

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER 2
en Sciences Naturelles de l'Environnement

Thème

Caractérisation phénotypique des bactéries isolées
des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium*
junceum L.

Présenté par :

M^{elle} Benouaret Salima

M^{elle} Kheloufi Fayza

Membres de jury :

Président : M. Sahnoune M.

Promoteur : M. Ramdani .N

Examineurs : M. Aissat L.

M. Ait Sidhoum D.

Année universitaire

2013/ 2014



Remerciements



Nous tenons à remercier le bon Dieu qui nous a donné la force, le courage et la santé pour pouvoir mener à terme notre travail et pour suivre nos études.

Nos remerciements plus particulièrement à nos familles.

Nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire à commencer par :

Notre Maître et promoteur M^r Ramdani Nacer Maître Assistant classe A à l'Université de Béjaïa pour sa qualité d'encadrement, sa patience et sa générosité et de nous avoir fournis d'excellentes conditions au sein de son laboratoire et bien sûr ses exigences de faire un vrai travail de recherche scientifiques.

Notre président du jury M^r Sahnoune.M Professeur à l'université de Bejaïa d'avoir accepté de juger notre travail.

M^r Aït Sidhoum.D Maître Assistant classe A à l'Université de Béjaïa d'avoir accepté d'examiner notre travail.

M^r Aïssat.L Maître Assistant classe A à l'Université de Béjaïa d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à Mr Belhadi D pour son aide et ses précieux conseils.

Sans oublier M^{me} Ramdani et M^{me} Ziane pour leur sympathie et leur gentillesse.

« C'est le chemin du cactus qui mène à la gloire et non le chemin de jasmin »

Fayza et Salima



Dédicaces

Mes très chers parents :

Puisse ce modeste travail constituer une légère compensation pour tous les nobles sacrifices pour assurer mon bien être et mon éducation, vous m'avez toujours encouragé et soutenu, merci pour votre confiance et votre amour.

A Mes très chers frères

Avec qui j'ai passé les meilleurs moments de mon existence : Mokrane, Hakim et Nadir

A Ma très chère sœur Nadjjet que j'adore

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes cousins et cousines

A Mes chères copines : Hadjila, Sadika, Hafida, Lynda, Kahina, Sabrina, Hayet, Samia, Samira, Sara, Nassima, Thiziri, Lysa et Aziza.

A tous mes amis pour les bons moments qu'en a passés

A Ma binôme et sa famille

Et enfin toute la promotion : Sciences Naturelles de l'Environnement

Fayza



Dédicaces

Grace à Dieu tout puissant et en signe de reconnaissance à tous les sacrifices consentis pour ma réussite et la volonté pour mener à bien ce modeste travail que je dédie :

Aux prunelles de mes yeux, mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler.

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes deux adorables sœurs Hassina et Rachida.

A mon frère Mouloud et sa femme Nabila.

A mes nièces Celina, Hind, Bilinda, Yasmine, Nesrine.

A mon neveu Farouk

A mes copines, mes très chères, Dida, Naima, Amira Chahrazed, Dilia,

Malia, Mina, Lydia, Yasmine, Sara

A mes amis Lahcène, Nassim, Mokrane

A ma binôme Faiza ainsi que toute sa famille.

A tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce travail.

Salima B.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii

Pages

Introduction	01
--------------------	----

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cycle de l'azote	03
I.1. L'azote	03
I.2. Les sources d'azote	03
II. La fixation biologique de l'azote atmosphérique	04
II.1. Les bactéries fixatrices d'azote	05
II.2. La nitrogénase	06
III. La symbiose rhizobia- légumineuses	06
III.1. Propriétés symbiotiques	06
III.2. Intérêts de la symbiose	07
IV. La nodulation	07
V. Les bactéries nodulant les légumineuses	08
V.1. Diversité taxonomique des rhizobia	09
V.2. Diversité écologique	09
VI. Les légumineuses	10
VI.1. Classification	10
VI.2. Importance des légumineuses	11
VII. Genêt d'Espagne: <i>Spartium junceum</i> L.	12
VII.1. Caractères biologiques	12
VII.2. Propriétés et utilisations	13
VII.2.1. Intérêt pharmaceutique	14
VII.2.2. Intérêt économique	14
VII.2.3. Intérêt environnemental	14

MATERIEL ET METHODES

I. Sites de collecte des échantillons	16
II. Méthodes	
II.1. Analyse physico-chimiques des sols	17
II.1.1. Mesure du pH	17
II.1.2. Dosage du Carbone organique	17
II.1.3. Dosage de l'azote total	17
II.1.4. Dosage des carbonates	18
II.1.5. Le phosphate assimilable	18
II.1.6. Analyse granulométrique	18
II.2. Isolement des bactéries des nodules de <i>Spartium junceum</i> . L.....	19
II.2.1. Prélèvement des nodules racinaires	19
II.2.2. Stérilisation des nodules	19
II.2.3. Extraction des bactéries des nodules	19
II.2.4. Purification des colonies	19
II.2.5. Conservation des isolats	20
II.3. Le test de nodulation	20
II.3.1. Préparation des plantes axéniques	20
II.3.2. Stérilisation et germination des graines	20
II.3.3. Inoculation des plantes	21
III Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des isolats bactériens	22
III.1. Caractérisation morphologique	22
III.2. Caractérisation biochimique	23
III.3. Caractérisation physiologique	25
IV. Analyse numérique	26

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Analyse physico-chimique des sols	27
II. Isolement et authentification des souches	28
III. Caractérisation phénotypique des Bactéries nodulant <i>Spartium junceum</i> L.	30
III.1. Caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules	30
III.2. Caractérisation biochimique.....	32
III.3. Caractérisation physiologique.....	36
IV. Analyse numérique des caractères phénotypiques	38

CONCLUSION ET PERPETIVES	40
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE -----	42
ANNEXES -----	47

Liste des abréviations

MO% : Matière organique

A% : Argiles

Lf%: Limons fins

Lg%: Limons grossiers

Sf%: Sables fins

Sg%: Sables grossiers

N% : Azote total

C%: Carbone Organique

Cat: Catalase

NR : Nitrate Réductase

CIT: Citrate

BTB: Bleu de bromothymol

β-gal: β-galactosidase

Ind: Indole

RM: rouge de méthyle

VP : Voges Praskaeur

LAC: Lactose

GLU: Glucose

DO: Densité Optique

CAH: Classification Ascendante Hiérarchique

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Le cycle d'azote (d'après Peret 2007). -----	03
Figure 2 : différentes parties de la plante <i>Spartium junceum</i> L. -----	13
Figure 3 : sites de collecte des échantillons. -----	16
Figure 4 : mise en germination des graines de <i>Vigna unguiculata</i> . -----	20
Figure 5 : Test de nodulation. -----	21
Figure 6 : photographies montrent l'apparition des nodules chez quelques isolats. --	29
Figure 7 : Coloration de Gram de quelques souches observées sous microscope (Gx100) -----	31
Figure 8 : acidification et alcalinisation du milieu YMA +BTB -----	31
Figure 9 : résultats d'utilisation des sucres comme seule source de carbone. -----	33
Figure 10 : Effet du pH sur la croissance des bactéries isolées des nodules de <i>Spartium junceum</i> . L. des régions A (Sidi- Aïch) ; B (Smaoun) ; C (Adekar). -----	35
Figure 11 : Effet de la température sur croissance des bactéries isolées des nodules de <i>Spartium junceum</i> L. des régions A (Sidi- Aïch) ; B (Smaoun) ; C (Adekar). -----	36
Figure 12 : Analyse numérique des caractères phénotypiques. -----	37

Liste des tableaux

	Pages
Tableau I : Résultats des analyses physico-chimiques des sols.-----	27
Tableau II : Origine des souches et résultats du test de nodulation.-----	29
Tableau III : Caractères morphologiques des colonies.-----	30
Tableau IV : Caractérisation biochimique des isolats.-----	32
Tableau V : Utilisation des sucres comme seule source de carbone.-----	34
Tableau VI : Matrice des caractères phénotypiques utilisée pour l'analyse numérique Annexe 1.	

INTRODUCTION

Les pays du Sud et de l'Est de la Méditerranée (PSEM) sont situés dans des régions arides et semi-arides, caractérisées par de longues périodes de sécheresse, des précipitations irrégulières voire rares et par la pauvreté des sols. Ils sont plus exposés à l'accélération de la désertification et de l'aridité des sols, à l'augmentation de la raréfaction des ressources naturelles. En effet, le faible développement des végétaux, associé à une forte anthropisation (pression d'urbanisme, déforestation, surpâturage, ouverture de carrières ...), constituent les principales causes de dégradation extrême de ces écosystèmes dont les manifestations sont l'érosion des sols et la désertification. Cela a entraîné une réduction plus ou moins irréversible du couvert végétal mais aussi à l'affaiblissement de la fertilité des sols qui deviennent moins productifs, d'où une chute de rendement des cultures et de la production agroalimentaire (Albaladejo et *al.*, 1998 ; Quézel et Médail, 2003). Ce phénomène est encore plus dramatique dans les pays où le taux démographique est le plus élevé, ce qui impose de plus en plus l'exploitation intensive des ressources naturelles et, en particulier, à une extension considérable des terres cultivées au détriment des formations ligneuses et herbacées assurant la protection des sols.

Face à l'ampleur et à l'étendue de la dégradation des terres, des stratégies de lutte contre la désertification sont expérimentées dans des pays particulièrement affectés par ce phénomène, en vue de récupérer à plus grande échelle les terres fortement dégradées. Parmi les stratégies recommandées par les programmes de conservation des sols et des écosystèmes, les recherches en écologie végétale ont montré l'existence d'espèces adaptées aux contraintes pédo-climatiques des milieux méditerranéens et sont qualifiées de pionnières ou cicatricielles des sites dégradés (Jaffré et Pelletier, 1992).

L'Algérie, à l'instar des autres pays de la Méditerranée, est confrontée au grave phénomène de dégradation des terres, de sécheresse et désertification. Malgré ces perturbations et les contraintes pédo-climatiques, elle abrite une grande diversité biologique, permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales et animales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques. Parmi les espèces de plantes pionnières encore mal exploitées, les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme, fourrage pour les animaux et contribuent au développement économique. Mais d'autres espèces de cette famille n'ont pas cette opportunité, telle que

Spartium junceum L. ou Genêt d'Espagne, est une des espèces qui malgré n'a pas la faveur d'être utilisée comme source d'alimentation puisque elle porte une certaine toxicité au niveau des fleurs et des graines, elle a néanmoins des intérêts pharmaceutiques et écologiques. Mais le plus attirant de cette espèce est sa contribution à la protection de l'environnement et à la lutte contre la dégradation des écosystèmes. En effet, cette plante est capable d'établir des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec des bactéries du sol de la famille des *Rhizobiaceae*, et contribue ainsi à faire entrer l'azote atmosphérique sous forme organique dans les écosystèmes, ce qui permet d'initier la régénération d'un sol, réhabiliter sa fertilité et promouvoir par la suite une dynamique d'établissement d'un écosystème plus stable.

Le Genêt d'Espagne reste cependant peu exploité en Algérie malgré son importance au niveau économique et environnemental. Ainsi, l'étude de la diversité biologique des Bactéries nodulant cette Légumineuse demeure une nécessité pour toute sélection de couples symbiotiques performants et plus adaptés aux conditions extrêmes du milieu précédant toute nouvelle introduction.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui a pour but principal l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries associées à la légumineuse, *Spartium junceum* L., collectée au niveau de trois sites de la région de Béjaïa.

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

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cycle de l'azote

I.1. L'azote

Constituant entre autres des acides aminés et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie. Il constitue, avec le manque d'eau et du phosphate, une des principales limitations à la croissance des plantes (Cleland et Harpole, 2010).

I.2. Les sources d'azote

L'azote du sol, dont la source principale est l'atmosphère, présente plusieurs voies d'évolution : la fixation biologique, la minéralisation (ammonification et nitrification), la dénitrification, la volatilisation ammoniacale et l'immobilisation (Figure 1).

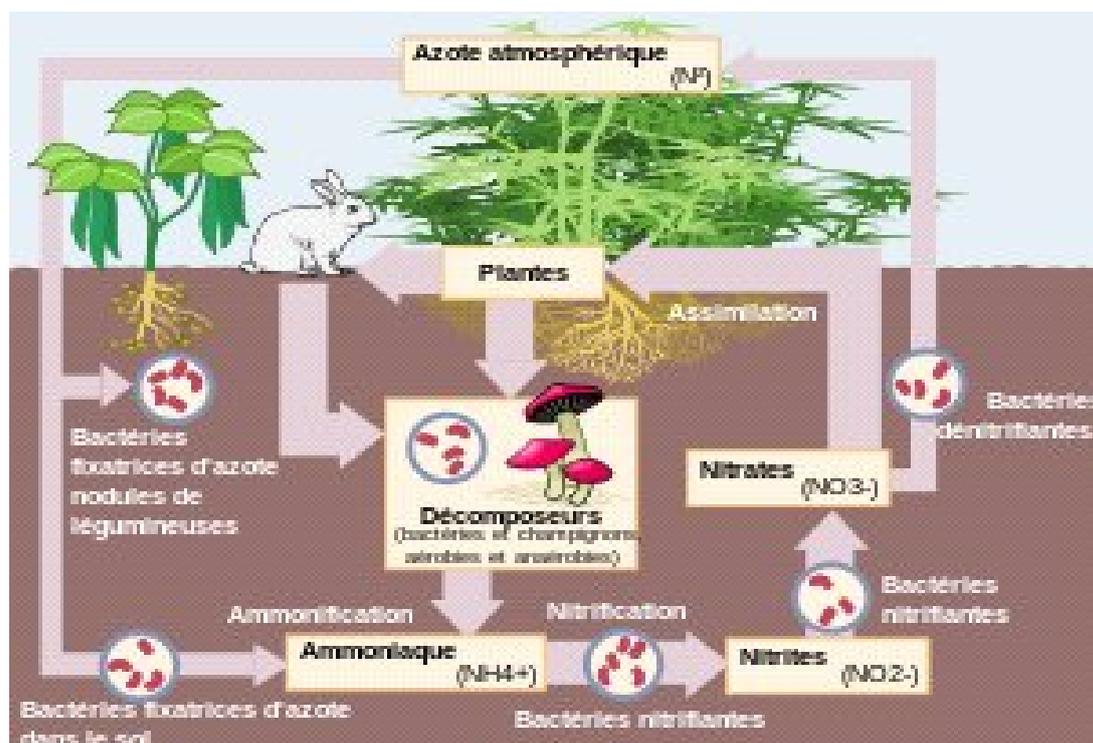


Figure 1 : Le cycle d'azote (d'après Peret 2007).

Le sol ne comporte pas d'importantes réserves d'azote minéral car, d'une part, les principales formes ioniques (NH_4^+ et NO_3^-) sont solubles dans la solution de sol et, d'autre part, elles sont rapidement converties sous forme organique par les plantes et les microorganismes. L'azote dans le sol est donc essentiellement sous forme organique et la libération d'ions inorganiques se fait par le processus de minéralisation. Celui-ci dépend de l'activité des

décomposeurs, des caractéristiques du sol, telles que la température, le pH, l'humidité, la teneur en oxygène (Tardif, 2013).

Les résidus organiques laissés sur le sol après les récoltes constituent une litière temporaire. Quand ils sont enfouis en début de saison ; ces résidus enrichissent la matière organique du sol. Les amendements organiques incorporés aux sols sous forme de fumier ou de compost viennent également enrichir et constituent une source d'azote et d'humus (Sebihi, 2008).

L'azote du sol et les amendements organiques ne suffisent pas pour atteindre des rendements optimums, des engrais azotés minéraux sont utilisés comme complément d'azote pour augmenter les rendements et intensifier la production végétale dans l'agriculture conventionnelle. La plus grande partie de l'N minéral vient des engrais dissous avec une contribution de minéralisation de l'azote organique dans le sol (Newton, 1998).

Par ailleurs, l'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2) dans des proportions bien supérieures au carbone puisque il représente 79 à 80% de l'air ; non assimilable par les plantes. Mais seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de fixer l'azote moléculaire de l'atmosphère. Ce processus, appelé fixation biologique de l'azote, est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol.

A l'échelle mondiale la fixation biologique annuelle de l'N est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Newton 1998).

II .La fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère de l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_3) ; cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Hopkins, 2003).

L'intérêt de la fixation biologique de l'azote par la culture des légumineuses a été mis en avant de longue date comme support de la fourniture d'azote aux systèmes cultivés et

demeure stratégique dans le contexte actuel de mise au point de modes de production agricoles plus économes énergétiquement et plus respectueux de l'environnement (Thiébeau et al., 2010).

II.1. Les bactéries fixatrices d'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est l'œuvre exclusive des microorganismes diazotrophes qui possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, permettant de réduire l'azote moléculaire (N₂) en azote ammoniacal plus au moins assimilable par les végétaux (Rees et Howard, 2000). Les différents microorganismes fixateurs d'azote atmosphérique se regroupent en 2 grandes catégories:

Les fixateurs libres (appelées aussi bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques), vivant dans le sol, appartiennent à des genres très divers. Se sont principalement :

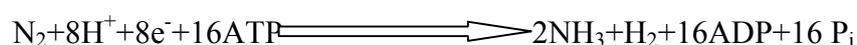
- des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*.
- des bactéries anaérobies : *Clostridium*.

Les fixateurs symbiotiques comprennent le groupe des rhizobia qui établissent une association symbiotique avec les légumineuses dans des structures racinaires ou caulinaires organisées appelées nodosités (ou nodules). La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les bactéries et la plante.

Les symbioses Frankia-plantes actinorhziennes où, les bactéries actinomycètes du genre *Frankia* infectent les racines de plantes des genres *Alnus* et *Casuarina*. Ils forment des nodules au niveau des racines et dans lesquels, des filaments bactériens se développent à l'intérieur des cellules. Celles-ci se différencient en vésicules sièges de la fixation de l'azote.

Les cyanobactéries (algues bleu-vert), vivant à la surface des racines des plantes ou même dans les tissus de certains végétaux, développent des symbioses avec un grand nombre de plantes : *Nostoc* et *Celothrix* chez les lichens ; *Anaebaena* chez les champignons, les fougères ainsi que certains arbres (Hopkins, 2003).

Ces microorganismes sont capables de réduire l'azote gazeux suivant la réaction globale:



Cette réaction se déroule sous des conditions normales de température et de pression, grâce à la nitrogénase.

II.2. La nitrogénase

La nitrogénase est un complexe enzymatique particulier, elle contient du molybdène, du fer et de sulfure dans ces groupements prosthétiques. Ces éléments sont donc indispensables à la fixation de l'azote. La nitrogénase utilise également de grandes quantités d'ATP comme source d'énergie ce qui fait de la fixation de l'azote un processus métabolique onéreux (Raven *et al.* ;2007).

Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez les procaryotes. Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines :

1) Une dinitrogénase réductase : (appelée Nitrogénase I) qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

2) Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramériques) $\alpha_2\beta_2$ de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4Fe - 4S) reliés entre eux deux par deux. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N_2 en NH_3 (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

III. La symbiose rhizobia- légumineuses

III.1. Propriétés symbiotiques

Chez les végétaux supérieurs, l'acquisition des minéraux à partir du sol est d'une importance majeure et la carence en ces éléments constitue une limite à leur développement. Certains végétaux ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'établir des associations symbiotiques avec des microorganismes du sol dans le but d'améliorer l'acquisition des nutriments ; certains de ces associations se forment à l'intérieur des cellules de la racine de l'hôte végétal et sont appelées endosymbioses racinaires (Mbengue, 2010).

La symbiose rhizobia-légumineuses continue à constituer le principal mécanisme biologique d'apport d'azote dans les systèmes de production agricole. L'efficacité de cette

fixation comparée aux autres sources d'azote utilisée par les plantes est généralement évaluée à l'aide de l'analyse de l'abondance isotopique naturelle de N^{15} qui permet de distinguer spécifiquement l'azote issu de la fixation, de celui apporté par les fertilisants (Boddey et al., 2000).

III.2. Intérêts de la symbiose

La fixation de l'azote par association symbiotique entre les rhizobies et la grande famille des légumineuses apparaît d'un intérêt stratégique renforcé tant pour sa capacité à fournir de l'azote à faible coût aux systèmes de culture que pour ses répercussions environnementales (Germon, 2013). On estime que la moitié de la fixation biologique de N_2 est réalisée par cette symbiose, avec un taux allant de 10 à 300 kg de N_2 fixé par hectare et par an, et produit 25 à 35 % des protéines mondiales. Les légumineuses sont principalement utilisées dans l'alimentation humaine et animale pour leur teneur élevée en protéines. Ces cultures représentent un marché mondial d'environ 2 milliards de dollars par an (Werner et Newton, 2005, Lindström et al., 2010),

IV. La nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Anna, 2008; Lohar et al., 2009).

La nodulation des légumineuses par les rhizobies est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous-famille des *Faboideae* (pois, haricot, fève, lentille, ...), 90% de la sous-famille des *Mimosoideae* (robinier, glycine, acacia, ...) et 30% de la sous-famille des *Caesalpinioideae* sont nodulées (de Faria et al., 1989).

La nodulation se fait au cours des différentes étapes: colonisation de la rhizosphère, infection, développement des bactéroïdes (Baulieu, 2004).

VI.1. Mécanismes moléculaires de la nodulation

Le site de fixation symbiotique est le nodule, le seul organe localisé sur la racine qui fonctionne pour la survie des bactéries et l'activité de la nitrogénase. La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi, 2000 ; Limpens et Bisseling, 2003).

L'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia et un échange de molécules-sigales. Les bactéries reconnaissent des flavonoïdes qui sont sécrétées par la plante hôte. Ces molécules induisent la production de facteurs NOD par les rhizobia (Oldroyd, 2001).

IV.1.1. Les facteurs NOD

Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Dénarié *et al.*, 1996).

Les facteurs NOD agissent essentiellement sur deux types de cellules au niveau de la racine: les cellules épidermiques et corticales. Au niveau des cellules épidermiques, les facteurs NOD induisent une dépolarisation de la membrane plasmique, une oscillation du flux de Ca^{2+} , une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en «crosse de berger» qui enferme les rhizobia (Esseling *et al.*, 2003).

IV.1.2. Les flavonoïdes

Parmi les molécules exsudées par les racines des légumineuses, les flavonoïdes participent au dialogue moléculaire qui s'établit entre l'hôte et les bactéries. Les flavonoïdes sont des molécules issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Leur synthèse a lieu dans la plupart des organes des plantes et ont des rôles variés comme par exemple la pigmentation des fleurs (anthocyanines), la défense en réponse aux pathogènes (phytoalexines), la germination du tube pollinique, ou la signalisation symbiotique. Molécules composées de trois cycles aromatiques, il en a été découvert plus de 4000. Elles sont classées suivant l'arrangement des cercles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent. Les principales classes de flavonoïdes sont les Chalcone, Flavanone, Flava-3-ol, Flavone, Isoflavone, Flavonol et Anthocyanine (Taylor et Grotewold, 2005).

V. Les bactéries nodulants les légumineuses

Rhizobia est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses et de fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Actuellement

on préfère substituer au terme « Rhizobia » qui est un terme dérivé du nom de genre rhizobiums; le terme BNL ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (Zakhia et *al.*, 2004).

V.1. Diversité taxonomique des rhizobia

Les rhizobia ou BNL appartiennent au règne des procaryotes à la division des Gracillicutes, de la classe des alpha ou bêta Protéobactéria et ils sont répartis dans 06 différents familles (Sawada et *al.*, 2003).

Grâce aux progrès technologiques utilisés en taxonomie qui se basent sur des critères morphologiques, physiologiques ainsi que sur l'analyse des séquences d'ADN, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique (Chen *etal.*, 2001; Moulin et *al.*, 2001, Benhizia et *al.*, 2004; Franche et *al.*, 2009). Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (classe des α -protéobactéries) et *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des β -protéobactéries) ainsi que certaines bactéries de la classe γ -protéobactéries forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuse (Zakhia et de Lajudie 2001; Moulin et *al.*, 2001; Chen et *al.*. 2001; Ngom et *al.*, 2004).

Le peu des γ -Proteobacteria décrites actuellement sont des bactéries associées aux nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum* ; alors que les légumineuses nodulées par les α et β - proteobacteria présentent une grande diversité (Benhizia et *al.*, 2004. Balachandar *etal.*, 2007).

V.2. Diversité écologiques des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries telluriques qui vivent à l'état libre ou en symbiose avec les légumineuses. Ce sont des organismes chimioorganotrophes exigeant des conditions d'aérobiose, leur présence dans les sols pauvres et dégradés des climats arides et semi arides témoigne de leur parfaite adaptation aux conditions défavorables de l'environnement. La caractéristique phénotypique et les techniques moléculaires ont montré qu'une minorité de rhizobia présente une étroite spécificité vis-à-vis des légumineuses; cependant, la majorité présente une large gamme d'hôtes (Zahran, 2001).

La classification des rhizobia est en changement permanent. Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des critères utilisés pour la taxonomie : la morphologie la physiologie et l'analyse des séquences (Berrada et Benbrahim, 2014).

VI. Les légumineuses

Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses produisent des protéines en abondance (leurs grains contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée. Ainsi, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, ces espèces adaptées constituent une importante source de nourriture humaine (pois chiche, haricot, pois, lentilles, arachide...). Elles représentent pour les populations un apport en protéines, une source de revenu (huile, gomme, ...), de fourrage (luzerne, trèfle, ...) et de bois (Acacia, Dalbergia,...). Ainsi, les légumineuses couvrent globalement 66% des besoins de subsistance des communautés rurales dans les pays en voie de développement, tout en assurant un maintien durable de la fertilité des sols et de l'équilibre des écosystèmes (Domergue, 2006).

VI.1. Classification

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Allen et Allen, 1981 ; Broughton, 1984). Cette famille appartient au phylum des rosales (Neyra, 1992) et comprend des plantes herbacées annuelles prédominant les régions tempérées, tandis que les plantes ligneuses ou arborescentes caractérisent les régions chaudes. Elles colonisent aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre (Guignard et Dupont, 2005).

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (Guignard et Dupont, 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

- **Les *Mimosoideae*** : ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales ; les fleurs sont symétriques. Elles sont en majorité des arbres et arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (Glycine, Acacia,...) (Maxted et Bennett, 2001a).

Les *Caesalpinioideae* : ont habituellement des fleurs comme des papillons et à étamines unies, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les Rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des Caesalpinieae et Cassieae ; les tribus Cercideae et Amherstieae étant très peu nodulées (Maxted et Bennett, 2001a).

Les *Papilionaceae* : représentent la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement des herbes et de petits arbustes distribués dans le monde entier. Elles sont présentes en régions tempérées et tropicales, et inclut les légumineuses à grain bien connues telles que des haricots et des pois (Ferchichi, 2006). Elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur appelé étendard, deux pétales latéraux ou ailes et une carène formée par deux pétales inférieurs unis ; les sépales au nombre de 5 sont soudés en tube ; les 10 étamines sont habituellement incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil, ou avec une étamine. Parmi les 21 % d'espèces déjà examinées la grande majorité (97%) est nodulée (pois, haricot, fève, lentille...) par les Rhizobia (Maxted et Bennett, 2001b).

VI.2.Importance des légumineuses

VI.2.1. Intérêt agronomique

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote (Journet et *al.*, 2001). Elles ne nécessitent aucune fertilisation azotée et contribuent naturellement à enrichir le sol en azote ce qui permet de réduire les coûts de production et de diminuer les pertes dues à l'érosion (Cavaillès, 2009).

Les légumineuses ont la capacité de solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires (Lazrek, 2008).

VI.2.2. Intérêt environnementale

Les légumineuses, en fournissant habitats et sources de nourriture, favorisent la survie de la faune dont les insectes pollinisateurs (la majorité des légumineuses sont des plantes mellifères).

Leur fixation de l'azote permet de réduire sensiblement les émissions de gaz à effets de serre à contrario, la fabrication d'engrais azotés nécessite des quantités importantes de gaz

naturel (55% à 65 % du bilan énergétique d'une grande culture provient de l'énergie de fabrication des engrais). (Commissariat général au développement durable, 2010). Par ailleurs, l'épuisement des sols tropicaux, provoqué par une intensification de l'agriculture et de l'élevage, est souvent aggravé par l'érosion. Pour cela, une solution consiste à planter des végétaux fixateurs d'azote. Dans le premier cas, ces végétaux servent d'engrais vert, c'est-à-dire qu'ils sont enfouis dans le sol par labourage avant de mettre en culture les céréales. Pour le deuxième cas, celui de la protection des sols érodés, les végétaux pionniers utilisés pour fixer les dunes mobiles ou les pentes dénudées, en retenant le sol par leur puissant réseau racinaire, ces végétaux peuvent appartenir à la famille des légumineuses. (Domergue, et *al.*, 1985). Quelques espèces ne sont pas dénuées de toxicité (comme par exemple les fèves de Calabar, les graines et les fleurs de *Spartium junceum*). On peut noter aussi l'usage comme insecticide : la roténone, insecticide naturel obtenu à partir de plantes du genre *Derris*, est le seul utilisable en agriculture biologique. (Saoudi 2008).

VI.2.3. Intérêt alimentaire

L'intérêt alimentaire est évident : cette famille représente le 2^{ème} rang mondial (derrière les céréales). On peut citer le soja, les lentilles, les haricots et autres fèves. Les graines des légumineuses contiennent généralement 20 à 30% de protéines et sont particulièrement riches en lysine, un acide aminé essentiel pour la croissance (Djebali, 2008).

Les variétés modernes de céréales à haut rendement (riz, sorgho, maïs) obtenues par sélection, sont exigeantes en élément minéraux ; elles épuisent rapidement les sols tropicaux qui sont, bien souvent, très pauvres en azote, en phosphore et en autre élément indispensable à la croissance des végétaux. Les quantités d'engrais azotés et phosphatés nécessaires à une amélioration des rendements sont donc élevées et le coût de ces fertilisants généralement importés des pays développés est incompatible avec les ressources financières de la grande majorité des paysans dans les pays tropicaux ou en voie de développement pour la plus part (Dommergues et *al.*, 1985).

VII. Le Genêt d'Espagne: *Spartium junceum* L.

Spartium junceum L. (Figure 2), nommé par les anglophones 'Spanish broom', et en Algérie connu sous le nom de 'Tertak' ou 'Kessaba', est une fabacée rencontrée dans les zones sèches et arides, sur le pourtour méditerranéen dont la France méridionale, la Corse incluse, l'Europe méridionale, les îles Canaries, l'Afrique du Nord dont l'Algérie et dans les zones

argileuses dans le Tell au Maroc et Asie occidentale. Cette plante s'adapte parfaitement à la sécheresse et tolère des températures allant de 12 à 15°C. Elle préfère des sols profonds, peu fertiles, de préférence bien drainés, elle a une bonne tolérance aux sols chargés en sel (www.tela-botanica.org, 2011)

VII.1. Caractères biologiques

Spartium junceum L. appartient à la sous-famille des *Papilionaceae*. C'est la seule espèce encore acceptée dans le genre *Spartium*. C'est un arbrisseau ou petit arbuste à souche ligneuse qui peut dépasser 2 mètres et atteindre parfois 5m. Ses rameaux flexibles sont effilés et cylindriques (jonciformes) d'un vert glauque bleuâtre à vert plus foncé. Il s'agit d'une plante rustique non épineuse, aisément reconnaissable à son abondante floraison de couleur jaune vif qui dure plusieurs mois (du printemps à l'été), odorante, nectarifère et mellifère. Le port buissonnant dressé, rigide, compact à tiges vertes cylindriques et striées. Son feuillage est caduc, épars et éphémère, présent juste quelques semaines au printemps, d'un vert bleuté. En été, la plante perd ses petites feuilles et assume une photosynthèse limitée, ce qui lui évite une évaporation excessive. A l'extrémité des rameaux, en grappes lâches, fleur (\pm 3cm) hermaphrodite au calice membraneux formé d'une lèvre oblique refendue à 4 à 5 petites dents, corolle à 5 pétales, en bas deux étroits soudés formant la carène, deux latéraux nommés ailes, dressé en partie haute l'étendard, pétale large ovale arrondi et recurvé, 10 étamines retroussées au filet soudé en tube, un style dressé recurvé. Elle porte alors de longues gousses atteignant jusqu'à 10 centimètres de long, aplaties, déhiscentes, oblongues (6 à 8cm), dressées, d'un vert à reflets brillants car elles sont légèrement velues virant progressivement au noir. A maturité, au moindre frôlement, elles s'ouvrent en projetant des graines réniformes (12 à 18) de couleur noire qui colonisent aisément le voisinage, d'où son nom de 'Mort jaune' (Martin, 2009).

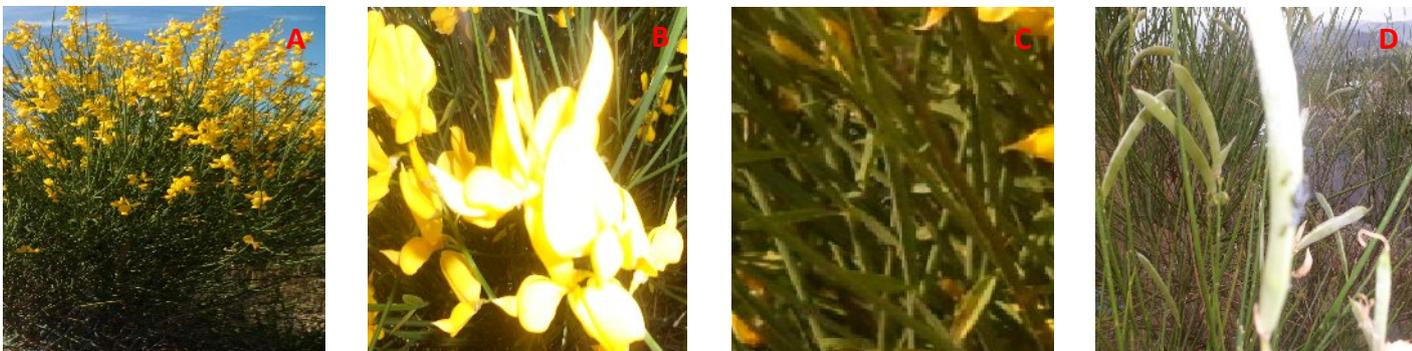


Figure 2 : Différentes parties de la plante *Spartium junceum* L. (A : plante entière, B : fleurs, C : tiges et D : gousses).

VII.2. Propriétés et utilisations

VII.2.1. Intérêt pharmaceutique

Tous le genêt mais surtout les gousses et les graines sont très toxiques, elles contiennent entre autre de la cytisine, un alcaloïde qui sur les organismes, a une action similaire à celle de la strychnine.

Des fleurs, voire des rameaux est extraite une huile essentielle (oelum aethereum), âcre et amère riche qui est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés vasoconstrictrices et tonifiantes, entrant dans des préparations tonicardiaques et l'absolue est utilisée en parfumerie. Dans les pharmacopées traditionnelles, ses fleurs sont réputées pour leur propriété apéritive, diurétique, émétique et purgative.

VII.2.2. Intérêt économique

Depuis la nuit des temps, ses tiges filamenteuses (spartes) étaient tressées pour être utilisées pour confectionner des cordages, cordelettes pour façonner la semelle des espadrilles.

Ses tiges servaient aussi de ligature pour lier les fagots, et pour confectionner des vanneries; sèchent avec parcimonie et prudence elles étaient couramment utilisées pour allumer ou raviver un feu dans une cheminée ou un four.

Dans la tradition méridionale, l'écorce après trempage était raclée, battue pour obtenir une filasse un peu cotonneuse qui était tissée donnant une toile grossière mais d'excellente qualité. Les tiges sèches sont utilisées pour confectionner des balais. Ces mêmes fibres végétales, aujourd'hui sont utilisées pour renforcer des polypropylènes pour confectionner des fils, fibres textiles et films thermoplastiques.

VII.2.3. Intérêt environnemental

Spartium junceum est une espèce pionnière utilisés dans les stratégies de restauration pour récupérer les écosystèmes perturbés et fixer les pentes érodées et instables (Barea et *al.*, 1996 ; La Marca et *al.*, 1998). En effet, le genêt d'Espagne est une plante ornementale très utilisées pour la fixation des talus routiers et autoroutiers.

Les paysans ont observé que ses racines retenaient la terre contre l'érosion sur les pentes rocheuses les moins fertiles, rendant possibles des semis de grains après quelques années ou décennies de présence des genêts sur ces lisières habituellement incultes. L'absence de

connaissances chimiques ne permettait pas de comprendre comment les nodules des racines de cette légumineuse fixent l'azote atmosphérique dans le sol, mais la présence de genêts, sur un sol destiné à recevoir des céréales ou d'autres grains par la suite, était favorable à la fertilité (Fabre et Olivier, 2013).

Par ailleurs, les travaux réalisés sur les bactéries nodulant *S. junceum* réalisés en Italie (Quartini et al., 2002), ont révélé par une approche génétique, basée sur l'analyse des séquences des gènes 16S rDNA et de l'IGS 16S-23S rDNA, l'existence d'une grande diversité au sein de ces bactéries. Ces dernières ont été rattachées au genre *Bradyrhizobium* plus particulièrement à *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium liaoningense*.

MATERIEL
ET
METHODES

I. Sites de collecte des échantillons

Des sorties de prospection et de collecte des échantillons de plantes appartenant au *Spartium junceum* L. ont été réalisées dans 03 sites différents de la région de Béjaia. Il s'agit : d'Adekar, Smaoun et Sidi-Aïch (Figure 3).

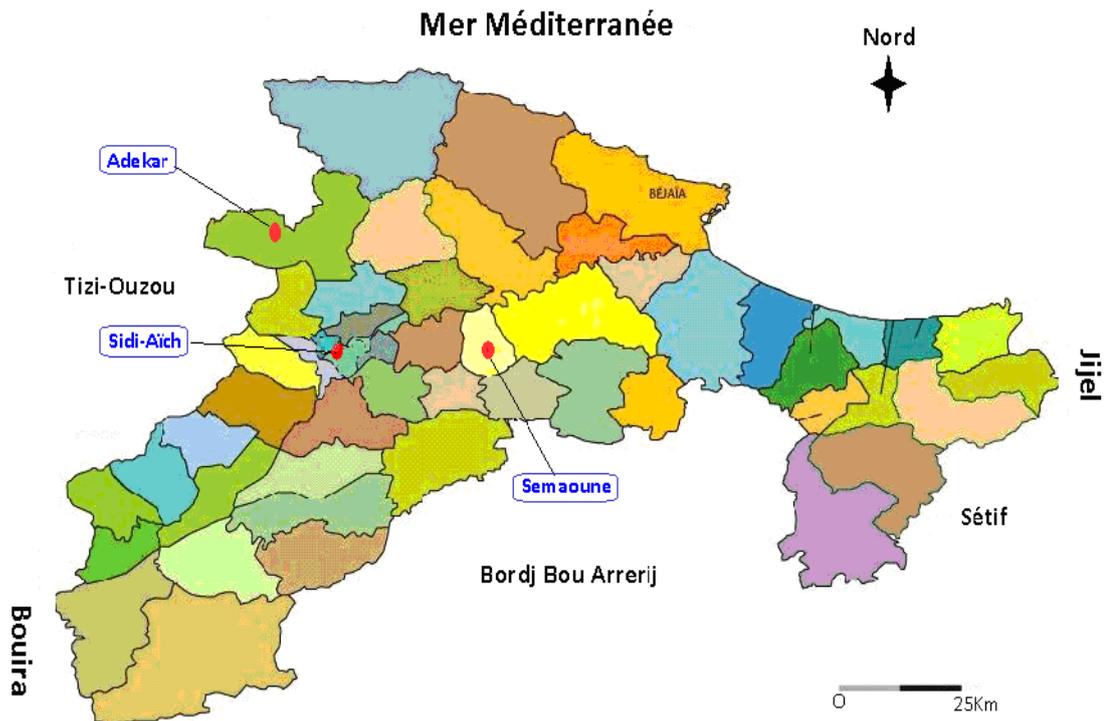


Figure 3 : Sites d'échantillonnage dans la région de Béjaia (Kabylie.com).

Sur chaque site, une collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante selon la technique préconisée par Vincent (1970). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Le sol adhérent au niveau des racines est débarrassé délicatement sans toutefois endommager les nodules. De même, nous avons prélevé sur chaque site des échantillons de sols destinés à l'analyse pédologique.

Les racines avec leurs nodules ainsi que les échantillons de sols sont transportées au laboratoire dans des sacs en plastique.

II.Méthodes

II.1. Analyse physico-chimique des sols

Les sols prélevés dans les trois sites de la région de Béjaia ont été analysés selon les techniques utilisées par le centre d'études phyto-sociologiques et écologiques Louis Emberger de Montpellier, France.

Les sols sont soumis à plusieurs traitements :

- séchage à l'air libre pendant plusieurs jours ;
- tamisage à travers un tamis de 2mm de diamètre ;
- récupération et conservation de la terre fine dans des sachets en plastique.

II.1.1. Mesure du pH

L'acidité du sol est déterminée à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre combinée trempant dans une suspension aqueuse du sol dont le rapport sol/eau= 1 /2,5. Deux mesures de pH sont effectuées, pH (eau) et pH (KCl).

II.1.2. Dosage du Carbone organique

La détermination des teneurs en carbone organique des sols est réalisée selon la méthode Anne modifiée. Elle est basée sur la combustion et l'oxydation à chaud de la matière organique en CO₂ à l'aide d'un mélange de bichromate de potassium et de l'acide sulfurique concentré. L'excès le bichromate est titré à froid par la solution de sel de Mohr (0,2N). Le taux de la matière organique est calculé en multipliant le pourcentage du carbone par 1,724 selon la formule suivante : **%MO=%C 1,724**

II.1.3. Dosage de l'azote total

Les teneurs en azote total des sols sont déterminées par la méthode classique de Kjeldahl. Sous l'action de l'acide sulfurique concentré à l'ébullition et en présence d'un catalyseur renfermant du Sélénium, l'azote organique du sol est transformé en azote ammoniacal. Ce dernier est déplacé de sa forme combinée par l'addition de soude grâce à l'appareil de Buchii.

L'ammonium libéré est recueilli dans une solution d'acide borique qu'on dose avec H_2SO_4 (0.02N).

II.1.4. Dosage des carbonates

Calcaire total

Les teneurs en calcaire total ($CaCO_3$) des sols sont déterminées par la méthode gazométrique. Le volume du CO_2 produit par le $CaCO_3$ pur est comparé au volume du CO_2 dégagé par les carbonates des sols décomposés sous l'action d'un acide (HCl 1/2). Les volumes du CO_2 recueillis dans un tube gradué sont mesurés à l'aide d'un calcimètre de Bernard.

Calcaire actif

Le calcaire actif concerne la fraction fine du calcaire total. Il est déterminé par la méthode Drouineau-Galet. Ainsi, le calcaire actif est extrait par une solution d'oxalate d'ammonium sous agitation. Après filtration, l'excès d'oxalate d'ammonium est dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu acide.

II.1.5. Le phosphate assimilable

Le phosphore assimilable dans les sols est déterminé par colorimétrie selon la méthode d'Olsen. Elle est basée sur l'extraction du phosphate avec une solution de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$, 0.5M et à pH 8.5), suivie d'une filtration. Le Phosphore extrait est dosé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 660nm, en présence de molybdate d'ammonium et de $SnCl_2$.

II.1.6. Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique a pour but de donner la composition élémentaire du sol ou texture, en classant les particules minérales en groupes correspondant à des dimensions définies.

La texture des sols est déterminée par la méthode internationale qui utilise la pipette de Robinson. Après destruction à chaud de la matière organique par l'eau oxygénée (20vol) et dispersion des agrégats par le pyrophosphate de sodium (40%), les particules fines (argiles +

limons fins) sont prélevées après un temps de sédimentation à la pipette de Robinson et les fractions grossières (sables grossiers, sables fins et limons grossiers) sont récupérées par siphonage après élimination des fractions fines. La texture des sols est déterminée par la projection des pourcentages des différentes fractions sur le triangle des textures (USDA).

II.2. Isolement des bactéries des nodules de *Spartium junceum* L.(Vincent1970).

II.2.1. Prélèvement des nodules racinaires

Les racines de la plante de *Spartium junceum* récoltée dans les trois sites de la région de Bejaïa sont lavées abondamment à l'eau de robinet pour enlever l'excès de terre puis épongées sur du papier absorbant. Les nodules sont extraits à l'aide des ciseaux en laissant quelques millimètres de racine de par et d'autre du site d'attache des nodules.

II.2.2. Stérilisation des nodules

Les nodules récupérés sont stérilisés par passage successif dans un bain d'éthanol à 96° pendant 30s, suivi d'un bain d'eau de javel à 3° pendant 3mn, puis rincés abondamment à l'eau physiologique stérile.

II.2.3. Extraction des bactéries des nodules

Les nodules stérilisés auparavant sont écrasés et broyés en conditions d'asepsie dans un tube eppendorf contenant quelques gouttes d'eau physiologique stérile à l'aide d'un pilon stérile. Une suspension du broyat nodulaire obtenu est étalée sur des boites de Pétri contenant le milieu YMA additionné du rouge Congo à 0.25% (annexe 2) . Les boites sont incubées à 28°C pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition des colonies visibles.

II.2.4. Purification des colonies

Les colonies ayant peu ou pas absorbés le rouge Congo et reconnaissables par leur aspect gommeux et translucide, sont isolées et purifiées par des repiquages successifs sur milieu YMA jusqu'à obtention des isolats purs.

II.2.5. Conservation des isolats

Les isolats purs sont conservés à 4°C dans des tubes à essai contenant le milieu YMA incliné additionné du CaCO₃.

II.3. Le test de nodulation

Le seul critère de base et fiable qui nous permet de vérifier l'appartenance d'une souche à la famille des Rhizobiaceae, est sa capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de la légumineuse hôte.

II.3.1. Préparation des plantes axéniques

En raison de non disponibilité des graines de *Spartium junceum* pendant la période de la réalisation de cette étude, le test d'authentification des isolats a été réalisé avec les graines de *Vigna unguiculata*, car elle a un large spectre de nodulation avec les Bradyrhizobium.

II.3.2. Stérilisation et germination des graines

Les graines de *Vigna unguiculata* sont superficiellement stérilisées avec de l'éthanol à 95° pendant 30 secondes, suivi d'un lavage de 3 minutes à l'eau de javel à 4°, puis rincées abondamment à l'eau physiologique stérile. Les graines stériles sont mises à germer en boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive semi solide. Les boîtes sont ensuite enveloppées avec du papier aluminium puis mises à germer à l'obscurité dans des conditions ambiantes du laboratoire.

Les plantules non contaminées et ayant une racicule d'environ 2 à 3 cm (figure 4) sont transférées aseptiquement dans des flacons contenant le milieu minéral de Jensen exempt de toute source d'azote et de carbone , à raison d'une plantule par flacon.



Figure 4: Mise en germination graines de *Vigna unguiculata* .

II.3.3. Inoculation des plantes

Les flacons contenant les plantules sont inoculés par 3 ml d'une suspension bactérienne de chacun des isolats bactériens testés. Les suspensions bactériennes proviennent des cultures bactériennes obtenues sur milieu YMB.

Nous avons prévu dans cet essai deux flacons contenant des plantules non inoculés mais renfermant de l'azote minéral (100mg/l NH_4NO_3) et deux autres flacons non inoculés. Ces quatre flacons serviront respectivement comme témoin azoté (TN^+) et témoin non azoté (TN^-).

Les flacons ainsi préparés sont couverts du papier journal pour assurer l'obscurité de la partie racinaire, puis sont placés dans des conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire. Les plantules inoculées sont régulièrement contrôlées pour détecter l'apparition des nodules (figure 5)



Figure 5 : Dispositif du test de nodulation.

III. Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des isolats bactériens

Les souches authentifiées par le test de nodulation ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique par une série de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Afin de caractériser nos souches et de situer avec précision la position taxonomique de nos souches, nous avons introduit dans cette étude une souche de référence de *Bradyrhizobium* sp. RST89, isolée des nodules de *Reatama sphaerocarpa* par Boulila et al., (2009).

III.1. Caractérisation morphologique

III.1.1. Morphologie des colonies

L'aspect, la forme, le contour, la couleur, l'élévation, la translucidité, la taille et la mucoïdité des colonies sont déterminés sur milieu YMA en boîtes.

III.1.2. Morphologies des bactéries

La mobilité, la forme et la présence des granules de β -hydroxybutyrate (PHB) ont été déterminées par observation au microscope photonique (G x100) à l'état frais d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB.

III.1.3. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries d'après leur affinité pour les colorants. A à cet effet nous avons examiné les souches isolées par la technique classique qui consiste à :

- préparer un frottis sur une lame,
- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute,
- verser sur la lame la solution iodée (lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- décolorer la lame par l'éthanol à 95° en laissant tomber goutte à goutte l'alcool.
- laver à l'eau distillée.
- recouvrir la lame par la fuschine et laisser agir pendant 1 minute

- laver à l'eau distillée.
- observer au microscope (Gx100).

III.2. Caractérisation biochimique

III.2.1. Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité de nos souches à acidifier ou alcaliniser le milieu a été évaluée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol (indicateur coloré) à une concentration de 0,0025% (w/v). Les boîtes inoculées par des colonies bactériennes ont été mises en incubation à 28°C pendant 5 à 7 jours. Le virage du milieu au jaune indique l'acidification du milieu, alors que le virage du milieu au bleu foncé indique l'alcalinisation du milieu.

III.2.2. Mise en évidence de la catalase

L'activité catalasique des souches est réalisée selon une technique qui consiste à déposer une colonie de culture à étudier, prélevée sur milieu YMA, sur une lame additionnée d'une goutte d'eau oxygénée à 10volumes. La présence de catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

III.2.3. Mise en évidence de la β -galactosidase

La recherche de la β -galactosidase est effectuée par les disques ONPG. En effet, des disques d'ONPG ont été introduits dans des tubes à hémolyse contenant 0,5ml d'eau physiologique stérile et une suspension bactérienne dense. L'incubation s'effectue à 28°C pendant 30mn. La coloration jaune du disque traduit une réaction positive (ONPG+).

III.2.4. Réduction des Nitrates

Des colonies de bactéries ont été cultivées dans des tubes de bouillon nitraté et incubées à 28°C sous agitation pendant 5 jours. La réduction des nitrates a été mise en évidence par l'addition de 5 gouttes de réactif NR₁ (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et 5 autres de réactif NR₂ (α -naphtylamine dans l'acide acétique 5M). Une réaction positive se traduit par une coloration rose ou rouge du milieu. Si le milieu reste incolore, on ajoute un peu de poudre de

zinc. Si le milieu devient donc rose ou rouge, il indique l'absence de la nitrate réductase (NR⁻), si le milieu reste toujours incolore, il indique la présence d'une nitrate et nitrite réductase (NR⁺⁺⁺).

III.2.5. Utilisation du Citrate

Seules les bactéries possédant une citrate perméase seront capables d'utiliser le citrate comme source de carbone et d'énergie. Ce test est effectué sur milieu citrate de Simmons incliné. La pente du milieu estensemencée par stries à partir d'une culture prélevée sur milieu YMA et incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours. La coloration du milieu au bleu foncé indique l'alcalinisation du milieu (réaction positive).

III.2.6. Production d'Indole

Des tubes contenant l'eau peptonée exempt d'indole sontensemencés par une suspension bactérienne et incubés à 28°C pendant 5 jours. Après addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs au milieu, la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du tube indique la présence de l'indole.

III.2.7. Formation d'acétoïne et production d'acide

Ces caractères ont été étudiés en milieu Clarck et Lubs inoculés par des cultures bactériennes. Après 5 jours d'incubation à 28°C, on prélève dans deux tubes à hémolyse respectivement 1ml et 2ml de culture. Dans le premier tube, on ajoute 0,5ml du réactif VP1 et 0,5ml du réactif VP2 et dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes de rouge de méthyle. La production de l'acétoïne à partir du glucose se traduit par :

- une coloration du milieu au rouge cerise, indique une réaction positive (VP+)
- une coloration du milieu au jaune citrin, indique une réaction négative (VP-).

Si la souche fermente le glucose et produit de l'acide, on obtient :

- une coloration du milieu au rouge, indique une réaction positive (RM+)
- une coloration du milieu au jaune, indique une réaction négative (RM-).

III.2.8. Utilisation du lactose, du glucose et production d'H₂S

Des tubes contenant le milieu spécifique de Kligler-Hajna (KIA), sont ensemencés par piqûre centrale dans le culot et par stries sur la pente par une culture bactérienne, puis incubés à 28°C pendant 5 jours. Quatre caractères ont été pris en considération :

- Culot jaune indique la fermentation du glucose,
- Pente virant au jaune indique l'utilisation du lactose par la bactérie.
- Noircissement de la zone joignant la pente et le culot indique la production d'H₂S,
- Décollage du culot vers le haut du tube et /ou l'apparition des bulles indique la production du gaz.

III.2.9. Utilisation des sucres

L'assimilation de différents substrats carbonés a été testée en boîtes de Pétri contenant le milieu YMA modifié. L'extrait de levure est remplacé par NH₄Cl et le mannitol est remplacé à raison de 1% par l'une des sources de carbone suivantes : lactose, salicine, sorbose, mannose, sorbitol, arabinose, adonitol, xylose, lévulose, maltose, galactose, glycérol, inositol, raffinose, saccharose, tréhalose, amidon, rhamnose, dextrine et cellobiose. Les boîtes ont été subdivisées en 14 secteurs. Chaque secteur a été ensemencé par spot avec une pré-culture fraîchement préparée. Les résultats ont été évalués après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C. L'utilisation des sucres par les souches est estimée par l'apparition des colonies bactériennes.

III.3. Caractérisation physiologique

III.3.1. Effet de pH

L'effet de pH a été étudié dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu YMB ajusté à des pH allant de 4 jusqu'à 10 avec du KOH (1N) ou du HCl (1N). Les tubes ont été inoculés avec 0,2ml d'une suspension bactérienne. Après 5 jours d'incubation à 28°C, la croissance bactérienne est évaluée au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 570$ nm.

III.3.2. Effet de la température

Des tubes contenant 10ml de milieu YMB sontensemencés par 0.2 ml d'une suspension bactérienne et incubés à différentes températures (20°C ; 30°C ; 40°C et 50°C) pendant 5 jours. La croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 570nm.

IV. Analyse numérique

Pour bien situer le degré de rapprochement et le regroupement entre les souches, d'une part, et entre les souches et la souche de référence RST 89 d'autre part, les résultats de l'ensemble des caractères phénotypiques étudiés ont été soumis à une analyse numérique. Cette analyse est appuyée par une Classification Ascendante hiérarchique (CAH), basée sur le calcul des distances de similarité à l'aide du logiciel XL STAT (2009). Selon la formule : $(A+C) / (A+B+C)$.

A: Caractères communs positifs ; **B :** Caractères différents ; **C:** Caractères communs négatifs.

Dans cette méthode, nous avons réalisé une matrice dans laquelle les variables sont introduites qualitativement et codées « 1 » pour les variables positives ou présentes et « 0 » pour les variables négatives ou absentes. Les caractères en commun à toutes les souches ont été éliminés, car ils ne sont pas discriminants.

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

I. Analyse physico-chimique des sols

Les principales caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés sont représentées dans le **tableau I**. Ces résultats sont discutés par rapport aux travaux de Soltner (1988) concernant les sols méditerranéens.

Tableau des résultats d'analyse physico-chimique des sols :

Paramètres	Stations		
	Sidi-Aich	Smaoun	Adekar
pH eau	8.4	8.5	6.9
pH kCl	8.1	8.2	6.8
%C	1.5	1.08	0.9
%MO	2.58	1.85	1.54
%N	0.14	0.11	0.07
%CaCO ₃ total	9.68	33.7	7.86
%CaCO ₃ actif	4.06	14.93	4.81
%P assimilable (ppm)	0.04	0.02	0.04
% A	31.91	0	0
% Lf	1.5	1.5	13.62
%Lg	12.76	28.16	23.91
%Sf	19.74	27.49	28.41
%Sg	34.04	29.85	34.74
Texture	Limono-argilo-sableuse	Limono-sableuse	Limono-sableuse

En tenant compte de l'échelle de classification établie par Gaucher (cité par Soltner, 1988), il apparaît que les sols de Sidi-Aich et de Smaoun, avec des valeurs de pH_{eau} respectivement de 8.4 et 8.5, sont alcalins. Tandis que le sol d'Adekar est neutre ($pH_{\text{eau}} = 6.9$).

D'après le triangle de texture USDA, les sols des sites de Smaoun et d'Adekar ont une texture limono-sableuse, avec des teneurs élevées en sables respectivement de (57.34% et 63.15%) et en limons de (29.66% et 37.53%). Ils sont fragiles car l'absence d'argiles et la présence des limons en grande quantité dans ces sols, peuvent provoquer la formation d'une structure massive, accompagnée de mauvaises propriétés physiques. Ils ont une tendance à former une croûte sous l'effet de la pluie et des arrosages (phénomène de battance). Toutefois, la présence de sables en excès permet une bonne aération, ce qui favoriserait un bon développement des plantes. Le sol de Sidi-Aïch a une texture équilibrée, avec des teneurs élevées en sables (53.78%) et en argiles (31.91%), facile à travailler. Ce type de sol ne présente pas de défauts au niveau de ses propriétés physiques, il est caractérisé par une capacité de rétention en eau relativement élevée et une structure bien développée, ce qui facilite l'aération du sol et l'enracinement des plantes.

Le calcaire est présent en proportions relativement importantes dans le sol de Smaoun (33.7%), alors que les sols de Sidi-Aïch et d'Adekar présentent des proportions faibles avec des teneurs respectivement de 9.68% et 7.86%. La richesse du sol de Smaoun en carbonates de calcium augmente sa perméabilité et son réchauffement rapide. Toutefois, la présence de calcaire à des taux élevés peut bloquer certains éléments fertilisants qui deviennent alors non disponibles pour les plantes.

Le taux de carbone organique diffère d'un sol à l'autre, il est de 1.5% pour Sidi-Aïch, 1.08% pour Smaoun et de 0.9% pour le sol d'Adekar. On constate que les sols de Sidi-Aïch et Smaoun ont des pourcentages élevés en matière organique, respectivement de 2.58% et 1.85% ; alors que le sol d'Adekar présente un taux relativement faible (MO%=1.54%). Comparativement aux sols de Sidi-Aïch et de Smaoun, l'azote est faiblement représenté dans le sol d'Adekar, ce qui traduit une mauvaise minéralisation de la matière organique.

Les teneurs de phosphore assimilable sont relativement élevées dans les sols de Sidi-Aïch et d'Adekar, ce qui favorise l'absorption et la nutrition des plantes. Par contre elles sont faibles dans le sol de Smaoun.

II. Isolement et authentification des souches

A partir des nodules fraîchement prélevés des racines de la plante *Spartium junceum*, récoltée dans les stations de Sidi-Aïch, Smaoun et Adekar, nous avons constitué une collection de

33 souches bactériennes. Les résultats de la réinoculation de nos isolats aux cultures de *Vigna unguiculata*, montrent que seules 16 souches bactériennes ont induit la formation de nodules visibles à l'œil nu sur la plante ; dont 04 isolées d'Adekar, 05 de Smaoun et 7 de Sidi-Aich, ce qui confirme l'appartenance de nos isolats à la famille des *Rhizobiaceae* (Tableau II.).

Tableau II : Origine des souches et résultats du test de nodulation.

Origines	Nombre de souches	Nombre de bactéries Nod ⁺	Code des souches Nod ⁺
Adekar	8	4	SjAdk13, SjAdk14, SjAdk19, SjAdk23
Smaoun	10	5	SjSM6, SjSM8, SjSM10, SjSM11, SjSM12
Sidi-Aich	15	7	SjSA5, SjSA7, SjSA16, SjSA17, SjSA18, SjSA20, SjSA22
Total	33	16	

Notons que les premières nodosités sont apparues 3 semaines après inoculation et qu'au-delà de la 6^{ème} semaine, aucun nouveau nodule n'apparaît .

L'incapacité des 17 souches à induire la formation des nodules, serait due à l'incompatibilité et à la spécificité de reconnaissance entre les deux symbiotes. En effet, certaines bactéries ont un spectre large mais d'autres dépendent du génotype de la plante hôte (VERNIE. 2008).



Figure 6 : Photographies montrant l'apparition des nodules chez quelques isolats.

III. Caractérisation phénotypique des Bactéries nodulant *Spartium junceum* L.

Les souches qui ont montré une capacité à former des nodules sur la plante *Vigna unguiculata* ont été retenues pour une caractérisation phénotypique, basée sur les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques afin d'étudier leur diversité.

III.1. Caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules

III.1. 1. Caractéristiques morphologiques des colonies

On observe que les colonies apparaissent après 5 à 8 jours d'incubation à 28°C sur milieu YMA, ce qui indique que la croissance des bactéries est lente, caractéristique des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. (Moreira et al 1993). Elles ont un aspect lisse, circulaire à punctiforme, de taille variable de 1 à 2mm de diamètre, à contour régulier, de couleur blanche. Elles sont bombées, muqueuses, translucides ou opaques (Tableau III).

Tableau III : Caractères morphologiques des colonies.

Souches	Caractères						
	Forme	Aspect	Taille (Ø)	Couleur	Élévation	Mucoïdité	Transparence
SjAdk13	Circulaire	Lisse	2mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjAdk14	Punctiforme	Lisse	< 1mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjAdk19	Circulaire	Lisse	1mm	blanche	Peu bombée	muqueuse	translucide
SjAdk23	Circulaire	Lisse	2mm	crème	bombée	muqueuse	opaque
SjSM6	Circulaire	Lisse	2mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSM8	Circulaire	Lisse	1mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSM10	Circulaire	Lisse	1à2 mm	crème	bombée	muqueuse	opaque
SjSM11	Punctiforme	Lisse	<1mm	blanche	Peu bombée	muqueuse	opaque
SjSM12	Circulaire	Lisse	1à2 mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA5	Circulaire	Lisse	1mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA7	Circulaire	Lisse	2mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA16	Circulaire	Lisse	1à2mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA17	Circulaire	Lisse	2mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA18	Punctiforme	Lisse	<1mm	blanche	bombée	muqueuse	translucide
SjSA20	Circulaire	Lisse	2mm	crème	bombée	muqueuse	translucide
SjSA22	Circulaire	Lisse	1 à 2mm	blanche	bombée	muqueuse	opaque

III.1.2. Caractéristiques cellulaires

L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions bactériennes a montré que toutes les souches ont une forme de petits bâtonnets à extrémités arrondies. Elles sont mobiles et à Gram négatif. En plus de ces caractères, ces bactéries présentent un aspect réfringent qui résulte de la production de granules de β -polyhydroxybutyrate (PHB) (Figure 7).



Figure 7 : Coloration de Gram de quelques souches observées sous microscope (Gx100).

III.2. Caractérisation biochimique

III.2.1. Le test de bleu de bromothymol

A l'exception des souches SjAdk14, SjAdk23, SjSM8. qui ont donné une réaction acide (virage du milieu au jaune), la majorité des souches testées alcalinisent le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol, ceci est traduit par le virage de la coloration du milieu au bleu foncé, indiquant que ces bactéries sont à croissance lente.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jordan (1984) qui considère que les bactéries qui alcalinisent le milieu sont dites à croissance lente et appartiennent au genre *Bradyrhizobium*. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira et al., (1993).

La figure 8 montre l'alcalinisation (bleu) et l'acidification (jaune) du milieu YMA additionné de bleu de bromothymol de quelques bactéries.



Figure 8: Acidification et alcalinisation du milieu sur YMA +BTB.

III.2.2. Tests biochimiques

Les résultats du tableau IV indiquent que toutes les souches sont incapables de produire de l'indole à partir du tryptophane. Seule la souche SjsA5 produit l'H₂S. De plus, la production de gaz n'est remarquée que chez 04 souches (SjAdk19, SjsM6, SjsM11, SjsA20). L'activité catalase est retrouvée chez toutes les bactéries à l'exception des souches SjAdk14, SjsA17 et SjsA22. La β-galactosidase est présente chez toutes les bactéries excepté les souches suivantes : SjAdk23, SjsM8, SjsM11, SjsA16, SjsA20. Elles utilisent toutes le citrate hormis les souches SjAdk13 et SjAdk14. Seules les souches SjAdk19, SjAdk23, SjsM23, SjsM11 acidifient le milieu (RM+), alors que les autres souches produisent de l'acétoïne à partir de glucose (VP+).

Tableau IV : caractérisation biochimique des isolats

Caractères Souches	CAT	BTB	NR	β-gal	RM	VP	Ind	Cit	H ₂ S	GAZ	LAC	GLU
SjAdk13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
SjAdk14	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
SjAdk19	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
SjAdk23	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
SjsM6	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
SjsM10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
SjsM8	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
SjsM11	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
SjsM12	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
SjsA5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
SjsA7	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
SjsA16	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
SjsA17	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
SjsA18	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
SjsA20	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
SjsA22	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
RST89	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+

Cat: Catalase, **NR** : Nitrate Réductase, **CIT:** Citrate, **BTB:** Bleu de bromothymol, **Ind:** Indole, **β-gal:** β-galactosidase, **RM:** rouge de méthyle, **VP** :Voges Praskaeur, **LAC:** Lactose, **GLU:** Glucose.

III.2.3. Utilisation des substrats carbonés

L'utilisation des sucres comme seule source de carbone et d'énergie par les bactéries nodulant *Spartium junceum L.* est testée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA modifié comme le montre la figure 9 et tableau V.



Figure 9 : Exemple de résultats de l'auxanogramme de quelques souches obtenu avec le galactose.

Les résultats consignés dans le tableau N°V montrent que le degré d'utilisation des substrats carbonés varie d'une souche à l'autre.

Nous remarquons que le galactose, l'amidon et le mannitol sont assimilés par toutes les souches. Il faut noter également que la souche SjsA22 assimile tous les sucres testés, alors que la souche (SjAdk14) n'assimile ni les disaccharides ni les trisaccharides. Seule la souche SjsA7 n'utilise pas l'arabinose comme source de carbone. Le tréhalose et le maltose sont les moins utilisés par les souches. Enfin, les polyalcools sont les plus utilisés par la majorité des souches étudiées, à l'exception de la souche SjsA16 qui utilise uniquement le mannitol.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Jordan (1984) qui a montré que la croissance des *Bradyrhizobium* est faible lorsque la source de carbone du milieu est constituée de disaccharides. D'autres travaux (Stowers, 1985) ont montré que les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, avec une préférence marquée pour certains hexoses, notamment le galactose ou à certains polyalcools tels que le mannitol ou le glycérol.

Tableau V : Utilisation des substrats carbonés.

Souches	SjAdk13	SjAdk14	SjAdk19	SjAdk23	SjM6	SjM8	SjSM10	SjSM11	SjSM12	SjSA5	SjSA7	SjSA16	SjSA17	SjSA18	SjSA20	SjSA22	RST89
Pentoses																	
Xylose	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Hexoses																	
Mannose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Sorbose	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Levulose	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Dissaccharides																	
Saccharose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Lactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Tréhalose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Cellobiose	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Trisaccharides																	
Raffinose	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Polyosides																	
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrine	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Polyalcools																	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Adonitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

III.3. Caractérisation physiologiques

III. 13.. Effet du pH sur la croissance bactérienne

La figure 10 montre que l'optimum de croissance de la plupart des souches testées se situe entre pH 7 et 9. La souche SjSA5 présente un optimum de croissance à pH 10. Il y a lieu de noter que la croissance de toutes les souches est faible aux pH acides.

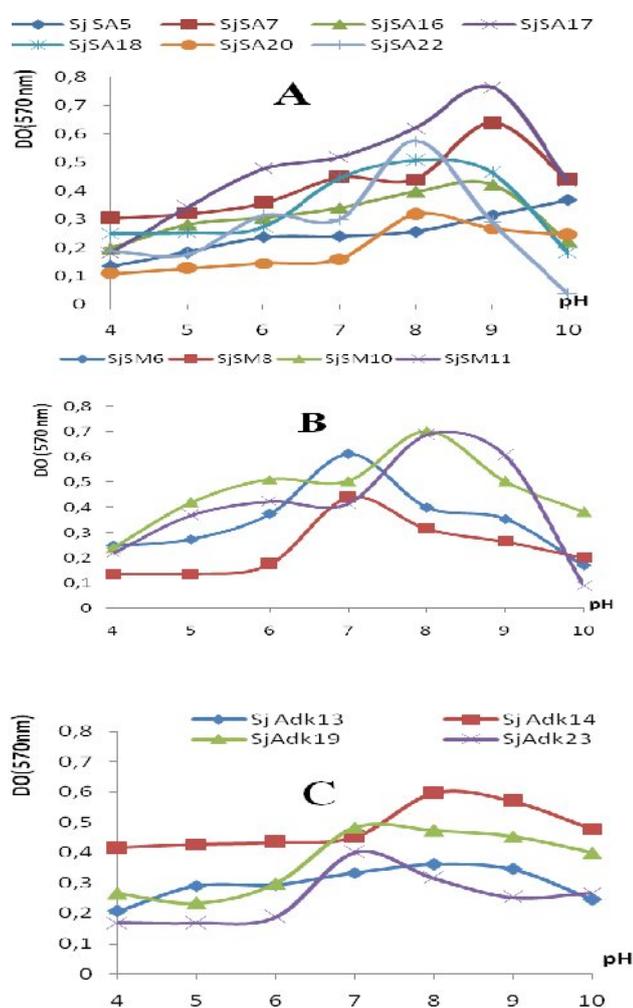


Figure 10 : Effet du pH sur la croissance des bactéries isolées des nodules de *Spartium junceum* L. des sites **A** (Sidi- Aïch) ; **B** (Smaoun) ; **C** (Adekar).

D'après les résultats obtenus, la plupart des souches étudiées tolèrent plus les milieux basiques que les milieux acides. La tolérance des souches à l'alcalinité du milieu serait due du fait qu'elles proviennent toutes des sols légèrement alcalins ou alcalins.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jordan (1984) et Yadav et Vyas (1971) qui ont rapporté que les souches à croissance lente (*Bradyrhizobium*) ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 alors qu'elles sont sensibles aux pH acides.

III.3. 2. Effet de la température

Les résultats de la figure 11 montrent que la plupart des isolats étudiés sont capables de se développer à des températures situées entre 20°C et 40°C. Par ailleurs, la croissance de la plupart des souches bactériennes s'annule à 50°C.

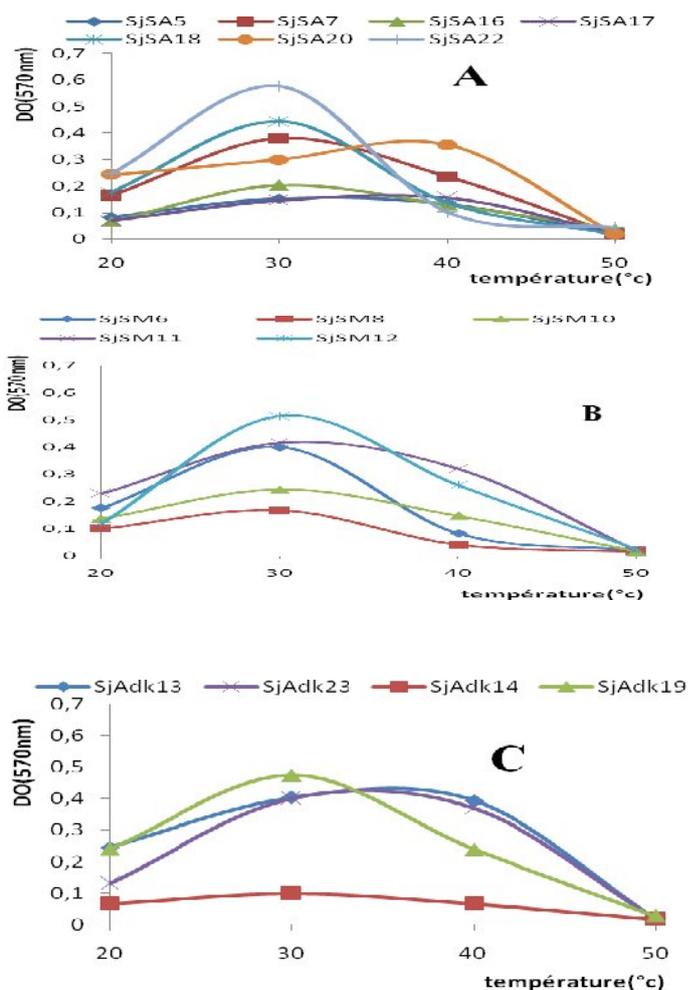


Figure 11: effet de la température sur croissance des bactéries isolées des nodules de *Spartium junceum* L. des sites **A** (Sidi- Aïch) ; **B** (Smaoun) ; **C** (Adekar).

correspond à la gamme des températures de croissance des rhizobia qui sont mésophiles du fait qu'elles poussent bien entre 20 et 30°C (Jordan, 1984 ; Graham, 1992). Il a été également rapporté que les *Bradyrhizobium* sont plus thermotolérantes que les souches à croissance rapide (Robert et al., 1982).

VI. Analyse numérique des critères phénotypiques

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées des racines de *Spartium junceum* a été basée sur 29 caractères. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau VI (annexe 1). Les résultats ont été traités par UPGMA, basé sur le calcul de l'indice de similitude de Sneath et Sockal. Le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) montre qu'à une distance de similitude de 0.64, les souches sont réparties en deux principaux groupes A et B.

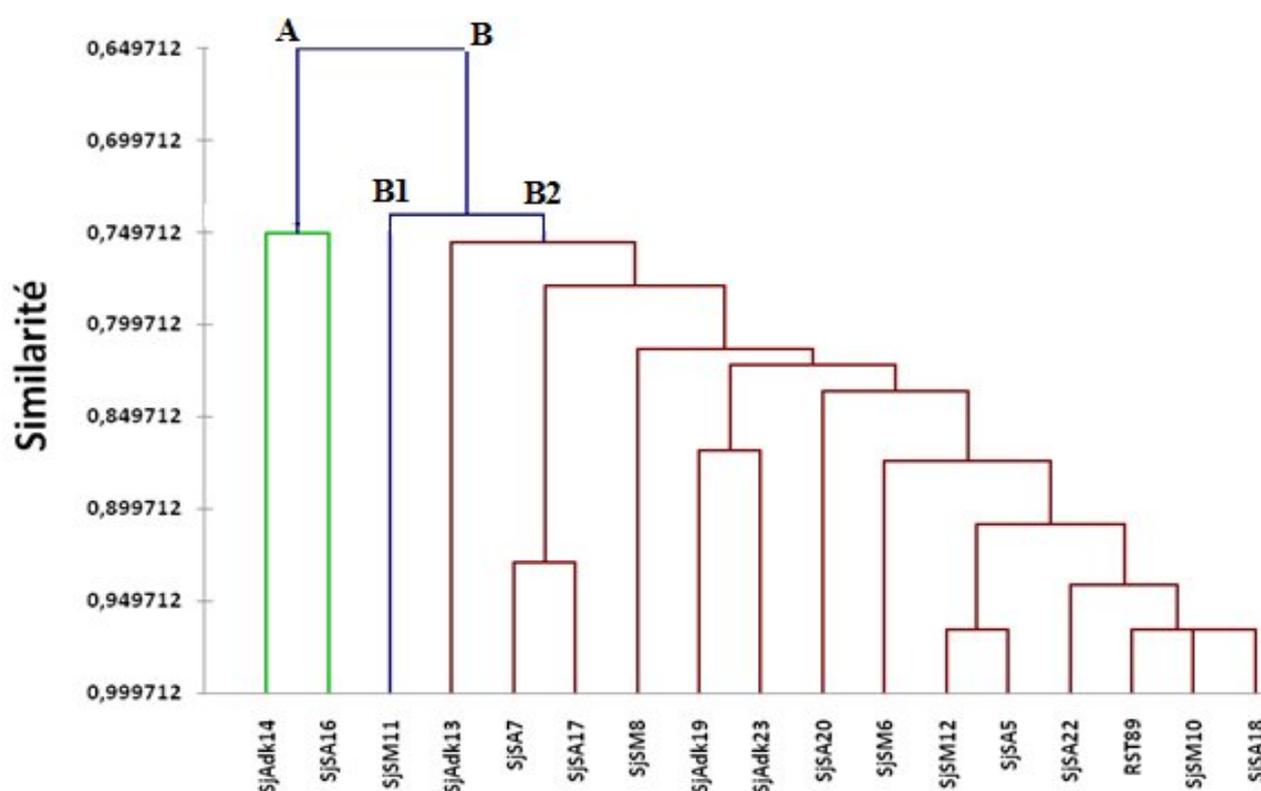


Figure 12 : Classification Ascendante Hiérarchiques des souches sur la base des caractères phénotypiques (Annexe 1).

Le groupe A est constitué uniquement de deux souches (SjAdk14 et SjSA16), isolées essentiellement de deux stations (Adekar et Sidi-Aich). Ces souches partagent 17 caractères phénotypiques en communs. En effet, elles se distinguent par leur capacité de réduire les nitrates (NR⁺) et possèdent une catalase. Elles sont incapables de produire le gaz et l'H₂S. De même elles sont incapables d'assimiler levulose, sorbitol, mannose, inositol, sorbose, tréhalose et maltose. Par contre elles assimilent l'arabinose et dextrine comme seule source de carbone et d'énergie. Elles alcalinisent le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol (BTB+) et tolèrent une température de 40°C. Enfin, elles sont toutes RM⁺ et VP⁻

Le groupe B est composé de 15 souches incluant la souche de référence (RST89), soit 88 % des souches de la collection provenant des trois stations étudiées. Ce groupe est lui-même subdivisé en 2 sous-groupes B1 et B2. Le sous-groupe B1 ne renferme qu'une seule souche SjSM11.

Le sous-groupe B2 renferme le reste des souches qui représente 82% de l'effectif. Ce groupe renferme deux souches SjSM10 et SjSA18 très proches de la souche de référence et ne diffèrent entre elles que par trois caractères (maltose, levulose et rhamnose).

L'ensemble des caractères phénotypiques étudiés montre, qu'à l'exception des deux souches du groupe A, l'existence d'une similarité phénotypique entre la majorité des isolats nodulant *Spartium junceum* L. et ceci indépendamment de leurs sites géographiques. Toutefois, certaines souches telles que SjAdk13, SjAdk19, SjAdk23 du site d'Adekar ou encore SjSA7, SjSA17, SjSA20, SjSA5, SjSA18 du site de Sidi-Aich) et SjSM8, SjSM6, SjSM10, SjSM12 du site de Smaoun, présentent des caractéristiques phénotypiques différentes de celles des autres isolats des mêmes stations, ceci reflète une importante diversité phénotypique des isolats. Nos résultats sont en accord avec ceux de Jordan (1984), Stowers (1985) et Graham (1992) qui ont rapporté que la distribution des rhizobia est indépendante de leurs sites d'origine.

Enfin, les résultats relatifs à l'étude aussi bien morphologique, biochimique et physiologique laissent entrevoir un fort rapprochement des isolats du groupe B à la souche de *Bradyrhizobium* sp. (RST89) isolée des nodules de *Retama sphaerocarpa*, sans pour autant appartenir à cette espèce. D'autres études complémentaires, basées sur une approche génotypique, seront nécessaires pour déterminer avec précision la position taxonomique de nos isolats.

CONCLUSION

Par la présente étude, nous avons procédé à un isolement suivi d'une caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Spartium junceum* L., collectée de trois sites de Béjaia (Sidi-Aïch, Smaoun et Adekar). Sur chaque site de prélèvement, une étude pédologique des sols a été réalisée afin de connaître les conditions édaphiques d'habitat de cette légumineuse et de son microsymbiote.

Les résultats de l'analyse physico-chimique ont montré que les sols retenus à l'étude sont neutres à alcalins et présentent des textures limono-sablonneuses ou une texture équilibrée, avec un taux de calcaire élevé pour le sol de Smaoun.

A partir des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L., nous avons isolé 33 souches bactériennes. Cependant, le test de nodulation par inoculation de ces souches à la plante *Vigna unguiculata*, nous a permis d'obtenir 16 souches bactériennes capables d'induire la formation des nodules sur leurs racines, confirmant ainsi leur appartenance à la famille des *Rhizobiaceae*.

L'étude phénotypique des souches basée sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, appuyée par une analyse numérique, a révélé une diversité au sein de cette population.

Le fait que toutes les souches ont une croissance lente et que les colonies n'apparaissent qu'à partir du 5^{ème} jour d'incubation sur milieu YMA, nous permet de penser qu'il s'agit de *Bradyrhizobium*. De plus, la plupart des souches alcalinisent le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol, ceci plaide en faveur de cette classification.

Toutes les bactéries sont des petits bâtonnets à extrémité arrondie, mobiles, à Gram négatif et présentent des granules de PHB. La plupart des souches possèdent une catalase et une nitrate réductase. Elles sont incapables de produire l'indole à partir du tryptophane et le H₂S n'est produit que par la souche (SjSA5).

Elles présentent une large gamme d'utilisation de substrats carbonés avec une préférence aux polyalcools et monosaccharides. Elles assimilent toutes le mannitol, le galactose et l'amidon comme source de carbone et d'énergie.

Les températures optimales pour leur croissance sont situées entre 20 et 30°C. Toutefois, certaines souches sont susceptibles de tolérer des températures de 40°C.

La plupart des souches présentent un optimum de croissance compris entre pH 7 et pH 9, avec une préférence aux pH basiques.

L'analyse numérique des caractères phénotypiques semble décerner deux groupes distincts dont le premier est constitué de deux souches, tandis que le deuxième renferme les autres souches liées à la souche de référence *Bradyrhizobium* sp. (RST89).

En perspective, il est souhaitable d'approfondir ce travail par :

- l'enrichissement de cette collection par d'autres bactéries provenant d'autres régions d'Algérie;
- l'étude d'autres caractères et réalisation d'autres tests, notamment le test de nodulation croisée, pour affiner l'analyse phénotypique. Cette dernière doit être suivie dans une seconde étape par une caractérisation génétique et moléculaire basée sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, de l'IGS, des gènes *nod* et des gènes de ménage (*recA*, *glnII*...), ceci afin de bien situer la position taxonomique des microsymbiotes de la légumineuse *Spartium junceum* L.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Allen, O. N. and Allen, E.K. (1981).** The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison
- Anna M Fortes, Filipa Santos, Young H Choi, Marta S Silva, Andreia Figueiredo, Lisete Sousa, Fernando Pessoa, Bartolomeu ASantos, Mónica Sebastiana, Klaus Palme, Rui Malhó, Rob Verpoorte and Maria S. Pais. (2008).** Organogenic nodule development in hop (*Humulus lupulus* L.): Transcript and metabolic responses. *BMC Genomics*. 9: 445- 473.
- Balachandar, D.; Balachandar, P.; Raja, K. Kumar and. Sundaram, SP. (2007).** Non- rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol 2 (2) : 049-057.
- Barea, JM, ; Requena, N. ; Jimenez, I.(1996).** Une Stratégie de végétalisation basée sur la gestion des mycorhizes, *Rhizobium* et rhizobacteria : vers la remise en état des écosystèmes des maquis désertifiés Méditerranéens. In « mycorhization des plantes forestières sous les zones Arides et Semi-Arides et conditions de lutte contre la désertification dans le bassin Méditerranéen ». Actes du séminaire du CIHEAM Groupe de Travail, 15-17 Novembre 1995 Saragosse, Espagne. *Cahiers-Options-Méditerranéennes* 20, 75-86.
- Benhizia, Y. ; Benhizia, H. ; Benguedouar, A.; Muresu, R.; Giacomini, A. et Squartini, A. (2004).** Gamma protéobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System. Appl. Microbiol.* 27:462-468.
- Berrada, H. ; Benbrahim, K.F. (2014).** Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives.
- Boddey, R.M ; Peoples, M.B , Palmer, B.; Dart P.J. (2000).** The use of ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52:35-270.
- Boulila,F., Depret.G., Boulila,A., Belhadi,D., Benallaoua,S., Laguerre,G. (2009).** Retama species growing in different ecological- climatic areas of northestern Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 245-255.
- Broughton, W.J. (1984).** Nitrogen fixation: Legumes. *The Journal of Chartto and Windus* 2Td Londres.117.
- Chen, W.M. ; Laevens, S. ; Lee, T.M. ; Coenye, T. ; De Vos, P. ; Mergeay, M. ; Vandamme, P. (2001).** *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov.isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1729-1735.

- Cleland, E.E. and Harpole, W.S. (2010).** Nitrogen enrichment and plant communities. *Ann N Y Acad Sci.* 1195, 46-61.
- De Faria, SM.; Lewis, GP; Sprent, JI. et Sutherland, JM. (1989).** Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 111: 607-619.
- Dénarié, J.; Debellé; F.; Promé, J.C. (1996).** Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors, signaling molecules mediating recognition and morphogenesis *Annu Rev .Biochem* 62:503-535.
- Djebali, N. (2008).** Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago trunculata* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicago* et *Aphanomyces euteiches*. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse-Paul III; Sabatier. France 184p.
- Dommergues., O. (2006).** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens*, une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. École Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la vie et de la terre- France, 33p.
- Dommergues, Y. ; Dreyfus, B. ; Hoang Gia Diem et Duhoux, E. (1985).** Fixation de l'azote et agriculture tropicale. Présentation de nouvelles plantes fixatrices d'azote, mise au point complète sur les symbioses fixatrices d'azote atmosphérique et leur fonctionnement. *La Recherche*, n° 162, pp. 22 - 31.
- Esseling, John J.; Lhuissier, Franck G.P. ; Anne Mie C. Emons. (2003).** Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982–1988.
- Fabre, É. ; Olivier S. (2013).** « Franchir la marge : entre *outfield* et *infield*. Le cas du genêt et de la lavande dans le Midi de la France (xviii^e-xx^e siècle) », dans Beck C., Guizard F., Bodinier B. (études réunies par), *Lisières, landes, marais et friches : les usages de l'inculte de l'Antiquité au xxi^e siècle*, hors série de la *Revue du Nord*, collection Art et Archéologie, n° 18, p 31-38.
- Ferchichi, A. (2006).** Diversité des Fabaceae Fourragères et de leurs Symbiotes. Workshop International -Alger- *Academic Publ.* 39: 51-75.
- Foucher, F. et Kondorosi, E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago* . *Plant Mol. Biol.* 43 : 773-786.
- Franche, C., Lindstrom, K., Elmerich, C. (2009).** Nitrogen- Fixing bacteria associated with leguminous and non- leguminous plant . *plant soil* 321: 35-59.
- Germon, J.C. (2013).** Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées. France 15p.

- Graham, P.H. (1992).** Stress tolerance Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. microbial.* 38: 475-484.
- Guignard, J.L. (2005).** Botanique systématique moléculaires 12^{ème} édition ED Ed Masson paris. 290p.
- Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. *Edition de Boeck.* pp 99-120.
- Jaffré, T. et Pelletier, B. (1992).** plantes de nouvelles calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers .Nouméa nouvelle calédonie Orstom /SLN 115P.
- Jordan, D.C. (1984).** Bergey's manual of systematic bacteriology. the Williams & Wlkins Co. Baltimore Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). Vol.1. p. 234-254.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., and Gianinazzi-Pearson, V. (2001).** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 737-748.
- La Marca, O. , Gambi, L. , Pignatti, G. , Sanesi, G. (1998).** Studi e vegetazionali ambientali su una discarica di RSU sottoposta juin interventi di recupero. *Monti e Boschi* 49 : 13 – 23
- Lazrek Benfriha, F. (2008).** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat- Université Toulouse III - Paul Sabatier, France. 254p.
- Leclerc, H.; Gaillard, J. L.; Simonet, M. (1995).** Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien . DOIN EDITEURS. pp 412-415.
- Lindstrom, K.M.; Murwira, A.; Willems, N.A. (2010).** The biodiversity of beneficial microbe- host mutualism: the case of rhizobia. » *Research in Microbiology* 161(6): 453-463.
- Limpens, E., Bisseling. T. (2003).** Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 343–350
- Lohar, D.; Stiller, J.; Kam J.; Stacey, G. and Gresshoff, P.M. (2009).** Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277-285.
- Martin, Ph. (2009).** Histoire naturelle du genêt d'Espagne. Dans Olivier S. (dir.). Le genêt textile. Plante sauvage, plante cultivée, Lodève, CCLL, coll. *Les Cahiers du Lodévois-Larzac*, n°34 : 14-17.

- Maxted N et Bennett, S.J. (2001a).** 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. 39:1-32.
- Maxted, N. et Bennett, S.J. (2001b).** Legume diversity in the Mediterranean region. 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: 51-75.
- Mbengue, M. (2010).** Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse: recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*. Thèse de Doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier- France, 146p.
- Moreira F.; M. Gillis, B. Pot; Kersters K.; Franco. A. A. (1993).** Characterisation of Rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Sys; Appl . microbiol. 16: 135-146.
- Moulin, L.; Munve, A.; Dreyfus, B. and Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of β subclass of Proteobacteria . *Nature*. 411: 948-950.
- Newton, W.R. (1998).** Nitrogénase : fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13: 238- 241.
- Ngom, A. ; Nakagawa,Y. ; Sawada, H. ; Tsukahara, J. ; Wakabayashi, S. ; Uchiumi,T. ; Nuntagij, A. ; Kotepong, S. ; Suzuki, A. ; Hgashi, S. and Abe, M. (2004).** A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50(1): 17-27.
- Oldroyd, G. (2001).** Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Annals of Botany* 87: 709-718.
- Peret, B. (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France).
- Quatrini, P.; Scaglione, G.; Cardinale, M.; Caradonna, F. and Puglia, A.M. (2002).** *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 92: 13–21.
- Quézel, P. & Médail, F. 2003.** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Paris, Elsevier. 592p.
- Saoudi, M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus* 99p.
- Sawada,H., Kuykendall.L.D ., Young. J.M (2003).** Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen- fixing legume symbionts *J Gen .App. Microbial* 49:155-179.

- Sebihi, F.Z. (2008).** les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) : caractérisation des bactéries associées aux nodules da légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*.Thèse de Magister.Université de Constantine. Algérie.
- Soltner, D. (1988)** : Les bases de la production végétale. Le sol- le climat- la plante- Tome 1 : le sol. 16^{ème} édition. Collection Sciences et Techniques Agricoles. France. 453p.
- Stowers M.D (1985).** Carbon metabolism in Rhizobium species .Ann. Rev Microbial 39;89-108.
- Taylor, L.P.et Grotewold, E. (2005).** Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 8: 317-323.
- Thiébeau, P.; lo-Pelzer, E. ; Klumpp, K. (2010).** Conduite des légumineuses pour améliorer l'efficacité énergétique et réduire les émissions de gaz à effet de serre à l'échelle de la culture et de l'exploitation agricole. *Innovations agronomiques*, pp11- 45- 58.
- Vernie,T .(2008).** Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *MedicagoTruncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat , université ToulouseIII-paul Sabatier , Toulouse 263P.
- Vernie, T. ; Moreau, S.; de Billy, F.; Plet, J.; Combiér, J.P.; Rogers, C.; Oldroyd, G.; Frugier, F.; Niebel, A. and Gamas, P. (2008).** EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 20: 2696-2713.
- Vincent, J.M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Werner, D.; Newton; W. E. (2005).** Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Dordrecht, Pays Bas, Springer.
- Zahran, H.H. (2001).** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and Biotechnology. *Journal of biotechnology.* 91: 143 153.
- Yadav N. K. and Vyas S. R. (1973).** Salt and pH tolerance of rhizobia. *Folia Microbiologica* 18: 242-247.
- Zakhia, F.; de Lajudie, P. (2001).** Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21:569-576.
- Zakhia, F.; Jeder, H.; Domergue, O.; Willems, A.; Cleyet-Marel, J.C. ; Gillis, M.; Dreyfus, B. and de Lajudie, P.(2004).** Characterisation of wild legumes nodulating baceria (LNB) in the infrared zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* pp27: 143-153.

Sites numériques:

Commissariat général au développement durable. (2010). La culture des légumineuses Au service de la biodiversité.

www.tela-botanica.org, 2011

www. Taxonomie of the rhizobia .2014.

ANNEXE

Annexe 1 : Matrice des caractères phénotypiques utilisés pour l'analyse numérique.

Souches	SjSM6	SjSM8	SjSA16	SjSM11	SjAdK13	SjAdK14	SjSM10	SjAdK19	SjAdK23	SjSA5	SjSA7	SjSM12	SjSA17	SjSA18	SjSA20	SjSA22	RST89
Catalase	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
nitrate	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-gal	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
RM	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
VP	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Citrate	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
H2S	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GAZ	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
lac*	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
GLU*	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1
BTB	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
T20	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
T40	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dex	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sacc	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rham	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
Lev	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Sor	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mann	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Raf	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
Inosi	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Ara	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
XYL	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
Sal	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
Ado	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sob	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Gly	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TRh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
Mal	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
cell	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1

Caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L.

Résumé

Seize souches de bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L. récoltées de trois régions de Béjaïa. Elles étaient capables d'induire la formation des nodules sur la plante *Vigna unguiculata*.

Les isolats authentifiés par le test de nodulation ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers une étude morphologique, biochimique et physiologique suivie d'une analyse numérique. Les résultats montrent que les souches sont à croissance lente et elles se divisent en deux groupes distincts dont la plupart sont liées à la souche de référence RST89, *Bradyrhizobium* sp.

Mots- clés : *Bradyrhizobium*, *Spartium junceum* L., Caractérisation phénotypique, Bejaïa.

Phenotypical characterization of bacteria isolated from root nodules of the legume *Spartium junceum* L.

Abstract

Sixteen bacterial strains were isolated from root nodules of the legume *Spartium junceum* collected from three localities in Bejaïa. They were able to induce the formation of nodules on the plant *Vigna unguiculata*.

The isolates authenticated by nodulation test were subjected to a phenotypical characterization through a morphological, biochemical and physiological study followed by a numerical analysis. The results show that the strains are slow growing and divided into two distinct groups which, for the most, are closely related to the reference strain RST89 *Bradyrhizobium* sp.

Key words: *Bradyrhizobium*, *Spartium junceum* L., phenotypical characterization, Bejaïa.