le Roux, C., Belhadi, D., & De Lajudie, P. (2018). Phylogenetic diversity of Bradyrhizobium strains nodulating *Calicotome spinosa* in the Northeast of Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(5), 452-459.

Sanginga, N., Danso, S. K. A., Mulongoy, K., & Ojeifo, A. A. (1994). Persistence and recovery of introduced Rhizobium ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in southwestern Nigeria. *Plant and Soil*, 159(2), 199-204.

Singh, A. N., Raghubanshi, A. S., & Singh, J. S. (2002). Plantations as a tool for mine spoil restoration. *Current Science*, 1436-1441.

Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian journal of microbiology*, 38(6), 485-492.

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., et al. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 43–104.

Sprent, J. I. (2009). *Legume Nodulation: Global Perspective*. Oxford: WileyBlackwell.

Sprent, J. I., Ardley, J. K., & James, E. K. (2013). From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*, 89, 31-41.

Sprent, J. I., & James, E. K. (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in?. *Plant physiology*, 144(2), 575-581.

Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., ... & Nuti, M. P. (2002). *Rhizobium sullae* sp. nov.(formerly'*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1267-1276.

Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 487-506.

Stępkowski, T., Żak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D., ... & Mądrzak, C. J. (2011). Bradyrhizobium canariense and Bradyrhizobium japonicum are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Systematic and applied microbiology*, 34(5), 368-375.

Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*, 12(7), 282-285.

Sutton, W. D., Pankhurst, C. E., & Craig, A. S. (1981). The Rhizobium bacteroid state. *The Biology of Rhizobiaceae*, 149-177.

T

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., Singleton, P. W., and Boonkerd, N. (2007). Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *ScienceAsia* 33, 69–77.

V

Valladares, F., Villar-Salvador, P., Domínguez, S., Fernández-Pascual, M., Peñuelas, J. L., & Pugnaire, F. I. (2002). Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.: fertilisation versus Rhizobium inoculation. *Plant and Soil*, 240(2), 253-262.

Vega-Hernandez, M. C., Pérez-Galdona, R., Dazzo, F. B., Jarabo-Lorenzo, A., Alfayate, M. C., & Leon-Barrios, M. (2001). Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist*, 150(3), 707-721.

Verma, D., and Long, S. (1983). Molecular biology of Rhizobium plant symbiosis. In *Intracellular Symbiosis*, K. Jeon, ed. (New York: Academic Press), pp. 211-245.

Vincent, J.M. (1970). *A Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria*, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.

Vincent, J. M. (1974). Root nodule symbiosis with Rhizobium. *The biology of nitrogen fixation*, 265-341.

W

Wahbi, S., Sanguin, H., Oufdou, K., Hafidi, M., Galiana, A., Domergue, O., ... & Duponnois, R. (2012). Influence des cultures mixtes fève/blé sur le potentiel mycorhizien des sols et la structure de la microflore mycorhizosphérique au Maroc.

Y

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., ... & Arakawa, M. (1992). Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 36(12), 1251-1275.

Yao, P. Y., & Vincent, J. M. (1969). Host Specificity In The Root Hair" Curling Factor" of Rhizobium Spp. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(2), 413-424.

Young, J. P. W. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. In *Current Issues in Symbiotic Nitrogen Fixation* (pp. 45-52). Springer, Dordrecht.

Young, J.P.W. (2003). The genus name Ensifer Casida 1982 takes priority over Sinorhizobium Chen et al. 1988, and Sinorhizobium morelense Wang et al. 2002 is a later synonym of Ensifer adhaerens Casida 1982. Is the combination 'Sinorhizobium adhaerens'(Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2107-2110.

Z

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 968-989.

ANNEXE

TABLEAU IV : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différents pH.

Souches/PH	PH4	PH5	PH6	PH7	PH8	PH9	PH10
RSA104	0,178 +/- (0,186)	0,102 +/- (0,033)	0,153 +/- (0,029)	0,100 +/- (0,022)	0,125 +/- (0,038)	0,149 +/- (0,009)	0,151 +/- (0,194)
RR16	0,181 +/- (0,018)	0,156 +/- (0,020)	0,189 +/- (0,040)	0,127 +/- (0,011)	0,172 +/- (0,021)	0,210 +/- (0,045)	0,274 +/- (0,068)
CTS8	0,216 +/- (0,028)	0,212 +/- (0,046)	0,156 +/- (0,001)	0,143 +/- (0,004)	0,252 +/- (0,010)	0,148 +/- (0,031)	0,260 +/- (0,053)
A16	0,225 +/- (0,003)	0,198 +/- (0,012)	0,186 +/- (0,022)	0,146 +/- (0,004)	0,182 +/- (0,004)	0,184 +/- (0,003)	0,227 +/- (0,028)
CA45	0,386 +/- (0,036)	0,367 +/- (0,001)	0,240 +/- (0,073)	0,284 +/- (0,001)	0,243 +/- (0,002)	0,284 +/- (0,004)	N/D
GT166	0,315 +/- (0,039)	0,375 +/- (0,049)	0,426 +/- (0,016)	0,320 +/- (0,011)	0,447 +/- (0,060)	0,317 +/- (0,018)	0,452 +/- (0,003)
SP1	0,464 +/- (0,058)	0,574 +/- (0,034)	0,525 +/- (0,040)	0,451 +/- (0,002)	0,540 +/- (0,060)	0,506 +/- (0,008)	0,609 +/- (0,043)
RST89t	0,249 +/- (0,040)	0,238 +/- (0,014)	0,241 +/- (0,025)	0,148 +/- (0,001)	0,248 +/- (0,008)	0,377 +/- (0,151)	0,337 +/- (0,001)
USDA76t	0,353 +/- (0,006)	0,294 +/- (0,004)	0,334 +/- (0,013)	0,232 +/- (0,036)	0,468 +/- (0,011)	0,270 +/- (0,081)	0,270 +/- (0,088)
USDA6t	0,353 +/- (0,035)	0,316 +/- (0,006)	0,286 +/- (0,010)	0,324 +/- (0,020)	0,439 +/- (0,013)	0,318 +/- (0,020)	0,479 +/- (0,013)

TABLEAU V : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différents niveaux de salinité.

Souches/Salinité	100mM	200mM	300mM	400mM
RSA104	0,066 +/- (0,017)	0,004 +/- (0,000)	0,013 +/- (0,002)	0,007 +/- (N/D)
RR16	0,095 +/- (0,013)	0,168 +/- (0,033)	0,218 +/- (0,007)	0,151 +/- (0,014)
CTS8	0,080 +/- (0,001)	0,056 +/- (0,042)	0,028 +/- (0,002)	0,045 +/- (0,001)
A16	0,033 +/- (0,006)	0,029 +/- (0,012)	0,036 +/- (0,005)	0,025 +/- (0,013)
CA45	0,104 +/- (0,019)	0,126 +/- (N/D)	0,030 +/- (0,012)	0,031 +/- (0,016)
GT166	0,254 +/- (0,018)	0,306 +/- (0,020)	0,348 +/- (0,011)	0,296 +/- (0,031)
SP1	0,232 +/- (0,014)	0,329 +/- (0,021)	0,356 +/- (0,005)	0,409 +/- (0,056)
RST89t	0,191 +/- (0,016)	0,160 +/- (0,008)	0,225 +/- (0,001)	0,175 +/- (0,028)
USDA76t	0,220 +/- (0,010)	0,276 +/- (N/D)	0,021 +/- (0,112)	0,020 +/- (0,004)
USDA6t	0,181 +/- (0,015)	0,015 +/- (0,005)	0,040 +/- (0,014)	0,015 +/- (0,007)

TABLEAU VI : Moyennes + écarts types des DOs obtenues aux différentes températures.

Souches/Température	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C
RSA104	0,089 +/- (0,011)	0,073 +/- (0,010)	0,086 +/- (0,007)	0,086 +/- (0,009)	0,023 +/- (0,004)
RR16	0,260 +/- (0,080)	0,144 +/- (0,040)	0,267 +/- (0,008)	0,263 +/- (0,087)	0,090 +/- (0,002)
CTS8	0,217 +/- (0,015)	0,112 +/- (0,014)	0,291 +/- (0,026)	0,070 +/- (0,024)	0,039 +/- (0,028)
A16	0,185 +/- (0,015)	0,175 +/- (0,031)	0,322 +/- (0,039)	0,371 +/- (0,005)	0,109 +/- (0,029)
CA45	0,243 +/- (0,039)	0,135 +/- (0,043)	0,248 +/- (0,064)	0,244 +/- (0,014)	0,023 +/- (0,008)
GT166	0,285 +/- (0,007)	0,213 +/- (0,038)	0,303 +/- (0,014)	0,310 +/- (0,007)	0,276 +/- (0,013)
SP1	0,412 +/- (0,000)	0,508 +/- (0,029)	0,470 +/- (0,016)	0,451 +/- (0,016)	0,220 +/- (0,067)
RST189t	0,218 +/- (0,001)	0,224 +/- (0,031)	0,263 +/- (0,066)	0,328 +/- (0,010)	0,223 +/- (0,031)
USDA76t	0,218 +/- (0,023)	0,110 +/- (0,014)	0,397 +/- (0,054)	0,416 +/- (0,002)	0,135 +/- (0,013)
USDA6t	0,233 +/- (0,028)	0,202 +/- (0,016)	0,284 +/- (0,046)	0,321 +/- (0,011)	0,036 +/- (0,029)

Résumé

Dans cette étude, nous avons pris 7 souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de nodules racinaires de 7 espèces de légumineuses arbustes de la tribu des *Genistae* ainsi que 3 souches de référence qui sont *B. algeriense*, *B. elkanii* et *B.japonicum* afin d'étudier l'effet du pH, de la salinité et de la température sur leur croissance.

Les résultats de cette étude indiquent que les souches *Bradyrhizobium* sp1 et GT166 et RR16 isolées respectivement de *Spartium junceum* et *Genista tricuspidata* et *Retama retam* pourraient être les bons candidats pour le projet production de biofertilisants.

Mots clés : rhizobia, légumineuse, symbiose, biofertilisants.

Abstract

In this study, we took 7 strains of *Bradyrhizobium* sp. isolated from root nodules of 7 species of shrub legumes from the *Genistae* tribe as well as 3 reference strains that are *B.algeriense*, *B.elkanii*, and *B.japonicum* to study the effects of pH, salinity and temperature on their growth.

The results of this study points at the three strains *Bradyrhizobium* sp1, GT166, and RR16 isolated from *Spartium junceum*, *Genista tricuspidata*, and *Retama retam* could be good candidates for the biofertilizer project.

Keyword : rhizobia, legumes, symbiosis, biofertilizer.

المخلص

في هذه الدراسة، أخذنا 7 سلالات من *Bradyrhizobium* sp. عزلت من العقيدات الجذرية لسبعة أنواع من البقوليات الشجرية من قبيلة *Genistae* بالإضافة إلى 3 سلالات مرجعية هي *B.algeriense* و *B. elkanii* و *B.japonicum* لدراسة تأثير الأس الهيدروجيني والملوحة ودرجة الحرارة

على نموها.

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن سلالات *Bradyrhizobium* sp1 و GT166 و RR16 المعزولة على التوالي من *Spartium junceum* و *Genista tricuspidata* و *Retama retam* يمكن أن تكون مرشحين جيدين لمشروع إنتاج الأسمدة الحيوية.

الكلمات الرئيسية: الرزوبيا، بقوليات، تكافل، سماد حيوي.