

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité/Option : Microbiologie appliquée

Département : EGE

Thème

Etude morphologique et biochimique des bactéries nodulant les légumineuses

Présenté par :

- **Bouabid Hana**
- **Kelaiaia Boutheyna**

Devant le jury composé de :

Président : Boumaaza O. MCB **Université de Guelma**

Examineur : Boussadia MI. MCA **Université de Guelma**

Encadreur : Torche E. MCA **Université de Guelma**

2023/2024

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements **Mme Torche E** pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer.

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury **Mme Boussadia M.I** et **Mr Boumazaa O.** qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.

Nous tenons également à remercier **Mr Nedjah** qui nous a aidés pendant la réalisation de ce travail.

Nous n'oublions pas d'adresser nos remerciements à **Mme Hayatte**, l'ingénieur du laboratoire de microbiologie pour son aide ainsi que toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers.

Nous adressons également nos plus vifs remerciements, à tous les enseignants, qui nous ont donné la base de la Biologie.

Enfin, merci du fond du cœur à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail .

Dédicaces

Je m'incline devant **Dieu** tout puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Je dédie ce modeste travail :

À ma chère **maman Wahiba**, celle qui a été toujours là pour moi dans les moments les plus difficiles de ma vie. Que Dieu la garde pour moi.

À mon cher **papa Rachid**, l'homme qui a illuminé mon chemin avec ses conseils, celui qui m'a élevé sur la vertu et la morale et m'a comblé de sa bonté et tendresse, celui qui porte le poids de la vie afin que je ne me sente pas privée. Que Dieu te donne santé et longue vie.

À mon cher frère **Mourad** et son épouse **Chahrazad**, je vous souhaite à tous les deux un avenir plein de joie, de bonheur et de sérénité, que Dieu vous compense par le meilleur de ce que vous avez perdu.

A mes chères sœurs : **Meryem** et **Yasmin** qu'elles étaient toujours à mes côtés et qu'elles m'ont encouragé sans cesse. Les mots ne suffisent guère pour exprime l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour elles.

À toute ma famille « **Kelaiaia** » et « **Gharbi** »

À mon binôme Hana pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension.

À mes adorables « **Amel**, **Lilya** et **Khouloud** » pour l'encouragement et l'aide qu'elles m'ont toujours accordé. J'ai partagé avec vous des moments inoubliables. Merci d'être là pour moi.

J'ai vraiment l'honneur de vous avoir dans ma vie et je tiens à vous remercier de tout mon cœur.

Boutheyna

Dédicaces

A qui ont toujours été à mes cotés ; A ceux qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus difficiles et avec lesquels j'ai partagé les meilleurs et mauvais moments. C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail

A l'être le plus cher de ma vie, à la source d'amour incessible à mon support dans ma vie, mon père **Farid** et à celle qui m'a donné la vie, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui a été a mes cotées durant toutes les années de mes études, à ma très chère mère

Samira. Que **ALLAH** le garde et le protégé.

A mon chère frère **Aymen** et son épouse **Nour** leur soutien m'a aidé.

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

Mes adorables sœurs **Nada, Lina, Aridj** et ma petite **Raounek**

Mon cher fiancé **Zakarya**, qui ma aidé et encouragé

Ma binome **Boutheyna**

A toute ma famille qui me donnent l'amour et la vivacité « Bouabid »et «Foughali»

A toutes mes amies surtout **Hadjer, Hadil, Kaouthar, Wiem** et **Maissa**

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu.

Hana

Liste des abréviations

API : Analytical Profile Index

API20E : Analytical Profile Index 20 Entérobactéries

API 20NE : Analytical Profile Index 20 Non Entérobactéries

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses

CaCl₂ : Chlorure de Calcium

CaCO₃ : Carbonate de Calcium

DO : Densité Optique

Hg Cl₂ : Chlorure de Mercure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

GPA+BCP : Glucose Peptone Agar + Pourpre de Bromocrésol

N : Azote

N₂ : Diazote

NaCl : Chlorure de Sodium

NH₄⁺ : Ammonium

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO₃⁻ : Nitrate

pH : Potentiel Hydrogène

YMA : Yeast Mannitol Agar

YMA-RC : Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo

YMA+BTB : Yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol

YMB : Yeast Mannitol Broth

Liste Des Figures

Figure 01. Section d'une racine montrant la structure de la rhizosphère	3
Figure 02. Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère	4
Figure 03. Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestre	5
Figure 04. Espèce <i>Bituminaria</i>	8
Figure 05. Espèce <i>Lotus edulis</i>	10
Figure 06. Etape de la nodulation	18
Figure07. Localisation géographique de la wilaya de Guelma	20
Figure 08. (a) <i>Lotus edulis</i> (b) <i>Bituminaria</i>	21
Figure 09. (a) <i>Lotus edulis</i> après rinçage (b) <i>Bituminaria</i> après rinçage	21
Figure 10. (a) Nodule de <i>Lotus edulis</i> prêt à être utilisée ou conservé (b) Nodule de <i>Bituminaria</i> prêt à être utilisée ou conservé.....	22
Figure 11. Conservation des nodules sous CaCl ₂	22
Figure 12. Ensemencement par la technique des quatre cadrans	23
Figure 13. Spectrophotomètre.....	26
Figure 14. Galeries API 20 E et 20NE après ensemencement	27
Figure 15. Croissance des isolats de <i>Bituminaria</i> sur milieu YMA.....	30
Figure 16. Croissance des isolats de <i>Lotus</i> sur milieu YMA.....	31
Figure 17. Croissance des isolats de <i>Bituminaria</i> sur milieu YMA-RC.....	31
Figure 18. Croissance des isolats de <i>Lotus</i> sur milieu YMA-RC.....	32
Figure 19. Croissance des isolats de <i>Bituminaria</i> sur milieu YMA+BTB.....	33
Figure 20. Croissance des isolats de <i>Lotus</i> sur milieu YMA+BTB.....	33
Figure 21. Croissance des isolats de <i>Bituminaria</i> sur milieu GPA+BCP.....	34
Figure 22. Croissance des isolats de <i>Lotus</i> sur milieu GPA+BCP.....	35
Figure 23. Croissance des souches isolées sur milieu YMB.....	35
Figure 24. Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100).....	36
Figure 25. Croissance des isolats de <i>Bituminaria</i> à différentes valeurs du Ph.....	39
Figure 26. Croissance des isolats de <i>Lotus</i> à différentes valeurs du pH.....	39
Figure 27. Test Mannitol-Mobilité après 24h.....	40
Figure 28. Test Hydrolyse de l'urée après 24h.....	41
Figure 29. Tests catalase et oxydase.....	42
Figure 30. Résultats des galeries API 20 E.....	43
Figure 31. Résultats des galeries API 20 NE.....	44

Figure 32. Dendrogramme API E.....	46
Figure 33. Dendrogramme API NE.....	47

Des Tableaux

Tableau 1. Le nombre des espèces <i>rhizobiales</i> dans la famille <i>Rhizobiaceae</i>	13
Tableau 2. La croissance à différentes concentration du Na Cl.....	37
Tableau 3. Croissance à différentes valeurs de température.....	38
Tableau 4. Test de Mannitol-Mobilité.	40
Tableau 5. Test Hydrolyse de l'urée.....	41
Tableau 6. Les résultats des tests catalase et oxydase.....	42
Tableau 7. Résultats de la galerie API 20E des souches.....	43
Tableau 8. Résultats des galeries API 20NE des souches.....	44
Tableau 9. Souches utilisées dans l'étude statistique.....	45
Tableau 10. Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20E.....	45
Tableau 11. Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20NE.....	46

Sommaire

Liste des abréviations

Liste Des Figures

Liste Des Tableaux

Résumé

Summary

ملخص

Introduction..... 1

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

1. Généralités sur la rhizosphère.....	3
2. Microorganismes de la rhizosphère.....	4
3. Azote.....	5
3.1. Cycle de l'azote.....	5
3.1.1. Fixation del'azote.....	6
3.1.2. L'ammonification.....	6
3.1.3. La nitrification.....	6
3.1.4. La dénitrification.....	6
3.2. Fixateurs biologiques de l'azote.....	6
4. Interaction plantes légumineuses-bacteries.....	7
4.1. Légumineuses.....	7
4.1.1. La légumineuse Bituminaria.....	7
4.1.2. La légumineuse Lotus.....	9
4.2. Les bactéries Rhizobia.....	10
4.2.1. Caractéristiques des Rhizobia.....	10
4.2.2. Classification des Rhizobia.....	12
5. Nodulation.....	14
5.1. Nodulation chez la bactérie.....	14
5.1.1. Gènes nod.....	14
5.1.2. Facteurs nod.....	15
5.2. Nodulation chez la plante.....	16

5.3. Les étapes de la nodulation.....	16
5.3.1. Pré échange de signal d'infection.....	16
5.3.2. Attachement et infection.....	17
5.3.3. Maturation des bactéroïdes et Développement du nodule.....	17
6. Importance de l'identification biochimique des bactéries.....	18

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Description de la zone d'étude.....	20
2. Collect des nodules.....	21
3. Conservation des nodules.....	22
4. Isolement des souches bactériennes à partir des nodules.....	23
4.1. Stérilisation des nodules.....	23
4.2. Isolement des bactéries.....	23
5. Caractères culturaux.....	23
5.1. Les milieux solides.....	23
5.2. Le milieu liquide.....	24
6. Examen microscopique par coloration de Gram.....	24
7. Conservation des souches.....	24
8. Caractérisation des isolats.....	25
8.1. Caractères physiologiques.....	25
8.1.1. Tolérance au Chlorure de Sodium.....	25
8.1.2. Température de croissance.....	25
8.1.3. Croissance à différentes valeurs du Ph.....	25
8.2. Examen de la mobilité.....	25
8.3. Caractères enzymatiques.....	25
8.3.1. Hydrolyse de l'urée.....	25
8.3.2. L'oxydase.....	26
8.3.3. La catalase.....	26
8.4. Caractérisation biochimique par l'utilisation des galeries API.....	26
8.4.1. Préparation de la suspension bactérienne 0.5 McFarland.....	26
8.4.2. Galerie API 20 E.....	27
8.4.3. Galerie API 20 NE.....	27
9. Analyse statistique.....	28

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Caractérisation morphologique.....	29
---------------------------------------	----

1.1. Caractères culturaux.....	30
1.1.1. Croissance sur milieu YMA.....	30
1.1.2. Croissance sur YMA+ RC.....	31
1.1.3. Croissance sur milieu YMA+BTB.....	32
1.1.4. Croissance sur milieu GPA +BCP.....	34
1.1.5. Croissance sur milieu YMB.....	35
1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram.....	36
2. Caractérisation des isolats.....	36
2.1. Caractères physiologiques.....	36
2.1.1. Tolérance au Chlorure de Sodium.....	36
2.1.2. Température de croissance.....	37
2.1.3. Croissance à différentes valeurs du Ph.....	38
2.2. Examen de la mobilité.....	39
2.3. Caractères enzymatiques.....	40
2.3.1. Hydrolyse de l'urée.....	40
2.3.2. L'oxydase.....	41
2.3.3. La catalase.....	42
3. Caractérisation biochimique par l'utilisation des galeries API.....	42
3.1. Galeries API 20 E.....	42
3.2. Galerie API 20 NE.....	44
4. Analyse statistique.....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	50

Résumé

Les bactéries symbiotiques jouent un rôle important dans la fixation et la réduction de l'azote qui sera assimilé par les plantes. Ces bactéries ont une grande diversité selon les plantes légumineuses associées. Dans notre étude, nous avons essayé de caractériser les bactéries isolées à partir des plantes légumineuses (*Lotus* et *Bituminaria*). L'étude est commencée par une étude morphologique, physiologique et enzymatique, suivie par une caractérisation biochimique en utilisant les galeries API et traitée par une analyse numérique. Les résultats obtenus démontrent que nos isolats ont les traits morphologiques des *Rhizobia* et se rapprochent biochimiquement aux différentes espèces de *Rhizobia* tels que *Rhizobium trifolii* pour les isolats de *Bituminaria* et *Bradyrhizobium jaboricum* pour les isolats de *Lotus*.

Mots clés: *Lotus*, *Bituminaria*, *Rhizobia*, légumineuses, caractérisation, morphologique, biochimique.

Summary

Symbiotic bacteria play an important role in the fixation and reduction of nitrogen that will be assimilated by plants. These bacteria have a great diversity according to the associated legumes. In our study, we tried to characterize bacteria isolated from leguminous plants (*Lotus* and *Bituminaria*). The study is started by a morphological, physiological and enzymatic study, followed by a biochemical characterization using API galleries and treated by a numerical analysis. The results show that our isolates have morphological traits of *Rhizobia* and are biochemically similar to the different species of *Rhizobia* such as *Rhizobium trifolii* for *Bituminaria* isolates and *Bradyrhizobium Jabonicum* for *Lotus* isolates.

Keywords : *Lotus*, *Bituminaria*, *Rhizobia*, *leguminous*, characterization, morphological, biochemically.

ملخص

تلعب البكتيريا التكافلية دورًا مهمًا في تثبيت وارجاع النيتروجين الذي سيتم امتصاصه بواسطة النباتات. تتميز هذه البكتيريا بتنوع كبير وفقًا للبقوليات المرتبطة بها. في دراستنا، حاولنا وصف البكتيريا المعزولة من النباتات البقولية (*Lotus* و *Bituminaria*). بدأت الدراسة بدراسة مورفولوجية وفسولوجية وإنزيمية، يتبعها تصنيف بيوكيميائي باستخدام مجاميع الاختبارات البيوكيميائية المصغرة API ومعالجتها بتحليل رقمي. تظهر النتائج أن عزلاتنا لها سمات مورفولوجية لريزوبيا وهي مشابهة من الناحية البيوكيميائية للأنواع المختلفة من *Rhizobia* مثل *Rhizobium trifolii* لعزلات *Lotus* و *Bradyrhizobium Jabonicum* لعزلات *Lotus*.

الكلمات المفتاحية: *Lotus*, *Rhizobia*, *Bituminaria*, البقوليات, التصنيف, مورفولوجية, بيوكيميائي

Introduction

Introduction

La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales (Saoudi, 2008) .

L'importance des légumineuses liée à leur capacité à fixer l'azote dans leurs nodosités; Les bactéries des nodosités des racines ou bien *Rhizobia* sont des micro-organismes du sol qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec divers arbres et plantes herbacées à croissance naturelle dans les terres cultivées et non cultivées (Vandamme et al., 2002, Azani et al., 2017)

L'association symbiotique plante légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires à son développement (Wery, 1985).

La fixation biologique de l'azote joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux (Somasegaran et Hoben, 1994).

La région de l'Est algérien présente un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide et semi-aride, elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées (FAO, 2006); Parmi les légumineuses sauvages: *Lotus* et *Bituminaria* qui sont utilisées dans de nombreux pays comme plante fourragère. Ces arbustes ont acquis une attention considérable en raison de son rôle important de fertilisation azotée des terres, de protection des sols contre l'érosion et d'amélioration significative de la productivité. Ces légumineuses offrent également un aliment très nutritif pour les animaux, aussi bien grâce à son feuillage qu'à ses fruits et graines (Zennouhi et al., 2020).

Les bactéries symbiotiques jouent un rôle primordial dans le processus de l'interaction avec les plantes légumineuse par la fixation et réduction de l'azote dans les nodules racinaires. Le but de notre travail réside dans l'isolement et la caractérisation morphologiques et biochimique des souches bactériennes, symbiotiques et fixatrices d'azote, nodulant les légumineuses des genres « *Lotus* » et « *Bituminaria* » poussant spontanément dans la région de Guelma.

Après collecte des plantes légumineuses, nous avons effectué un isolement des bactéries à partir des nodules racinaires. Les isolats ont subi une caractérisation morphologique suivie par une étude culturelle, physiologique et enzymatique. La caractérisation biochimique

des bactéries isolées est réalisée par l'utilisation des galeries biochimiques miniaturisées API 20 E et API 20 NE.

Ce travail est divisé en trois chapitres principaux:

- Le premier chapitre est une synthèse bibliographique, ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique.
- Le deuxième chapitre exprime le matériel et les méthodes.
- Le troisième chapitre concerne la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale est établie pour ressortir l'apport de notre approche.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique.

1. Généralités sur la rhizosphère

En 1904, le professeur d'agronomie au collège technique de Munich, Lorenz Hiltner, a démontré l'importance cruciale des activités microbiennes dans la "rhizosphère" pour la nutrition et la santé globale des plantes. Il semble que le concept de rhizosphère se définisse lui-même, mais il n'existe pas d'accord total entre les microbiologistes du sol et les experts en plantes quant à la signification précise de ce terme. Rhizo, également appelé rhiza (du mot grec) signifiant racine, est un terme relativement simple, mais sphère à de nombreuses expressions, du corps rond à l'environnement social. Le terme était utilisé pour la première fois pour désigner la zone d'activité bactérienne la plus intense autour des racines des légumineuses (Curl et Truelove, 2012).

La rhizosphère est le volume de sol entourant les racines et influencé par les matériaux libérés par ces mêmes racines (figure 1). La surface des racines des plantes, ce qu'on appelle le rhizoplane (Prescott, 2007).

Elle est caractérisée par une forte activité microbienne due au renouvellement des composés organiques assimilables issus des exsudats racinaires, des mucilages et des cellules épidermiques mortes. L'interaction plante-microorganismes dans la rhizosphère est un processus clé qui joue un rôle primordial dans le recyclage du carbone dans la rhizosphère et notamment dans la croissance et la santé des plantes (Govaert et *al.*, 2010).

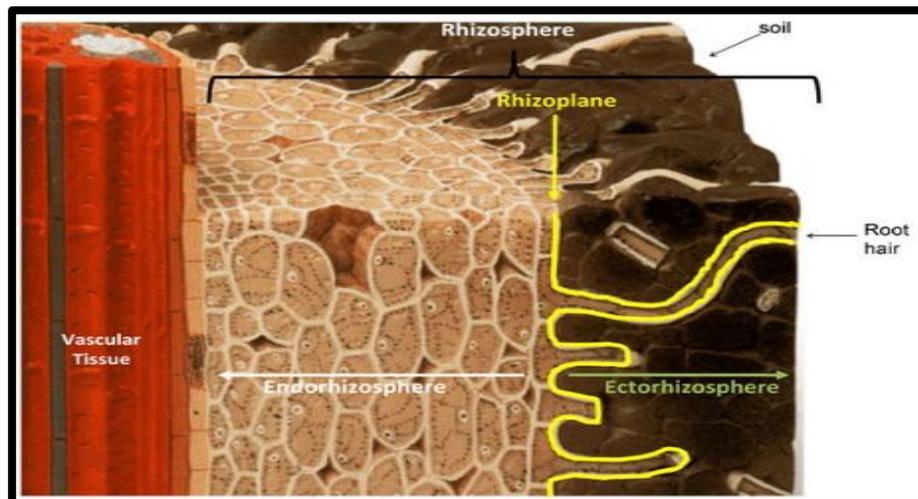


Figure 01. Section d'une racine montrant la structure de la rhizosphère [1]

Il y a trois zones distinctes dans la rhizosphère: l'endorhizosphère, le rhizoplane et l'ectorhizosphère (figure 1) (Lepinay, 2013).

Le rhizoplane est la zone de la surface des racines où les micro-organismes se fixent en utilisant des structures de surface telles que les flagelles, les fimbriae ou les polysaccharides de la surface cellulaire (Mwajita et *al.*, 2013)

L'endorhizosphère désigne l'intérieure de la racine y compris cortex racinaire, épiderme et poils racinaires, il évoque le passage graduel du sol à l'intérieur de la racine. C'est l'introduction des champignons et bactéries dans les cellules du parenchyme cortical de la plante, utilisant ses exsudats sans provoquer de lyse cellulaire et enfin l'exorhizosphère qui représente le sol adhérent à la partie racinaire de la plante (Maougal, 2014).

2. Microorganismes de la rhizosphère

La rhizosphère est une fine couche de sol qui entoure immédiatement les racines des plantes. Ceci est une zone extrêmement importante et active pour l'activité racinaire et le métabolisme. Un grand nombre de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues coexistent dans la rhizosphère. Les bactéries sont les plus abondantes d'entre eux (10^8 - 10^9 g⁻¹) (Mwajita et *al.*, 2013).

Le sol est un milieu oligotrophe, la plus part des microorganismes telluriques (algues, protozoaires, champignons, bactéries) sont impliqués dans de nombreux processus biogéochimiques. La communauté microbienne tellurique, qui joue un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et d'autres éléments, exercent également des effets bénéfiques ou délétères sur la croissance et la santé des plantes (figure 2).

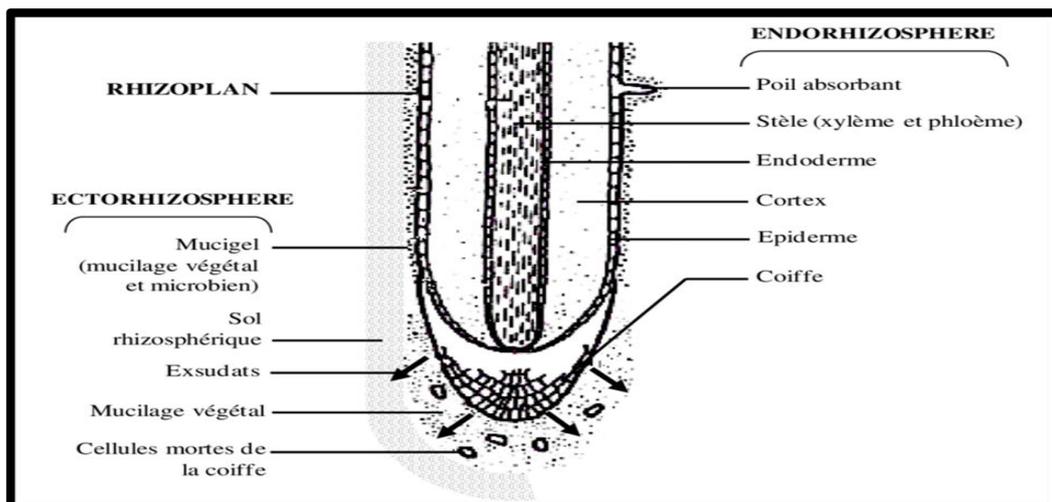


Figure 02. Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Lepinay, 2013).

3. Azote

Constituant entre autres des acides aminés et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie. L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2) non assimilable par les plantes alors qu'il constitue, avec le manque d'eau et de phosphate, une des principales limitations à la croissance des plantes. Dans le milieu naturelle, l'azote se trouve sous forme organique et inorganique, l'azote assimilable par les plantes se manifeste sous forme inorganique: NH_4^+ , NO_3^- (Madigan et Martink, 2007).

3.1. Cycle de l'azote

L'azote est généralement reparti dans trois ensembles principaux l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote. C'est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumis de nouveau l'azote dans la nature.

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, d'ammonification, de nitrification et de dénitrification. Les nitrates assimilés par les plantes et les animaux après la nitrification par une décomposition et une ammonification, puis il est de nouveau soumis à une nitrification. (figure.03)

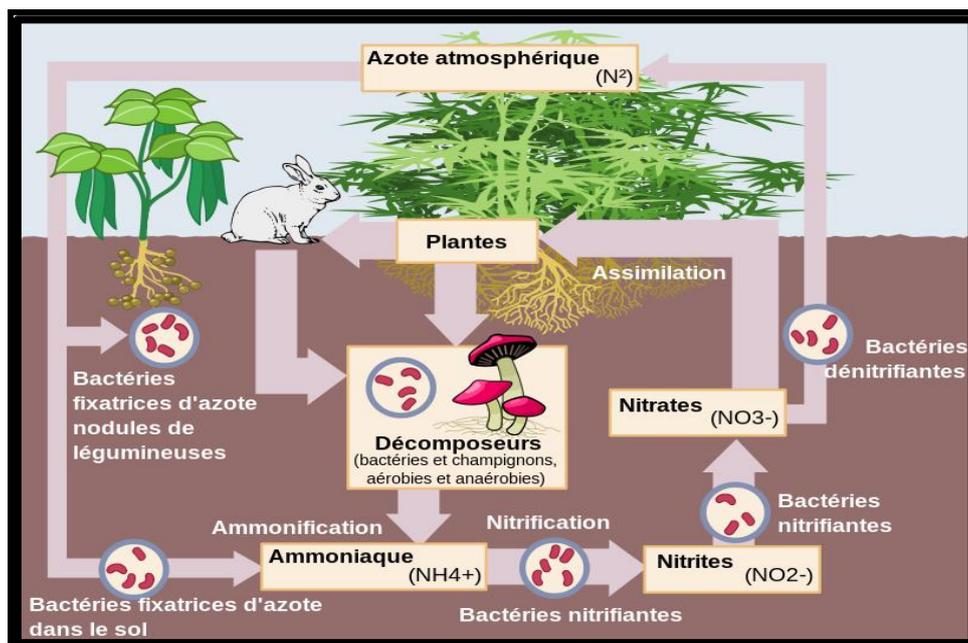


Figure 03. Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic, 2009)

3.1.1. Fixation de l'azote

La fixation de l'azote est le processus par lequel l'azote atmosphérique est transformé en ammoniac.

3.1.2. L'ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de microorganismes hétérotrophes car elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- en NO_3^- . Cette forme est transitoire et sera transformé ensuite en azote nitrique (Barbault, 2009)

3.1.3. La nitrification

La nitrification est la conversion biologique de l'azote minéral réduit (NH_4^+) en azote minéral oxydé sous forme de NO_3^- en passant par le NO_2^- . C'est un processus d'oxydation contrôlé par certains microorganismes spécifiques, qui conduit la transformation de l'ion ammonium en nitrite, puis celle de nitrite en nitrate (Barbault, 2009).

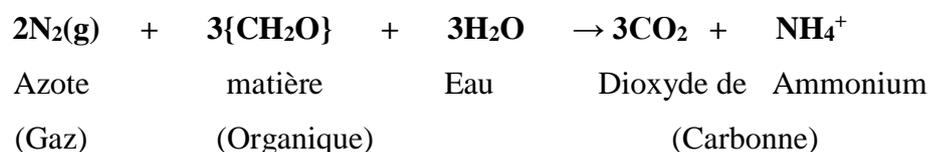
3.1.4. La dénitrification

Il s'agit d'un procédé biologique où les bactéries dites dénitrifiantes en présence de la matière organique transforment les nitrates en diazote. Le diazote retourne alors dans l'atmosphère. Cette réaction chimique produit aussi du CO_2 et de l'oxyde d'azote (N_2O) (Barbault, 2009).

3.2. Fixateurs biologiques de l'azote

De même que le carbone (C), l'azote (N) est un des éléments majeurs constituant les composants cellulaires nécessaires à la vie (notamment les acides nucléiques et les protéines indispensables à la reproduction et à la croissance). Seules certaines familles d'êtres vivants peuvent utiliser directement l'azote gazeux qui est présent dans l'air. Le mécanisme en jeu, appelé fixation biologique du diazote N_2 (diazotrophie) (LaBauer et Treseder, 2008).

C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac. 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. Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004).



4. Interaction plantes légumineuses-bactéries

4.1. Légumineuses

Les *Fabaceae* (*Leguminosae*) sont l'une des familles les plus importantes du règne plantae, comprenant environ 751 genres répartis en 19 500 espèces (Lewis, 2005). Les *fabacées* font partie de la famille des légumineuses, généralement consommées par les humains à travers le monde et utilisées comme fourrage pour les animaux qui se nourrissent des racines des légumineuses (Mekky, 2020).

Les *Leguminosae* sont divisés en trois sous-familles: les *Papilionoideae* (480 genres, 12 000 espèces), les *Caesalpinioideae* (170 genres, 2000 espèces) et les *Mimosoideae* (80 genres, 3200 espèces). Cette famille comprend des cultures de grains, d'oléagineux, de pâturages et de fourrages, de plantes ornementales et de plantes médicinales (Talukdar, 2013).

En termes d'importance agricole, les fabacées sont la deuxième famille après les graminées en termes de superficie récoltée et de production totale. La présence de cette famille dans les systèmes de production est essentielle en tant que tête de rotation grâce à leur réserve d'azote (Hadj Omar, 2008).

4.1.1. La légumineuse *Bituminaria*

Généralités

Le genre *Bituminaria* est connu également sous le nom de *Psoralea*, et compte environ 120 espèces; il s'agit d'une plante vivace et autogame (Zennouhi et al., 2020). Largement répandue dans la région méditerranéenne ainsi en Asie occidentale et en Afrique du nord. Alors qu'en Algérie se trouve généralement dans le Tell.

Bituminaria bituminosa L. (*Psoralée* à odeur de bitume) est une espèce végétale appartenant à la famille des *Fabacées* (sous-famille des *Faboïdées*, tribu des *Psoralées*), et c'est une légumineuse éternelle de sécheresse de pâturage et une source des composés pharmaceutiques, largement distribuée dans le bassin méditerranéen et Marocain. Une grande diversité existe en Îles Canaries avec trois variétés botaniques décrites et d'autres écotypes à l'étude (Zennouhi et al., 2020).

❖ Position systématique

La famille des *Fabaceae* appartient au:

- **Embranchement:** *Spermaphytes*.
- **Sous-embranchement:** *Angiospermes*.
- **Classe :** *Eudicots (Rosopsida)*
- **Sous-classe:** *Rosidaeae*.
- **Ordre:** *Fabales* (Guignard et Dupont, 2005).
- **Famille:** *Fabaceae*.
- **Genre:** *Bituminaria* est connu également sous le nom de *Psoralea*.
- **G/Esp:** *Bituminaria bituminosa* (L.) C. H. Stirt., 1981.
- **Nom scientifique:** *Psoralea bituminosa* L, *Butiminaria bituminosa*.
- **Origine du nom :** du latin « *Bituminaria* » qui désigne le bitume et son odeur

❖ Description botanique de la plante

Tige: ressemble à une luzerne mais avec de grandes feuilles, plante vivace.

Hauteur: de 20 à 100 cm.

Feuillage: feuilles longuement pétiolées composées de 3 folioles (petites parties de la feuille) allongés, ovales de 1 à 6 cm, et 0.5 à 3 cm de large. Le bord des folioles est blanchâtre et l'extrémité lancéolée. Les petites feuilles à l'attache de la feuille ou stipules sont très petites au contraire d'autres fabacées.

L'odeur de bitume des feuilles est très marquée. Les glandes sécrétrices de ces substances odorantes, sont jaunâtres et visibles à la loupe d'autres fabacées (Figure 4).



Figure 04. Espèce *Bituminaria* [2]

4.1.2. La légumineuse *Lotus*

Les *Loteae* constituent un groupe important de la flore des légumineuses d'Algérie au niveau de laquelle elle est représentée par au moins 75 taxons répartis sur 12 genres (Quezel et Santa, 1962) ce qui en fait une des plus importante de la famille des légumineuses d'Algérie puisqu'elle représente à elle seule près d'un sixième de la biodiversité de ce groupe de plantes. Les *Loteae* d'Algérie sont représentées essentiellement par des espèces herbacées et arbustives parmi les genres « *Lotus* » qui est le genre le plus important et le plus représentatif de la tribu des *Loteae*. C'est un genre cosmopolite qui comprend plus de 150 espèces (plantes annuelles et vivaces) avec deux grands centres de diversité, la région méditerranéenne (y compris des parties d'Europe, d'Afrique et d'Asie occidentale) et de l'ouest de l'Amérique du Nord (Howieson et al., 2016). Et en raison de leur capacité à former une symbiose fixatrice d'azote avec les *rhizobia*, les représentants du genre *Lotus* sont des plantes pionnières et une source de biomasse riche en protéines, ce qui leur confère un intérêt écologique et agropastoral

En Algérie, le genre *Lotus* est représenté par 26 taxons qui se rencontrent en majorité et fréquemment au niveau de la frange littorale et les hauts-plateaux du pays sous des régimes climatiques allant du semi-aride à l'humide en allant d'ouest en est (Quezel et Santa, 1962).

❖ Position systématique

- **Phylum** : Plantes vasculaires
- **Classe** : Dicotylédone
- **Ordre** : *Fabales*
- **Famille** : *Leguminosae*
- **Genre** : *Lotier*
- **Genre** : *Lotus*
- **Espèce** : *Lotier comestible*
- **Nom scientifique** : *Lotus edulis* [3]

❖ Description botanique de l'espèce

L'espèce *L. edulis* est une plante herbacée comestible annuelle connue en grèce sous le nom commun de «*Peratzouni*». Cette espèce croît sur les coteaux et les lieux sablonneux du littoral méditerranéen. Elle est bien caractérisée par son fruit épais, charnu et légèrement courbé. Les fleurs, assez grandes, sont solitaires ou par deux (Figure 5).



Figure 05. Espèce *Lotus edulis* [4]

4.2. Les bactéries *Rhizobia*

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée «*Rhizobium*» (du grec rhiza: racine et bios: vie).

4.2.1. Caractéristiques des *Rhizobia*

Une caractéristique des *Rhizobia* est leur aptitude à infecter la racine ou parfois la tige des légumineuses pour y former des nodules (test piégeage) (Emile et Michel, 2004).

- **Caractères morphologiques**

Les *Rhizobia* sont des bactéries à Gram négatifs, non sporulants. Ces bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,8 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur pour les *Rhizobia* à croissance rapide. Les *Rhizobia* à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

À l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les *Rhizobia* se transforment en bactéroïde de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et al., 2004). Donc on distingue deux formes :

Une forme végétative (non bactéroïdes) : ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes (Torche, 2006).

Une forme bactéroïdes: chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative. Une forme bactéroïdes: chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **Caractères biochimiques**

Les *Rhizobia* sont des bactéries chimioorganotrophes; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances. Les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure sur le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère pentose (Somasegaran et Hoben, 1994). Les *Rhizobia* n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

- **Caractères physiologiques**

Rhizobium est un micro-organisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7 plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **Caractères génétiques**

La génétique du *Rhizobium* n'est pas une chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Gharzouli, 2006). La taille des génomes rhizobiens connus varie de 5,4 à 9,2 Mb et le nombre de plasmides varie entre 0 et 7 (Laranjo et al., 2014). Pour toutes les souches de *Rhizobium meliloti*, la présence d'un plasmide de grande taille ou mégaplasmide (Psym) est une caractéristique instructive (Gharzouli, 2006).

- **Caractères cultureux**

Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des *rhizobia* (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Il n'est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et al., 2006).

- **Caractères symbiotiques**

Dans la relation symbiotique *Rhizobium* / plante-hôte, deux critères sont à prendre en compte, l'aptitude à noduler et l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Ces deux critères peuvent être appréciés du point de vue de la bactérie ou de la plante-hôte et sous l'influence des conditions environnementales (Emile et Michel, 2004).

4.2.2. Classification des *Rhizobia*

La taxonomie des *Rhizobia* évolue en raison de l'apparition de plus en plus de techniques efficaces pour la caractérisation des bactéries. Au cours des dernières années, la classification des *Rhizobia* a connu d'importants bouleversements en raison de nouvelles informations. Les recherches phylogénétiques et polyphasiques ont conduit à la découverte de nouveaux taxons (Zahran, 2006).

Les *Rhizobia* font partie du règne des procaryotes, de la division des *Gracilicutes*, du domaine des bacteria, de l'embranchement des *Proteobacteria*, de la classe Alpha, de l'ordre *Rhizobiales* et de la famille *Rhizobiaceae*, selon le Bergey's Manual (Jordan, 1984).

Tableau 1. Le nombre des espèce *rhizobiales* dans la famille *Rhizobiaceae* (Rao et al., 2018)

Rhizobium strain	Host plants
Class α-Proteobacteria	
I Order Rhizobiales	
I Family Rhizobiaceae	
Genus Rhizobium (98)	Different plant hosts, Peas, Clover, Lupin, Soybean, Lotus, Phaseolus, Astragalus, Chickpea, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Medicago, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mung bean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pangamia, Arachis, Pueraria
Genus Ensifer (formerly Sinorhizobium) (21)	Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena, Abrus, Lotus, Argrylobium, Psoralea
Genus Allorhizobium (1)	Neptunia
Genus Shinella (1)	Kummerowia
Genus Pararhizobium (5)	Tumor of fruits (non-symbiotic)
II Family Phyllobacteriaceae	
Genus Mesorhizobium (40)	Different hosts, Chickpea, Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amorpha, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora
Genus Phyllobacterium (8)	Lathyrus, Argrylobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora
Genus Aminobacter (1)	Anthyllis
III Family Bradyrhizobiaceae	
Genus Bradyrhizobium (37)	Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeschynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaesolus, Cowpea, Centralobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus
Genus Blastobacter (2)	Aeschynomene
Genus Photorhizobium (1)	Aeschynomene
IV Family Hyphomicrobiaceae	
Genus Devosia (1)	Neptunia
Genus Azorhizobium (3)	Sesbania
V Family Methylobacteriaceae	
Genus Methylobacterium (3)	Crotalaria, Trifolium phyllosphere
Genus Microvirga (4)	Lupinus, Listia, Cowpea
VI Family Brucellaceae	
Genus Ochrobacterium (2)	Lupinus, Cytisi
Order Burkholderiales	
Family Burkholderiales	
Genus Burkholderia (17)	Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid legumes
Genus Cupriavidus (former Ralstonia) (2)	Mimosa, Phaselous, Leucaena

5. Nodulation

Les nodules sont des nouveaux organes produits par les plantes hôtes. Dans lesquels des bactéries différenciées en bactéroïdes fixent l'azote atmosphérique (Aouadj et Saidi, 2015). C'est le seul organe localisé sur la racine qui fonctionne pour la survie des bactéries et l'activité de la nitrogénase. La plante conserve les nodules en condition de micro-oxie par les parenchymes nodulaires, et le leghémoglobine transporte et régule la concentration d'oxygène nécessaire à la respiration (Ott et *al.*, 2005).

5.1. Nodulation chez la bactérie

La nodulation chez les *Rhizobia* est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte et pour entamer cette symbiose, en décrit les gènes impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote (Dhane Fitouri, 2011).

5.1.1. Gènes nod

Les gènes nod ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants (Grama, 2008). Ce sont nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, d'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités: les gènes nol et noe (Sebihi, 2008). Les gènes de nodulation ou gènes nod incluent des gènes communs (nod A, B, C, I et J) et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) et sont activés par les flavonoïdes, des exsudats racinaires émis par l'hôte, et sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire du *Rhizobium* appelé plasmide Sym (Hopkins, 2003 ; Perry, 2004).

Ces gènes sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de *Rhizobia* et leur mutation provoquent une perte complètes de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes, en effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (Kouakou Romain, 2011).

- **Gènes nod D**

Ce sont des gènes régulateurs qui codent pour la synthèse des protéines en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante, Constituant le facteur de transcription et sont nécessaires à l'activation de l'expression des autres gènes nod de la bactérie sous l'action des flavonoïdes (Madigan, 2007 ; Werner, 1992). Chez les diazotrophes, ces gènes s'expriment de manière constitutive. Les facteurs de transcription sont donc continuellement synthétisés, que la bactérie soit en symbiose ou non (Sebihi, 2008).

- **Gènes *hsn***

Les gènes *hsn* (host specific nodulation) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter. Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les *Rhizobia*. Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Kouakou Romain, 2011).

- **Gènes *fix***

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote (Sebihi, 2008). Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase.

- **Gènes *nif***

La synthèse de la dinitrogénase et la fixation d'azote est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003), également découverts sur les plasmides bactériens. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le *Rhizobium* libre, ils sont au nombre de 20 (Grama, 2008). Ces gènes codent pour les trois sous unités hautement conservées de la nitrogénase dont *nif* H, *nif* D, *nif* K ; *nif* H codent pour la réductase alors que *nif* D et *nif* K le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo. Les *nifs* B, E et N codent, eux, pour la synthèse du cofacteur FeMo de la dinitrogénase et enfin le *nif* S pour la maturation de la dinitrogénase (Grama, 2008 ; Sebihi, 2008).

5.1.2. Facteurs nod

Les facteurs nod sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) produits par les différents gènes *nod*, *nol* et *noe*. Un polymère de N-acetyl-Dglucosamine avec des liaisons β 1-4. Les facteurs nod sont des polymères similaires sauf un acide gras remplace un groupement acétyle à l'une des extrémités de la molécule (Hopkins, 2003; Gharzouli, 2013; Sebihi, 2008). Les facteurs nod constituent un signal essentiel dans le développement symbiotique, ces signaux peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial. En absence des facteurs nod, les *Rhizobia* ne peuvent infecter les racines des légumineuses. Elles reconnaissent des flavonoïdes et d'autres molécules sécrétées par la plante hôte (Gharzouli, 2013; Kouakou Romain, 2011 ; Lydie, 2015 ; Sebihi, 2008). Il est important que les facteurs

nod conservent leur intégrité structurale, puisque chaque partie de leur structure assure une fonction cruciale dans le développement nodulaire. L'identification du signal nod est une étape essentielle dans l'établissement du dialogue moléculaire à l'origine de la symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (Gharzouli, 2013; Perry, 2004).

5.2. Nodulation chez la plante

Les flavonoïdes sont des substances qui se trouvent chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries du groupe *Rhizobium* (Saoudi, 2008). Ce sont des composés principalement excrétés au niveau des pointes racinaires, beaucoup d'entre elles stimulent la nodulation mais certaines espèces inhibent en fait le processus (Hopkins, 2003; Vernie, 2008).

L'interaction symbiotique déclenché sous la responsabilité des flavonoïdes qui libéré par les racines des légumineuses et réorganisé par les facteurs nod des *Rhizobia*. Chaque plante produit une mixture de flavonoïdes qui peut varier selon son état physiologique. Ce sont des dérivés du 2-phenyl-1,4-benzopyrone avec une structure définie par deux anneaux aromatiques et un cycle propane ou pyranne selon les modifications de cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes, parmi lesquels les isoflavonoïdes sont spécifiques des légumineuses. Certains de ces flavonoïdes ont la capacité d'induire les gènes nod des bactéries requis pour la nodulation. Ces capacités varient selon les flavonoïdes et selon les *Rhizobia*. Certains flavonoïdes peuvent même inhiber l'expression des gènes nod (Vernie, 2008).

5.3. Les étapes de la nodulation

Les bactéries de genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobiumes* sont fréquemment impliquent dans des associations endosymbiotiques avec les légumineuses, l'établissement de cette association symbiotique passe par une série d'étapes complexes maintenant bien connues les étapes sont :

5.3.1. Pré échange de signal d'infection

Dans un premier temps la bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécule chimique, c'est la reconnaissance qui se fait en deux phases.

- **Phase 1**, d'attraction: quand la légumineuse est en manque d'azote, les racines excrètent des flavonoïdes qui attirent le *Rhizobium*.
- **Phase 2**, de reconnaissance: en réponse de ces flavonoïdes les *Rhizobactéries* activent leur gènes nod, qui codent pour les facteurs de nodulation nod (Lydie, 2015).

Les cellules des racines possèdent des récepteurs spécifiques des facteurs nod au niveau de leur membrane plasmique. La réception des facteurs nod induit une chaîne de signalisation cellulaire cette chaîne aboutit à la synthèse des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes. Ces facteurs, sécrétés par le *Rhizobium* stimulent la division des cellules de la partie corticale des racines conduisant à la formation d'un méristème primaire (cellules en division active) (Hopkins, 2003; Lydie, 2015; Perry, 2004).

5.3.2. Attachement et infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de *Bradyrhizobium* et de *Rhizobium*. La rhicadhésine est une protéine liant le Calcium. Elle permet l'adhésion en complexant le Calcium présent à la surface des racines.

La phase d'adhésion entraîne une rétraction des racines en réponse à une sécrétion de molécules et la bactérie pénètre dans les cellules par un mécanisme d'invagination. La croissance et le déplacement de la bactérie dans la racine entraînent la formation d'une excroissance ou filament infectieux. L'infection s'étend progressivement aux cellules situées à proximité du site d'infection (Lydie, 2015; Perry, 2004).

5.3.3. Maturation des bactéroïdes et Développement du nodule

La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule, la majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane péri bactéroïdienne enveloppe les bactéroïdes. Les bactéroïdes de forme irrégulière sont plus volumineux que les bactéries libres et ne sont pas capables de se diviser. Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes situées dans le voisinage ou de celles qui se développeront ultérieurement sur le même site (Hopkins, 2003; Lydie, 2015; Perry, 2004).

Dans les nodules, les bactéroïdes sont entourés de leghémoglobine. La synthèse de leghémoglobine dépend de l'information génétique apportée par la plante et la bactérie, aucun des deux partenaires n'étant capable de la produire indépendamment de l'autre.

Le stade final du processus infectieux est la différenciation de la nodosité avec organisation en quatre zones, une zone méristématique (division), une zone de croissance et d'infection avec les cellules contenant les bactéroïdes, une zone de fixation d'azote et une zone de sénescence (Hopkins, 2003 ; Lydie ,2015 ; Perry, 2004).

Deux types de nodosités (allongés ou ronds) sont définis en fonction de la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et du niveau de persistance d'une zone méristématique;

La forme allongée (nodosité indéterminée) étant liée au maintien d'un méristème apical et la ronde (nodosité déterminée) en une absence de méristème apical (Domergue, 2006). Le nombre de nodosités et leurs masses sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

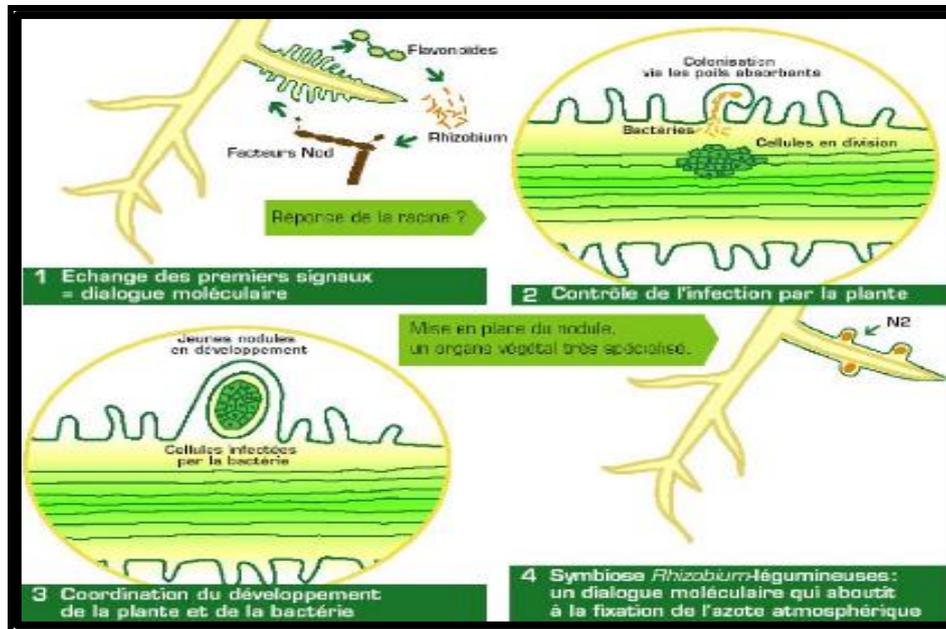


Figure 06. Etape de la nodulation (Dhane Fitouri, 2011).

6. Importance de l'identification biochimique des bactéries

La diversité des *Rhizobia* peut être évaluée par un ensemble de méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

Les méthodes phénotypiques (biochimiques) reposent sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et physiologiques des bactéries via des techniques standardisées (Vandamme et al., 1996; Graham et al., 1991).

Les critères morphologiques fournissent des renseignements concernant les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, présence de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture (taille, forme, couleur, état de la surface).

L'étude des caractères physiologiques impliqués dans l'identification bactérienne repose sur la détermination de la vitesse de croissance, la capacité d'utiliser différentes sources de carbone, la croissance à différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques

et de métaux lourds. Ces analyses physiologiques sont souvent influencées par les facteurs environnementaux.

Les principales méthodes biochimiques sont basées sur la détermination de l'activité de différents enzymes caractéristiques de certains groupes de bactéries (Vandamme et *al.*, 1996) comme : l'uréase, l'oxydase et la catalase . Et pour l'utilisation des galeries d'identification biochimique permettant l'étude de l'ensemble des réactions chimiques se produisant au niveau de la cellule bactérienne (métabolisme glucidique, lipidique, protidique...) parmi laquelle galerie API20NE, galerie API20E qui se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique [5]. Ils sont choisis par les biologistes pour leur rapidité et facilité d'utilisation et par leur haute performance [6].

Les caractéristiques biochimiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la description et l'identification des souches d'une même espèce (Vandamme et *al.*, 1996). Il est important de noter que les taxonomistes bactériens prescrivent que ces critères phénotypiques soient pris en compte lorsqu'un auteur veut donner un nom à une nouvelle espèce.

Chapitre 2:

Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude

La wilaya de Guelma se situe au Nord-Est de l'Algérie et constitue, du point de vue géographique, un point de rencontre, voire un carrefour entre les pôles industriels du Nord (Annaba et Skikda), les centres d'échanges au Sud (Oum El Bouaghi et Tébessa), et la proximité du territoire Tunisien à l'Est. Elle couvre une superficie de 3.910.51 km², et est limitée par (Figure 07) (Beldjazia, 2009):

- La wilaya d'Annaba, au Nord,
- La wilaya de Skikda, au Nord-Ouest,
- La wilaya de Constantine, à l'Ouest,
- La wilaya d'Oum El-Bouaghi, au Sud,
- La wilaya de Souk Ahras, à l'Est,
- La wilaya d'El Taref, au Nord-Est.

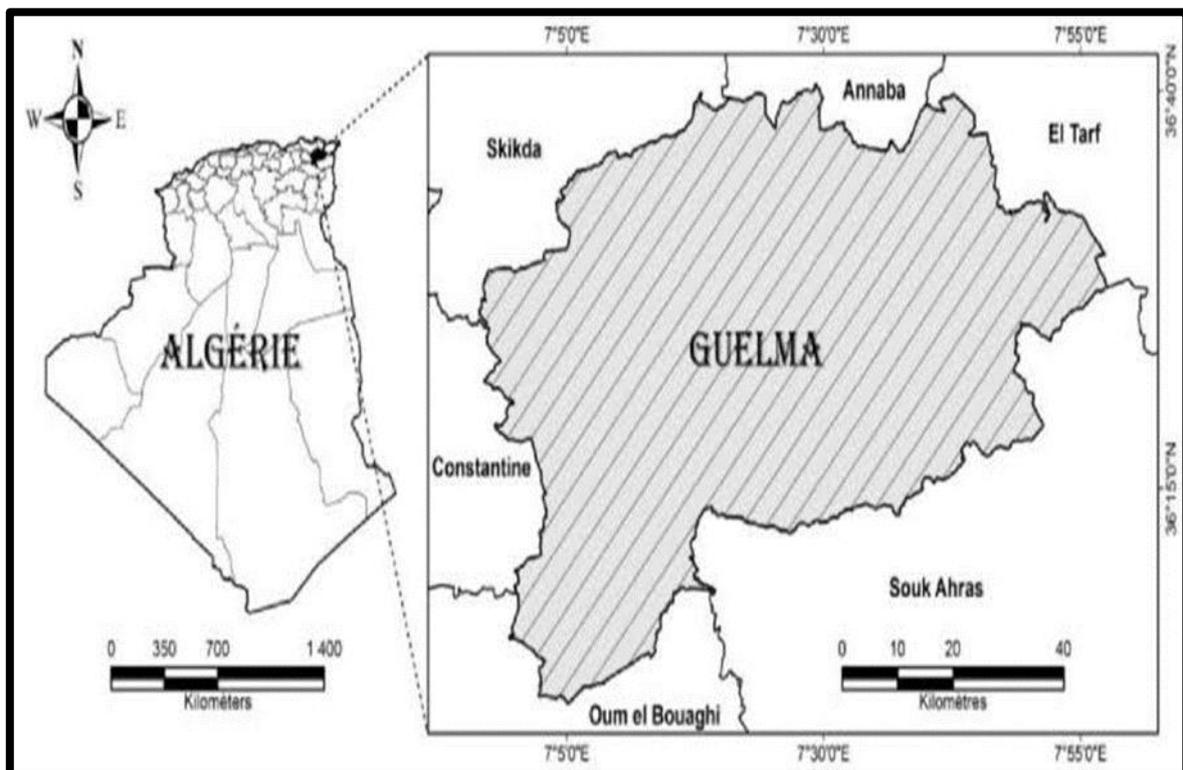


Figure07. Localisation géographique de la wilaya de Guelma (Bouguerra et *al.*, 2019)

2. Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de deux espèces: *Lotus edulis* et *Bituminaria* situées dans la région de Guelma (l'Est de l'Algérie). La récolte des nodules s'effectue selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985). Il s'agit de creuser environ 15cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinie.



Figure 08. (a) *Lotus edulis* (b) *Bituminaria*



Figure 09. (a) *Lotus edulis* après rinçage.
(b) *Bituminaria* après rinçage.



Figure 10. (a) Nodule de *Lotus edulis* prêt à être utilisée ou conservé .
 (b) Nodule de *Bituminaria* prêt à être utilisée ou conservé .

3. Conservation des nodules

Les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat, pour une longue période de stockage la dessiccation des nodules est recommandée. La dessiccation est réalisée dans des flacons contenant un déshydratant tel que le CaCl_2 anhydre et une couche de coton sur laquelle reposent les nodules (Figure 11). Chaque flacon doit être étiqueté par les informations suivantes

- Nom de la plante hôte.
- Date de conservation.
- Date et lieu de collecte (Bakkouche et Bendar, 2017).



Figure 11. Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

4. Isolement des souches bactériennes à partir des nodules

4.1. Stérilisation des nodules

Les nodules réhydratés dans de l'eau distillée pendant une nuit, sont désinfectés par immersion dans l'éthanol (95%) pendant 10 secondes, en suite transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0.1% (HgCl_2). En fin les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant une heure après le dernier rinçage (Somasegaran et Hoben, 1994).

4.2. Isolement des bactéries

Dans une boîte de Pétri stérile, on dépose quelques gouttes d'eau distillée stérile séparément, dans chacune d'elles un nodule sera écrasé avec une pince stérilisée par émerision dans l'éthanol et flambé au bec bunsen. Une öse du broyat nodulaire est prélevée puisensemencée sur les milieux de culture Glucose Peptone Agar additionné de Pourpre de BromoCrésol (GPA+BCP) et Yeast Mannitol Agar contenant le rouge Congo (YMA+RC) (Annexe 1), l'ensemencement est réalisé par stries selon la technique des quatre cadrans de manière avoir des colonies bien séparées (Figure.12), les boîtes de pétriensemencées sont incubées à une température de 30° C pendant 24 à 72 heures.

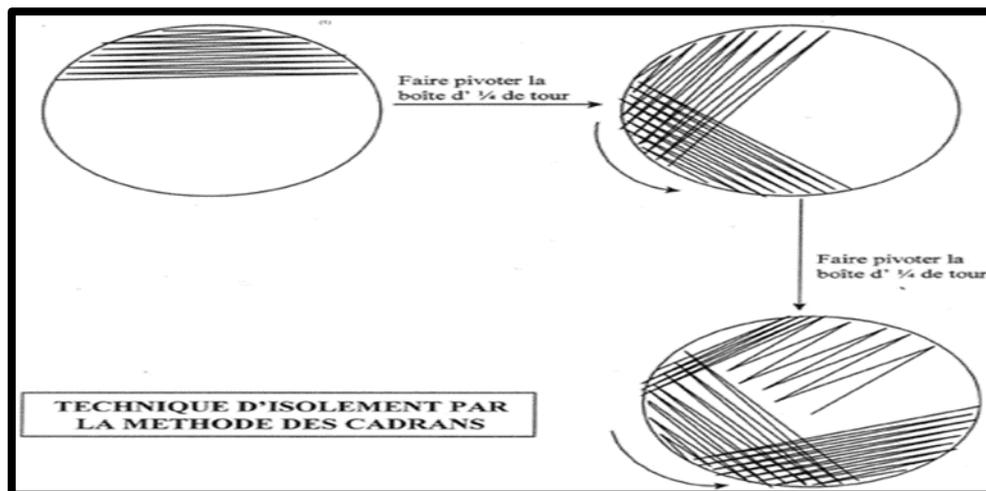


Figure . 12 Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

5. Caractères cultureux

Pour faire l'identification, plusieurs milieux de culture sont utilisés:

5.1. Les milieux solides

- YMA (Yeast Mannitol Agar),
- YMA+RC (Yeast Mannitol Agar +Rouge Congo),
- YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar+ Bleu de Bromothymol),
- GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ Bromocrésol Pourpre) (Annexe 1),
- Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

5.2. Le milieu liquide

Les caractères cultureux sur milieu liquide sont réalisés dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 1) et incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures.

6. Examen microscopique par la coloration de Gram

La coloration de Gram permet de vérifier la pureté de la culture et de classer les bactéries en deux grands groupes: bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Tortora, 2003).

On prépare des lames pour la coloration. La préparation est étalée en couche mince, le protocole expérimental consiste à:

- Recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- Verser le lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- Laver à l'eau distillée
- Recolorer avec la fuschine et laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau distillée.
- Observer à immersion

7. Conservation des souches

La conservation se fait sur le milieu YMA additionné de 3 g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est répartie dans des tubes à essai formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle. Des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose, et après incubation à 30°C pendant trois

jours les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 06 à 12 mois (Vincent, 1970).

8. Caractérisation des isolats

8.1. Caractères physiologiques

8.1.1. Tolérance au Chlorure de Sodium

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est l'YMA avec différentes concentrations de Na Cl: 0.1%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%. Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à une température de 30° C pendant 24 à 48 heures.

8.1.2. Température de croissance

L'ensemble des souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 44°C. Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C la lecture peut se prolonger jusqu'à 10 jours pour les autres températures testées.

8.1.3. Croissance à différentes valeurs du pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH: 4, 5, 6, 6.8, 7, 8, 9, 10. Puis incubées à 30°C pendant 24 heures sous faible agitation. Les résultats de la croissance aux différentes valeurs du pH sont évalués par la mesure de la densité optique à 620 nm.

8.2. Examen de la mobilité

L'examen se fait par une anse de platine contient une suspension bactérienne réalisés sur le milieu YMB de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incuber pendant 24 heures. La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune. Les bactéries mobiles se déplacent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble dans le milieu, alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Gerhardt et *al.*, 1994).

8.3. Caractères enzymatiques

8.3.1. Hydrolyse de l'urée

L'hydrolyse de l'urée est une réaction enzymatique qui ne peut s'effectuer qu'en présence d'uréase, enzyme «coupant» la molécule d'urée. Cette réaction est très complexe. L'uréase est produite par les bactéries uréolytiques. Ces dernières sont présentes dans le sol (Williams et *al.*, 1984; Yameogo et *al.*, 1993).

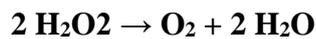
Les isolats sont cultivés sur 5 ml de milieu urée indole, et après 18 à 24 h d'incubation à 30 °C, la réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose (rose fuchsia).

8.3.2. L'oxydase

L'oxydase ou le cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. À l'aide d'une anse platine, une colonie est déposée sur un disque OXY. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Camille, 2006).

8.3.3. La catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase: enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Sur une lame porte objet propre déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie obtenue sur gélose. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase: test catalase+ (Camille, 2006).

8.4. Caractérisation biochimique par l'utilisation des galeries API

Galerie API (analytical profile index) est une galerie miniaturisée et standardisée de tests biochimiques, exploitable avec des bases de données d'identification complètes se présentant sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment.

Dans notre travail nous avons effectué l'identification biochimique de certaines souches par l'API 20 E et pour d'autres par l'API 20 NE.

8.4.1. Préparation de la suspension bactérienne 0.5 McFarland

Elle se prépare en ajustant la densité optique d'une suspension bactérienne à une valeur comprise entre 0.08 et 0.13 à une longueur d'onde de 620 nm.

Le standard 0.5d McFarland correspond à une suspension homogène (5ml YMB + colonie des souches pures), incubé à 30°C pendant 24 heures. Après d'incubation, ajuster la turbidité de la suspension bactérienne par l'utilisation de spectrophotomètre.

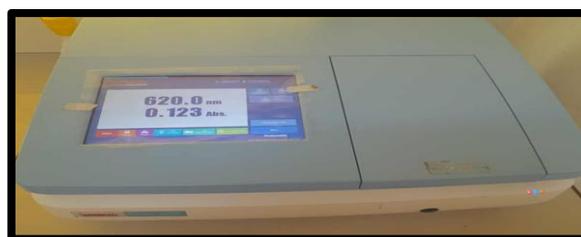


Figure 13. spectrophotomètre

8.4.2. Galerie API 20 E

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée (Figure.14). Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Dioma, 2008). La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification. (Annexe 3).

8.4.3. Galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification. (Annexe 3).



Figure .14 Galeries API 20 E et 20NE après ensemencement

9. Analyse statistique

Pour déterminer le statut taxonomique des isolats, nous avons tenté d'effectuer une analyse numérique à l'aide du logiciel DATA tab basée sur les résultats de la galerie biochimique.

Chapitre 3:

Résultats et Discussion

1 .Caractérisation morphologique

La caractérisation phénotypique est toujours considérée comme une étape importante pour identifier et isoler les bactéries nouvellement isolées. Chez les *Rhizobia* c'est la base d'une description formelle. De plus, elle a été largement utilisée dans les bactéries endophytes associatifs pour séparer l'espèce (Baldani et Baldani, 2005).

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines des plantes légumineuses prélevés de la wilaya de Guelma (*Lotus edulis* et *Bituminaria*) nous avons tenu compte de 10 isolat: B1, B2, B3, B4, L1, L2, L3, L4, L5, L6.

Code	Nom	Plante hôte	Origine géographique	Source
B1	Isolat	<i>Bituminaria</i>	Guelma	Notre étude
B2	Isolat	<i>Bituminaria</i>	Guelma	Notre étude
B3	Isolat	<i>Bituminaria</i>	Guelma	Notre étude
B4	Isolat	<i>Bituminaria</i>	Guelma	Notre étude
L1	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude
L2	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude
L3	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude
L4	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude
L5	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude
L6	Isolat	<i>Lotus edilus</i>	Guelma	Notre étude

1.1. Caractères cultureux

1.1.1. Croissance sur milieu YMA

Les colonies apparaissent sur le milieu YMA au bout de 24 à 48 heures. Elles ont une couleur blanche ou crème, forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide.

Le genre *Rhizobium* est caractérisé par des colonies qui sont généralement visibles en 48 heures elles ont une croissance rapide. Les colonies sont blanches ou beiges, circulaires, convexes, semi-translucides ou opaques (figure. 15) (Howieson et *al.*, 2016).

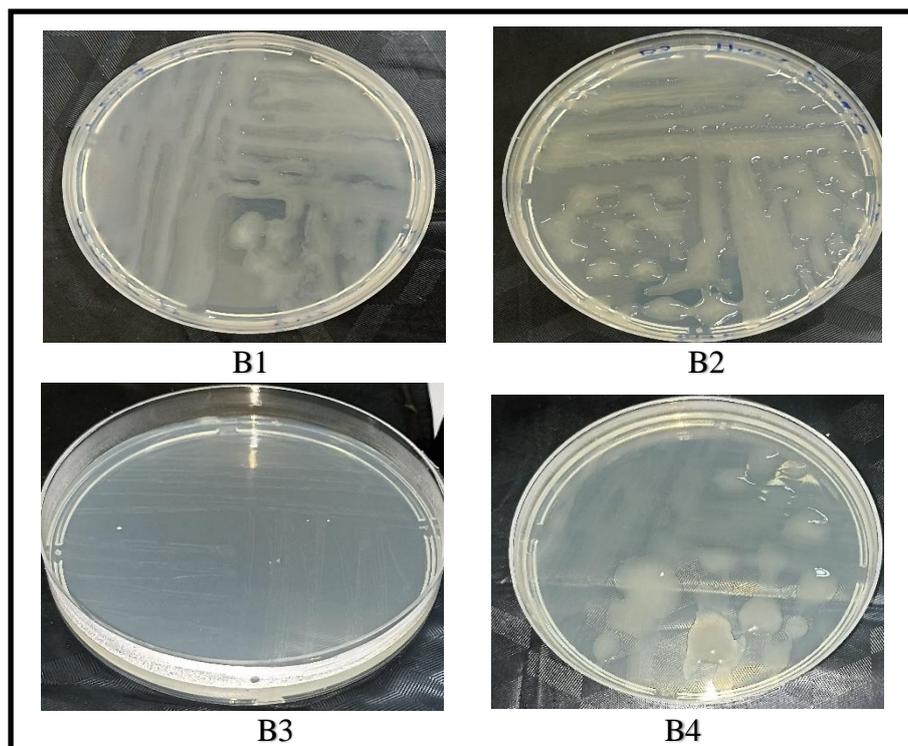


Figure 15. Croissance des isolats de *Bituminaria* sur milieu YMA

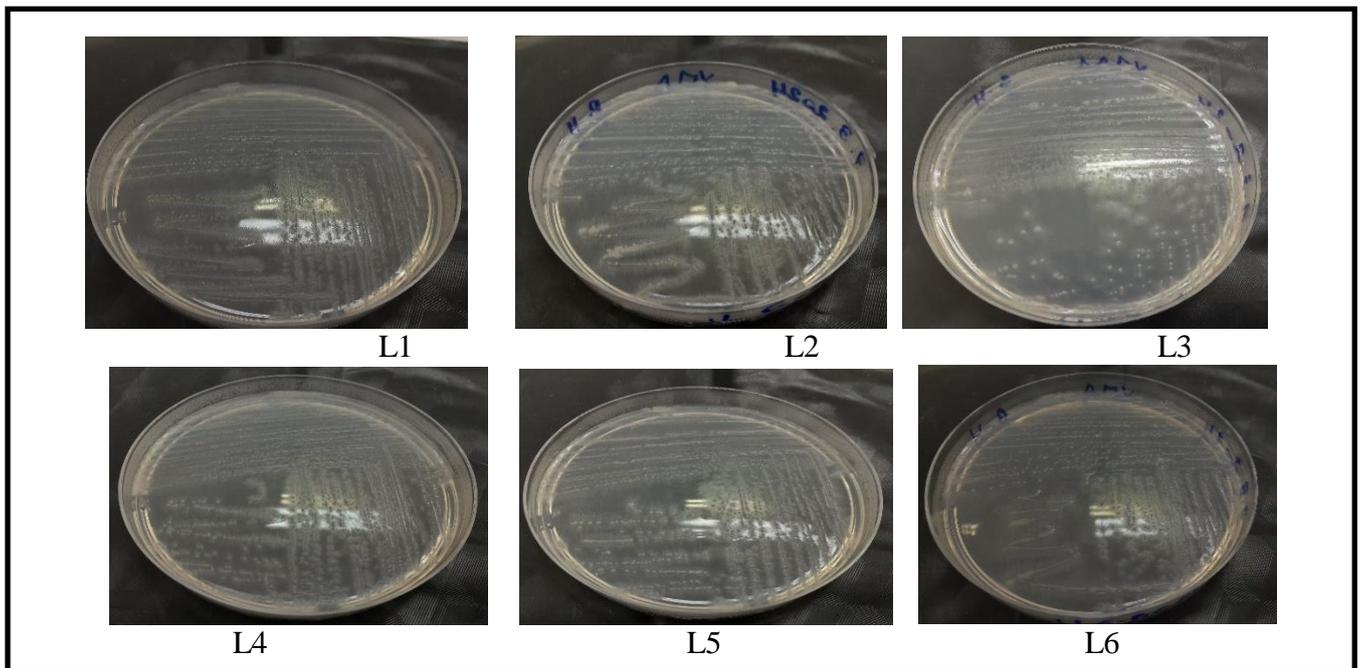


Figure 16. Croissance des isolats de *Lotus* sur milieu YMA

1.1.2. Croissance sur YMA+ RC

Sur le milieu YMA-Rouge Congo; la plupart des isolats absorbent le rouge Congo mais on trouve certaines souches absorbent peu (B1, B2, B3). Howieson et Dilworth (2016) ont mentionné que certaines bactéries nodulaires telles que *Sinorhizobium* absorbent le Rouge Congo (Figure .16).

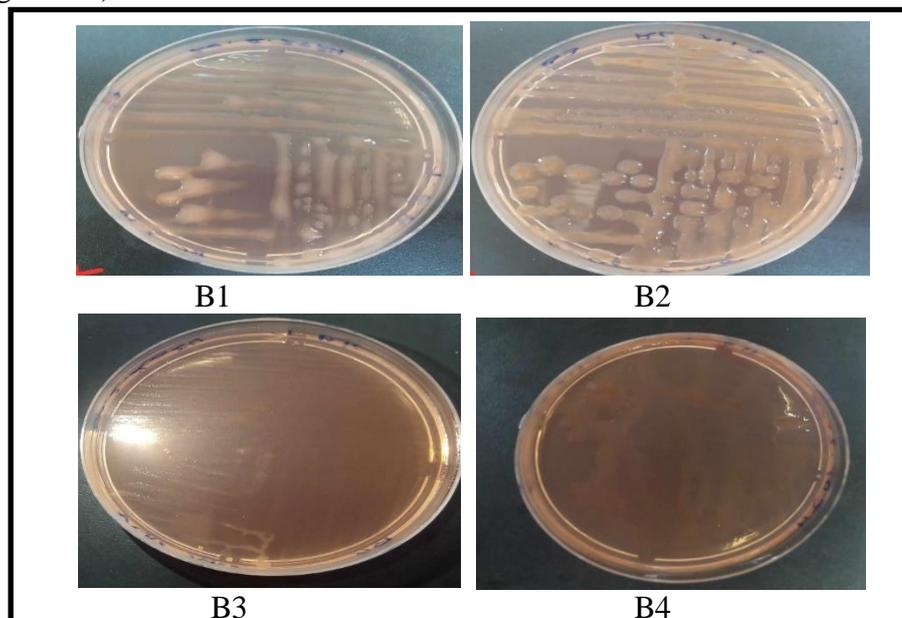


Figure 17. Croissance des isolats de *Bituminaria* sur milieu YMA-RC

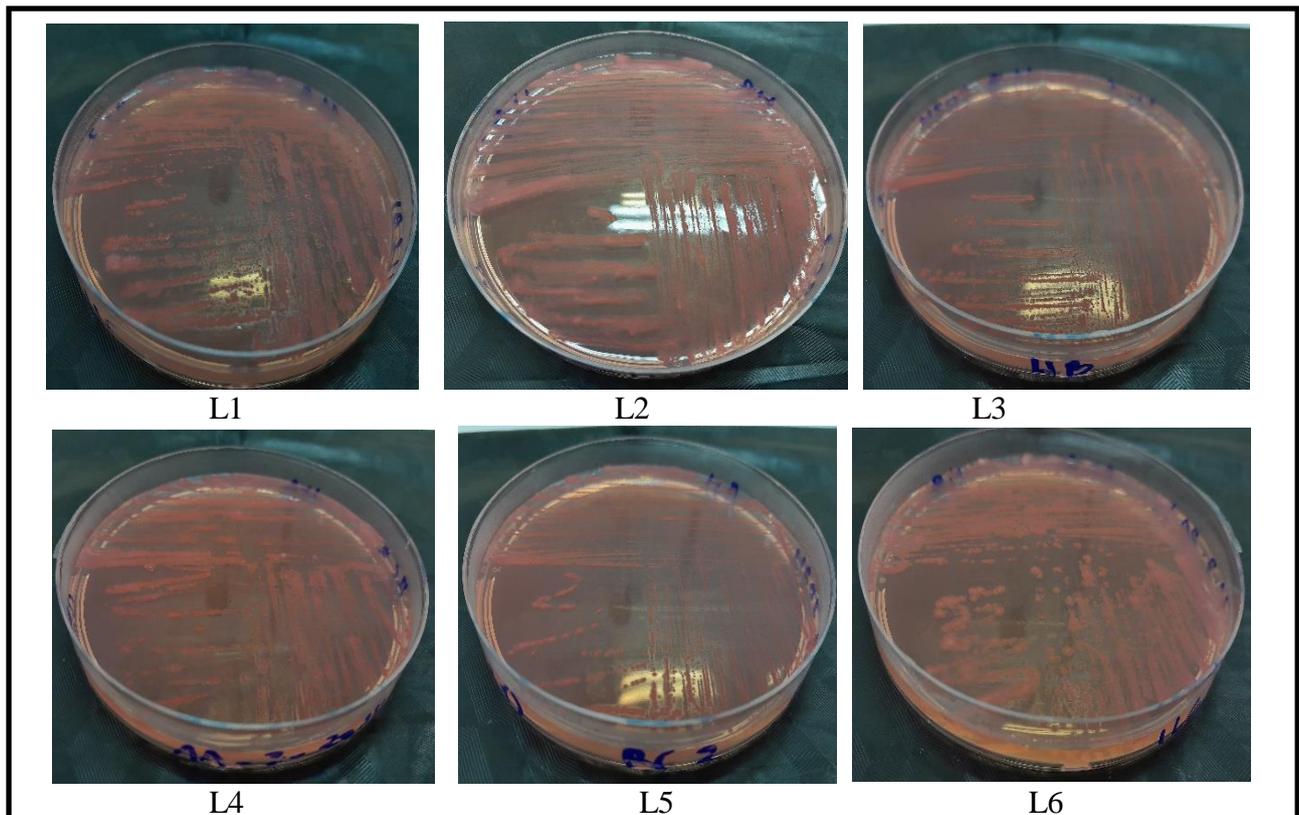


Figure 18. Croissance des isolats de *Lotus* sur milieu YMA-RC.

1.1.3. Croissance sur milieu YMA+BTB

Après 48 heures d'incubation, les observations montrent une apparition de colonies avec virage du milieu vers la couleur jaune, c'est une caractéristique des bactéries à croissance rapide (figure. 17).

Les bactéries nodulants les légumineuses, en particulier *les rhizobia*, présentent deux types de croissance : bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*...) dont les colonies apparaissent après 24 à 48 heures de culture, et bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*) pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 7 jours de culture (Jordan, 1984 ; Beck et *al.*, 1993 ; Pagano, 2008).

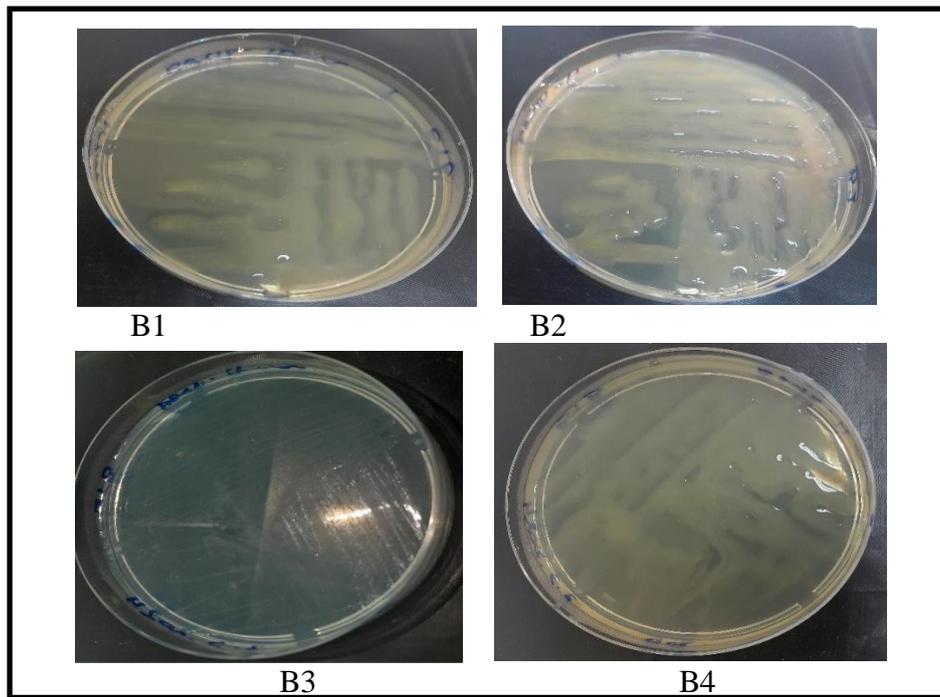


Figure 19. Croissance des isolats de *Bituminaria* sur milieu YMA+BTB.

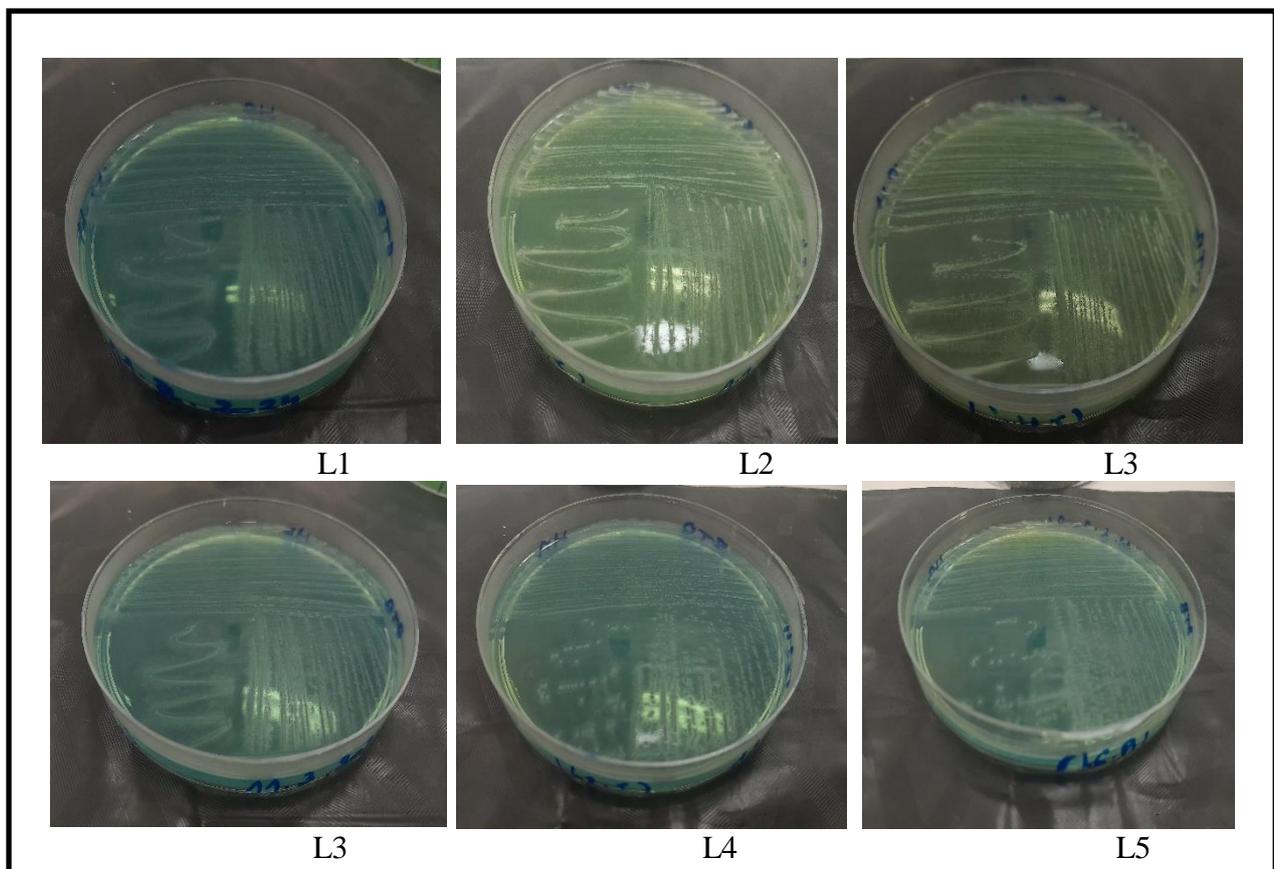


Figure 20. Croissance des isolats de *Lotus* sur milieu YMA+BTB.

1.1.4. Croissance sur milieu GPA +BCP

Sur le milieu GPA–BCP, les souches: B1, B2, B4 provoquent une modification du pH avec un changement de couleur du milieu du violet vers le jaune comme les résultats du Beck et al (1993).

Mais les souches B3, L1, L2, L3, L4, L5, L6 ne modifie pas le pH du milieu et ne provoquent pas une réaction acide du milieu comme la croissance des souches isolées par Ben Ahmed (2010) et Torche (2006) (figure. 18).

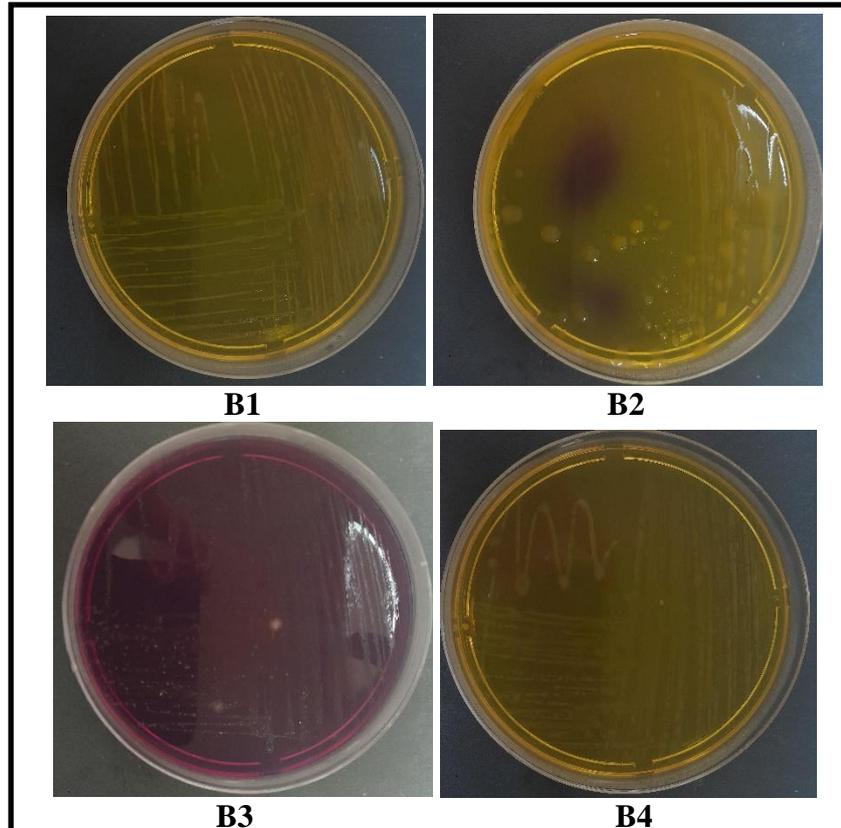


Figure 21. Croissance des isolats de *Bituminaria* sur milieu GPA+BCP

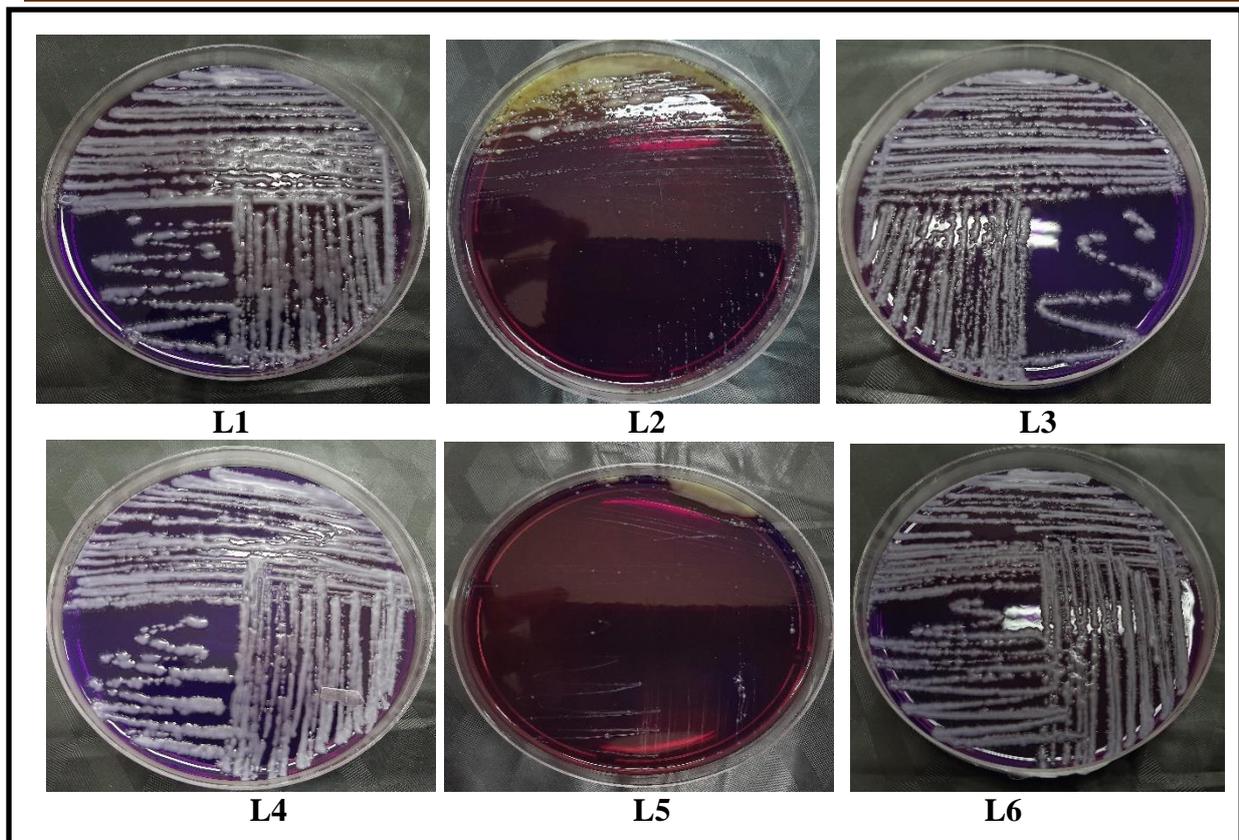


Figure 22. Croissance des isolats de *Lotus* sur milieu GPA+BCP.

1.1.5. Croissance sur milieu YMB

Après inoculation et 24 heures d'incubation à 30 °C, tous les isolats présentent l'apparition de trouble, (figure. 19).



Figure 23. Croissance des souches isolées sur milieu YMB

1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

L'examen microscopique des isolats après la coloration de Gram montre que les bactéries sont des bâtonnets (courts bacilles) de couleur rose, Gram négatif, cet aspect correspond au genre de *Rhizobium*. Ces caractéristiques sont en accord avec celles décrites par Gauri et *al.*, 2011 et Roychowdhury et *al.*, 2015.

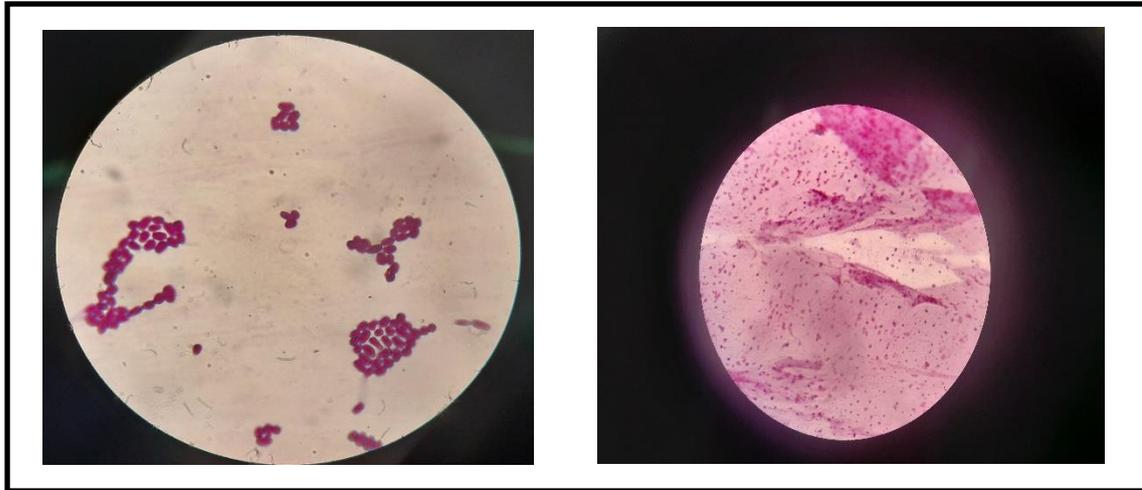


Figure 24. Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100).

2. Caractérisation des isolats

2.1. Caractères physiologiques

2.1.1. Tolérance au Chlorure de Sodium

Notre travail d'ensemencement sur le milieu YMA avec diverses concentrations du chlorure de sodium 0.1%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10% montre que toutes les souches ne présentent pas une croissance à une concentration du 10%. On observe que les souches B1, B2, B4, L1, L2, L3, L4, L5, L6 se développent dans l'intervalle de concentration entre 0.1% - 5%, la souche B2 présente une croissance satisfaisante à cet intervalle. B3 est incapable de se développer à 3%, 5%, 10%.

D'après les résultats obtenus par Zahran (2001), les souches tolérantes et sensibles ont des évolutions respectives rapide et plus lente. Batzli et *al.* (1992), déclarent que la tolérance au NaCl donne l'évidence de la diversité entre les isolats. Bhattacharya et *al.* (2013) ont rapporté que les *Rhizobium sp.* Isolées de *Pisum sativum* sont capables de se développer en présence de 1% en NaCl, mais incapables de se développer à des concentrations supérieures.

Tableau 2. La croissance à différentes concentration du Na Cl

Na Cl Souche	0.1%	1%	2%	3%	5%	10%
B1	++	+++	++	+	++	-
B2	+++	++	++	++	++	-
B3	+(48h)	+	+	-	-	-
B4	+++	+++	+(48h)	+	+(48h)	-
L1	+(48h)	+	+	+	+	-
L2	+(48h)	+	+	+	+	-
L3	+++	+	+(48h)	+	+	-
L4	+	+	+	+	+	-
L5	+	+	+	+	+(48h)	-
L6	+(48h)	+	+	+	+	-

+positive (croissance), - negative(pas de croissance)

2.1.2. Température de croissance

Après avoir incubé les souches sur YMA à diverses températures. On a observé une croissance allant de 20 à 44°C, avec un maximum de croissance à 30°C. Les souches B1, B2, B3, L1, L2, L3, L5 sont les seules à pouvoir pousser après 7 jours d'incubation à une température de 4°C. La souche L4, B4 est la seule souche qui ne présente pas une bonne croissance à toutes les températures. B1, B2 sont les seules souches à avoir une croissance satisfaisante à toutes les températures.

Les souches *rhizobiales* isolées par Wei et al. (2003) peuvent également croître à 4°C et celles isolées par Diouf et al. (2000) résistent des températures très élevée de 40°C à 44°C. Razaneen et al. (2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement reliée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.

Tableau 3. Croissance à différentes valeurs de température

T° C \ Souche	4°C	20°C	25°C	30°C	37°C	44°C
B1	+ (7j)	+++	+++	+++	+++	+ (48h)
B2	+ (7j)	+++	+++	+++	+++	+ (48h)
B3	+ (7j)	+ (48h)	+++	+++	+++	-
B4	-	+++	+	+++	++	-
L1	+ (7j)	+ (48h)	++	+++	++	+ (48h)
L2	+ (7j)	+ (48h)	+++	+++	++	-
L3	+ (7j)	++	++	+++	++	-
L4	-	+ (48h)	+++	+++	++	-
L5	+ (7j)	+ (48h)	++	+++	++	+ (48h)
L6	-	++	+++	+++	++	-

+positive (croissance), - negative(pas de croissance)

2.1.3. Croissance à différentes valeurs du pH

Selon les résultats de l'étude de l'effet du pH sur la croissance, il est prouvé que les souches peuvent se développer dans une plage de pH allant de 5 à 10 avec un développement optimal à des pH de 6.8 et 9.

Les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* peuvent supporter des pH allant de 4,5 à 9 (Ruiz-Diez et al., 2009 ; Mahdhi et al., 2008). Les résultats de Hatimi et al. (2001) ont montré que toutes les souches testées sont capables de croître des pH supérieurs à 4,5. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Torche (2006) qui ont montré que la majorité de ses souches ont la capacité de pousser dans l'intervalle de pH 4 à 10.

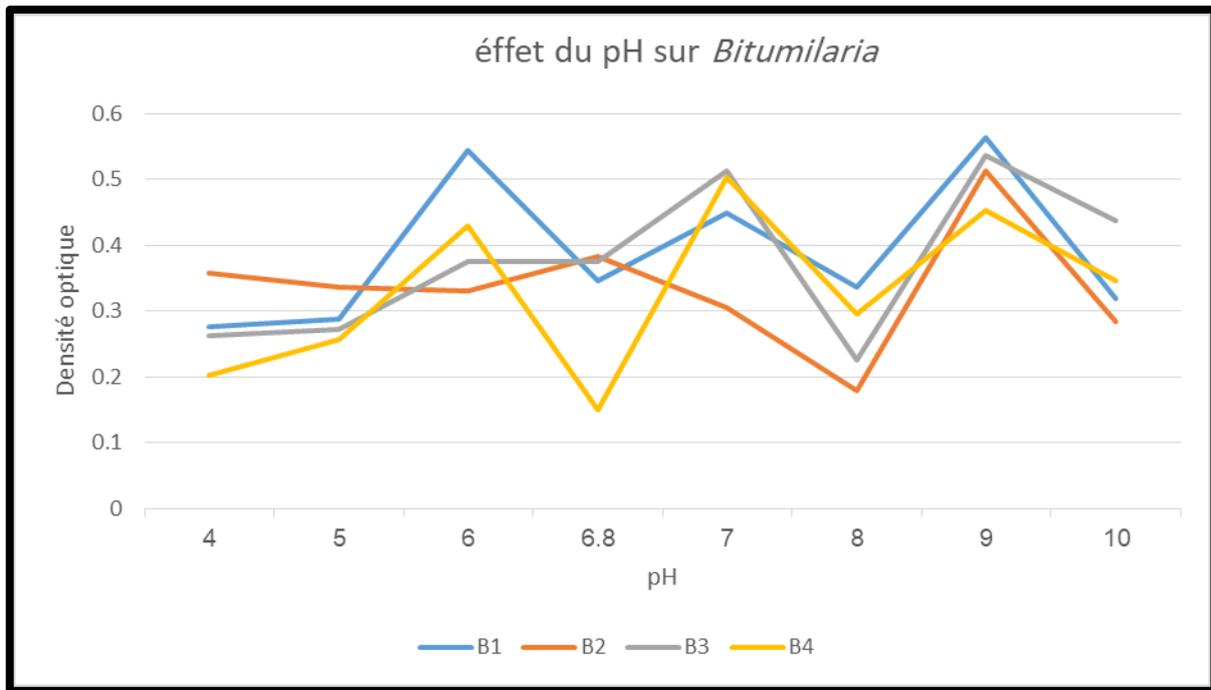


Figure 25. Croissance des isolats de *Bituminaria* à différentes valeurs du pH

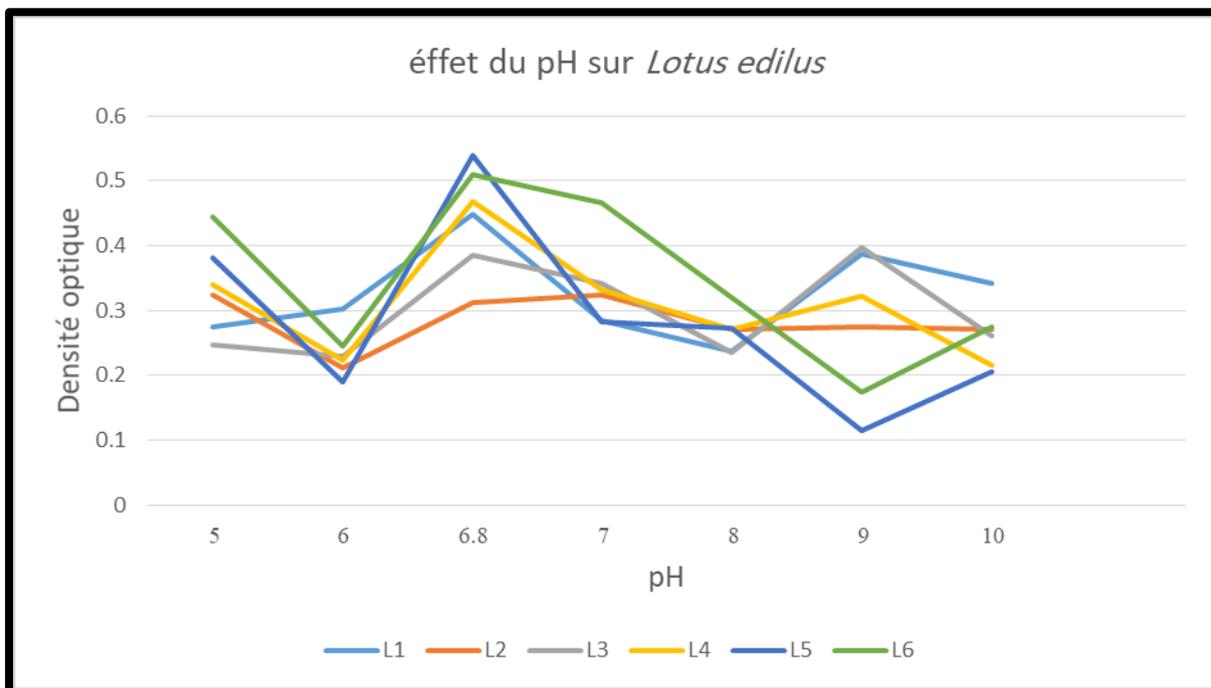


Figure 26. Croissance des isolats de *Lotus* à différentes valeurs du pH

2.2. Examen de la mobilité

La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi -molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de piqure centrale. Les germes immobiles ne

poussent qu'au niveau de la pique centrale alors que les germes mobiles diffusent dans la gélose.

Nos résultats sur milieu Mannitol mobilité montrent que les souche B1, B2, B3, B4, L2, L3, L5 et L6 sont mobiles et acidifient le milieu (virage de couleur du rouge au jaune orangé). ces résultats sont compatibles à ceux indiqués par Chabbi (2010) et Abdhafid, (2011) sauf L1 et L4 ne montre ni le virage de couleur de milieu (reste rouge), ni la mobilité des cellules (Figure 23).

Tableau 4. Test de Mannitol-Mobilité.

Souche Test	durée	B1	B2	B3	B4	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Mobilité	24h	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	48h	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

+ positive, - négative

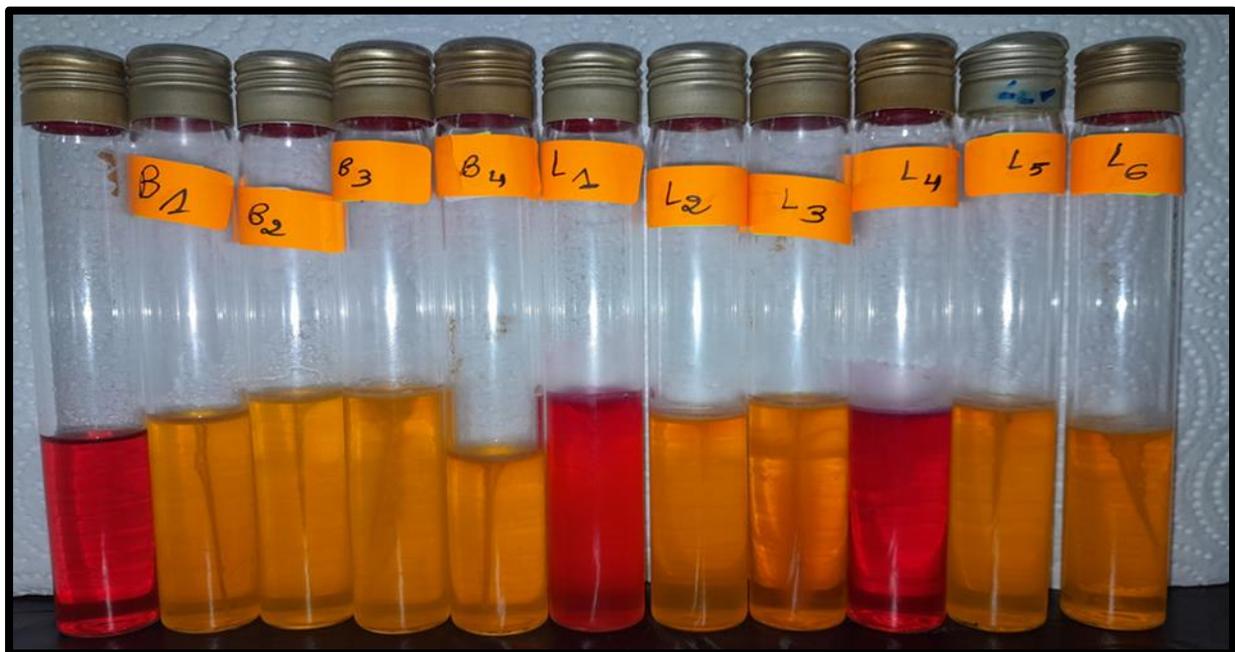


Figure 27. Test Mannitol-Mobilité après 24h

2.3. Caractères enzymatiques

2.3.1. Hydrolyse de l'urée

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des *Rhizobia* à hydrolyser l'urée grâce à l'uréase, en utilisant le rouge de Phénol comme indicateur de pH. Après l'incubation pendant 48 heures nous avons observé qu'il y a un virage de couleur vers le rose pour les isolats L2, L3,

L4, L5, L6 et B1 c'est-à-dire alcalinisation du milieu (uréase+). Donc nos souches ont l'enzyme d'uréase, par contre les souches L1, B2, B3, B4 sont uréase – (Figure.24).

Le milieu contient de l'urée, et si la bactérie produit de l'uréase ceci va provoquer une alcalinisation du milieu. L'alcalinisation va faire virer l'indicateur coloré vers le rose (Bibirou, 2016). Ce qui indique l'alcalinisation du milieu par conséquent la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction suivant:

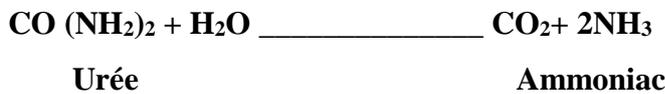


Tableau 5. Test Hydrolyse de l'urée

Souche Test	B1	B2	B3	B4	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Hydrolyse de l'urée	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ positive, - négative



Figure 28. Test Hydrolyse de l'urée après 24h

2.3.2. L'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Le principe de ce test est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet, l'indophénol (Delarras, 2014).

Les résultats obtenus du test d'oxydase montrent que toutes les souches sont oxydase négatif sauf les souches B1, B4, L4 qui présentent un résultat positif comme les résultats de camille (2006) qui montrent que ces bactéries possèdent une enzyme dans la chaîne respiratoire cytochromique bactérienne.

2.3.3. La catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage (Delarras, 2014).

Nos isolats montrent un résultat positif, alors il y a un dégagement d'oxygène gazeux issu de la dégradation de l'eau oxygéné. Les caractères ainsi obtenus sont ceux des *Rhizobia*; en effet (Jordan, 1984) rapporte que les *Rhizobia* sont des bactéries à catalase positive et Gram négatif.

Tableau 6. Les résultats des tests catalase et oxydase.

Souche / Test	B1	B2	B3	B4	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-

+ positive, - négative

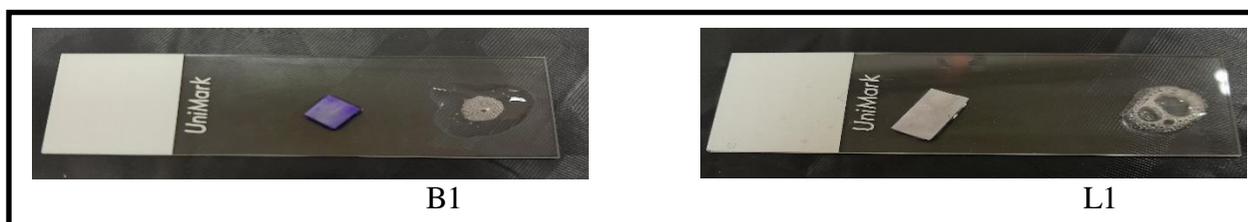


Figure 29. Tests catalase et oxydase.

3. Caractérisation biochimique par l'utilisation des galeries API

3.1. Galeries API 20 E

Les résultats de la lecture de la galerie API 20 E après 48 heures d'incubation à 30°C (Annexe 2) ont révélé les principaux traits biochimiques des souches B1, B2, B4, L6. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 7. Résultats de la galerie API 20E des souches.

Test \ Isolats	B1	B2	B4	L6
ONPG	+	-	+	-
ADH	+	+	+	+
LDC	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
CIT	-	+	+	+
H2S	-	-	-	+
URE	-	-	+	-
TDA	-	+	-	+
IND	-	+	-	+
VP	-	+	-	-
GEL	+	+	-	+
GLU	+	-	+	-
MAN	-	-	+	-
INO	+	-	-	-
SOR	+	-	+	-
HRHA	+	-	+	-
SAC	+	+	-	-
MEL	+	-	+	-
AMY	+	+	+	-
ARA	+	+	+	+

+ positive, - négative



Figure 30. Résultats des galeries API 20 E.

3.2. Galerie API 20 NE

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant (Annexe 2).

Tableau 8. Résultats des galeries API 20NE des souches.

Test \ Isolats	L1	L3	L4	L5
NO3	-	-	+	+
TRP	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+
URE	+	-	-	+
ESC	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+
PNG	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
MNE	+	-	+	+
MAN	+	+	+	+
NAG	+	-	+	+
MAL	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+
CAP	-	-	-	-
ADI	-	+	+	-
MLT	+	+	+	-
CIT	+	+	+	+
PAC	+	-	-	-

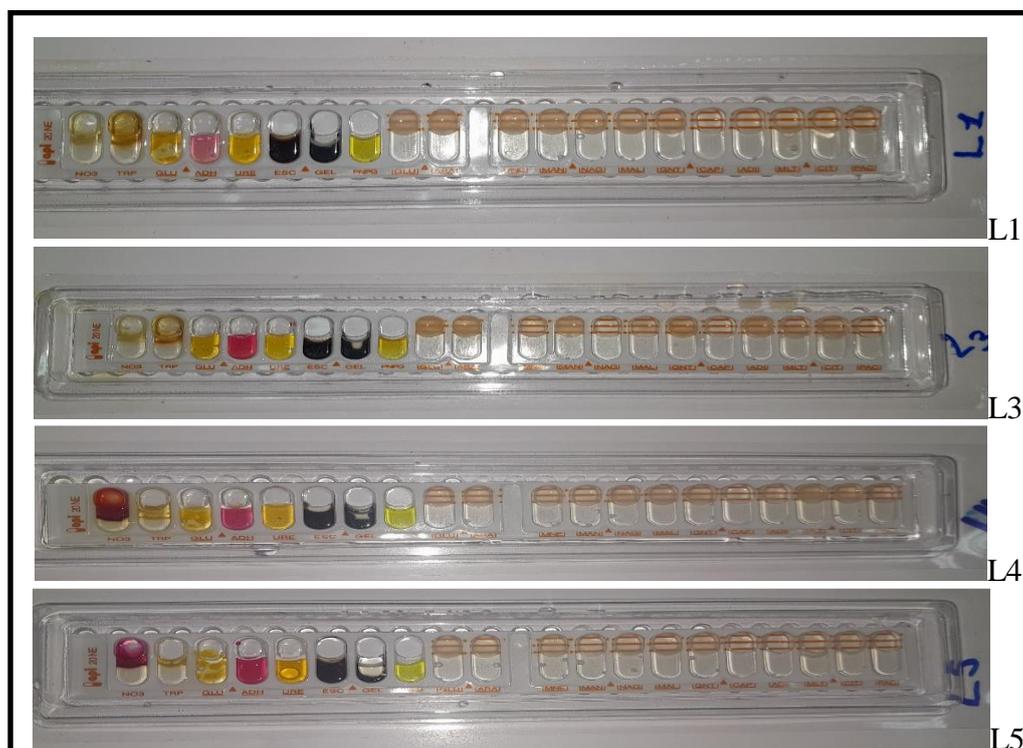


Figure 31. Résultats des galeries API 20 NE.

4. Analyse statistique de la caractérisation biochimique

Afin d'évaluer le statut taxonomique de nos isolats, nous avons tenté d'effectuer une analyse numérique en utilisant le DATAtab. Cette analyse permet de déterminer le rapprochement taxonomique de nos isolats avec les souches de référence.

Tableau 9: Souches utilisées dans l'étude statistique.

Souches	Codes	Sources
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SmM1	Niste et al., 2015
<i>Rhizobium trifolii</i>	RtS1	Niste et al., 2015
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Br10	Joko et Barry, 2010
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	R1	Enas et al., 2020
<i>Bradyrhizobium jaboranicum</i>	R20	Enas et al., 2020
Isolat de <i>Bituminaria</i>	B1	Notre étude
Isolat de <i>Bituminaria</i>	B2	Notre étude
Isolat de <i>Bituminaria</i>	B4	Notre étude
Isolat de <i>Lotus</i>	L6	Notre étude
Isolat de <i>Lotus</i>	L1	Notre étude
Isolat de <i>Lotus</i>	L2	Notre étude
Isolat de <i>Lotus</i>	L3	Notre étude
Isolat de <i>Lotus</i>	L4	Notre étude

Tableau 10: Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence
galeries API 20E

	RtS1	SmM5	R1	R20	Br10
B1	14 (70%)	12 (60%)	7 (35%)	11 (55%)	10 (50%)
B2	6 (30%)	6 (30%)	13 (65%)	11 (55%)	12 (60%)
B4	14 (70%)	10 (50%)	11 (55%)	9 (45%)	14 (70%)
L6	5 (25%)	7 (35%)	12 (60%)	11 (55%)	9 (45%)

A partir de l'étude biochimique par les galeries miniaturisées API 20E les résultats obtenus démontrent que la souche B1 présente un degré de similitude élevé avec la souche *Rhizobium trifolii*, on peut supposer que ces souches peuvent appartenir au même groupe taxonomique. Pour les souches B2 et L6 on observé un degré de similitude élevé avec la souche *Rhizobium leguminosarum*. B4 est très similaire aux souches *Rhizobium trifolii* et *Azospirillum lipoferum*.

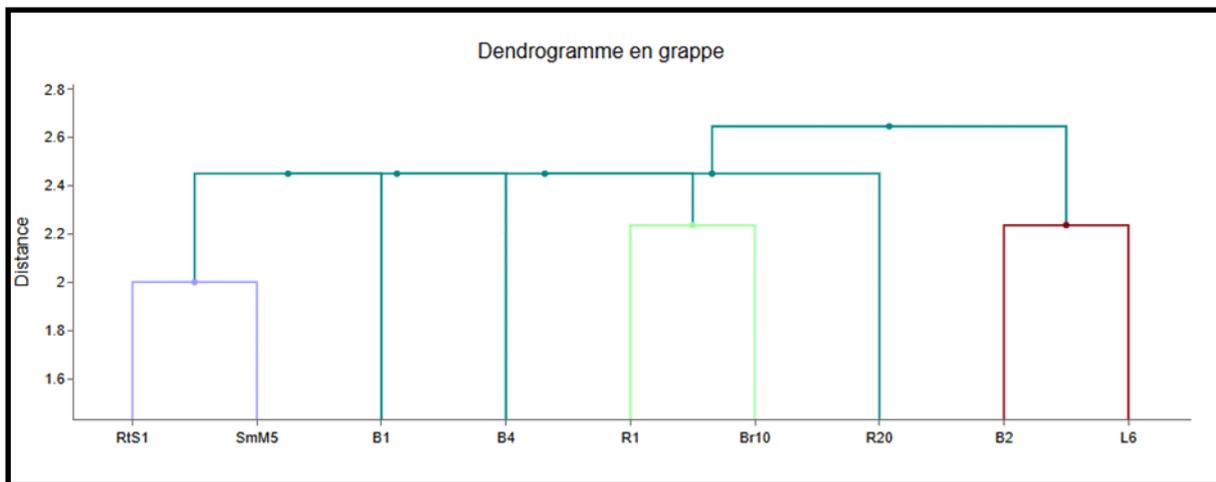


Figure 32. Dendrogramme API E

Le Dendrogramme est très peu significatif, dans la mesure où les groupes de bactéries ne sont pas distincts. Il démontre la présence de deux groupes de souche. On observe aussi que nos isolats se rapprochent principalement aux souches *Rhizobium leguminosarum* et *Rhizobium trifolii*.

Tableau 11: Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20 NE

	RtR5	SmM1	R1	R20
L1	16 (80%)	13 (65%)	14 (70%)	17 (85%)
L3	11 (55%)	12 (60%)	11(55%)	12 (60%)
L4	15 (75%)	15 (75%)	14 (70%)	16 (80%)

Les résultats de l'étude biochimique menée à l'aide de galeries API 20 NE miniaturisées montrent que les souches L1 et L4 sont très similaires à la souche *Bradyrhizobium jaboricum*. La souche L3 présente une proximité significative avec les souches *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium jaboricum*.

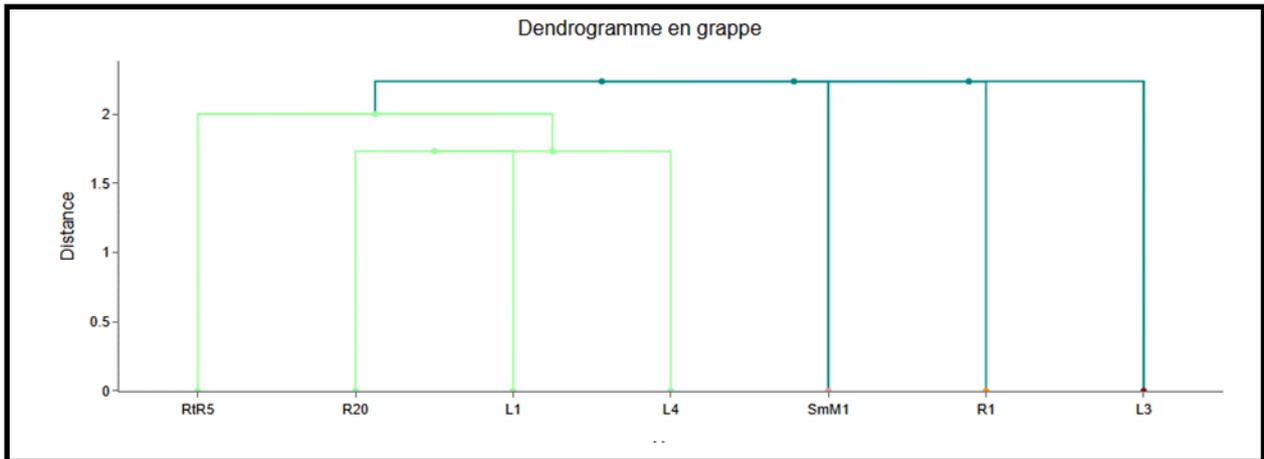


Figure 33. Dendrogramme API NE

Le Dendrogramme démontre la présence de deux groupes de souche. On observe que nos isolats se rapprochent biochimiquement principalement de la souche *Bradyrhizobium Jabonicum*.

Conclusion

Conclusion

Notre étude est une contribution à la recherche des caractéristiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des genres *Bituminaria* et *Lotus*, deux légumineuses fourragères spontanées appartenant au cortège floristiques de la région de Guelma dans le Nord-Est algérien.

Après collecte des plantes légumineuses, le travail de recherche est commencé par un isolement des bactéries à partir des nodules racinaires. Les isolats ont été caractérisés par des tests morphologiques physiologiques et enzymatiques. Pour l'étude biochimique, les bactéries isolées sont mises à l'identification par l'utilisation des galeries API 20 E et API 20 NE suivie d'une analyse numérique des résultats.

À la lumière des résultats obtenus, les souches isolées ont le même aspect morphologique que les souches appartenant au genre *Rhizobium* avec des cellules bâtonnets à Gram-négative et des colonies blanchâtres et crémeuses.

Les isolats ont bien poussés sur le milieu YMA au bout de 48 heures d'incubation. La majorité des isolats absorbent le rouge Congo et ne modifient pas le pH sur le milieu GPA-BCP. Les bactéries isolées ont une croissance rapide présentant un virage du couleur du milieu YMA-BTB vers le jaune au bout de 48 heures.

Les résultats des tests physiologiques démontrent que nos isolats sont capables de croître à une température allant de 4 °C jusqu'à 44 °C, avec une bonne croissance à 30 °C. La croissance des souches est observée entre pH 4 et pH 10 avec un optimum de croissance entre pH 6.8 et 9. Concernant le NaCl, toutes les souches se développent à l'intervalle de concentration entre 0,1 % et 5 % et ne poussent pas à concentration 10 %.

Les souches sont mobiles et acidifient le milieu de mannitol, sauf L1 et L4. Elles produisent de l'uréase, à l'exception de L1, B2, B3, B4. Le test catalase est positif pour toutes les souches et le test d'oxydase montre que toutes les souches sont oxydase négatives, sauf les souches B1, B4, L4.

La caractérisation biochimique démontre que les isolats de *Bituminaria* se rapprochent biochimiquement aux souches de *Rhizobium trifolii* et *Azospirillum*. Alors que les isolats de *Lotus* sont proches de la souche *Bradyrhizobium Jabonicum*.

Cette étude qui a une approche systématique a contribué à l'étude de la diversité des bactéries symbiotiques en utilisant des traits phénotypiques. Pour confirmer ces résultats, il sera intéressant de la compléter par une étude moléculaire et phylogéniques.

Il sera également important d'élargir l'études des bactéries symbiotiques associées à d'autres légumineuses et déterminer leur roles dans l'amélioration des cultures.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdlhafid L. (2011). Effet de certains indicateurs de gènes nod (composé phénoliques) sur la croissance de *rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique. [Diplôme de Doctorat –es- sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen] ,page 43

Aouadj R.,Saidi O.(2015).Isomement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum Pallidum Desf.*, poussant dans la région de Djebel Boutaleb (Setif) [Mémoire Master 2:Ecologie microbienne. Constantine: Université des Frères Mentouri, Constantine]. 63p

Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66(1): 44–77. DOI: 10.12705/661.3

B

Bakkouche, N., Bendar, A. (2017). Isolement et caractérisation des *rhizobiums* nodulant l'espèce végétale *Genistacineria* dans la région de Tébessa [Mémoire de Master Académique. Université de Larbi Tébessi -Tébessa- Algérie].

Baldani J.I., et Baldani V.L.D. (2005): History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: *spezialemphasis* on the Brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 77: 549- 579.

Batzli J.(1992) Isolation and Characterization of Rhizobia Effective with *Maackia amurensis* . *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117(4)

Barbault R. (2009). *Ecologie Générale: structure et fonctionnement de la biosphère*, 5ème édition, (Ed.) Dunod, pp32

Beck D.P, Materon L.A et Afandi F. (1993). *Practical Rhizobium – légume technology manual*. ICARDA(Ed), Syria, . p389.

Beldjazia. (2009) Etude écologique et cartographique de la végétation du massif de la Mahouna [Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba].

Ben Ahmed A. (2010). Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulations de la légumineuse *Hedysarum coronarum*. [Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine].

Bhagyashree D. (2013). Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. from root of legume plant (*pisum sativum*) and its antibacterial activity againsts different bacterial strains. International Journal of Agricultural and Food Science 138-140.

Bibirou. (2016) : tests utilisés en bactériologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.

Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L. (2006). -Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des *rhizobia*. Les Actes du Bureau des Ressource Génétique.

Bouguerra, H., Soltani, A., Yahi, A., Djabri, L., Hamed, Y. (2019). Interférences des polluants endogènes et exogènes dans les eaux des puits et de l'Oued seybouse: cas de plaine de Guelma. Journal International Sciences et Technique de l'Eau et l'Environnement (JISTEE) P 97.

Broughton, W.J. (1984). Nitrogen fixation: Legumes. The Journal of Chartto and Windus 2Td.

C

Camille D. (2006). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 2ème édition, TEC et DOC, p.15.

Cermola, M., Fedorova, E., Tate, R., Riccio, A., Favre, R., Patriarca, E.J. (2000). Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium* et li-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. Mol Plant Microbe Interact, 13: 733 - 741.

Chabbi R. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *TrigonellL* Poussant dans différents écosystème de L'Est algérien. [Mémoire de Magister: BiotechnologieVégétale. Université Mentouri Constantine].

Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., and Vandamme. P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov. isolated forme root nodules of *Mimosa* species and *sputum* of acystic fibrosis patient. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:1729–1735

Cleland E.E., Harpole W.S. (2010): Nitrogen enrichment and plant communities. Annals of New York Academy of Sciences, 1195: 46 – 61.

Curl, E. A. & Truelove. B. (2012). The rhizosphère, Springer Science & Business Media.4, 289.

D

Dhane Fitouri S. (2011). Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du sulla du nord (*hedysarum coronarium l.*) et sélection de souches *Rhizobiales* efficaces. [Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique, Tunisie].

Diouf A., de Lajudie P., Neyra M., Kersters K., Gillis M., Martinez-Romero E., Gueye M.(2000). Polyphasic characterization of *rhizobia* that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 159–170.

Dioma S-A. (2008). Epidémiologie des *entérobactéries* productrices de Beta-lactamases a spectre Elargi du chu du point G. [Mémoire de grade de Docteur en Pharmacie université de Bamako. La Faculté de Médecine de Pharmacie et d’Odontostomatologie]. P: 17-20. .

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] P 33,78 –91

Dreyfus, B., Garcia, J. L., and Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium* caulinodans gen. nov. sp. nov. a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*, *International Journal of Systematic and Bacteriology*. 38:89–98.

Duhoux, E et Nicole, M. (2004). *Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes.* Edition DUNOD. Paris. France. P1 - 20.

E

Emile Duhoux., Michel Nicole. (2004). -*Biologie végétale: association et interactions chez les plantes.* Atlas.p4-6

F

FAO. (2006). Deuxième rapport national sur l’état des ressources phylogénétiques, INRAA. FAO (Organisation des Nations Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture).

Ferchichi, A. (2006). Diversité des *Fabaceae* Fourragères et de leurs Symbiotes. Workshop International -Alger- Academic Publ. 39: 51-75 .

G

Gauri, Singh A.K., Bhatt R.P., Pant S., Bedi M.K., Naglot A. (2011). Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* (6) : 1705-1723.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994). *Method for general and molecular bacteriology.* USA : American Society for Microbiology.

Gharzouli., Razika. (2006). Influence d’agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium sp.* [Mémoire de Mgister en Génétique Moléculaire.Université Mentouri. Constantine. Algérie]. P128.

- Gharzouli R.** (2013). Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sultae*. [Thèse de doctorat en Génétique Moléculaire. Université de Constantine 1, Algérie].
- Giraud, E., and Fleischman, D.** (2004) Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and légumes. *Photosynthèse .Research*: P 82:115–130.
- Govaert, G. & Nadif, M.** (2010). Latent Block Model for Contingency Table, *Communications in Statistics - Theory and Methods*, 39, 416-425.
- Grama borhane S.** (2008) Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des *Rhizobia* de quelques légumineuses. [Thèse de Magistère En génétique et amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, .Algérie]
- Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslycky EB, Strijdom BW, Young JPW.** (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International journal of systematic bacteriology*. 41: 582–587.
- Guiraud J.P.** (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.
- Guignard, J.L., Dupont.** (2005). Botanique systématique moléculaires 12ème ED Masson Paris. 290p.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de los Santos, P., Gross, E., dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. W., and James, E. K.** (2011). Légume Nodulating Betaproteo bacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:1276–1288.

H

- Hadj Omar k.** (2008). Caractérisation chimique de la production fourragère de quelques variétés d'espèces de légumineuses d'intérêt fourrager dans la Mitidja. [Mémoire de magister. Blida] 114p.
- Hatimi A, Bani-Aameur F, Oihabi A.** (2001) Caractérisation de souches de *Rhizobiums* autochtones des dunes: effet sur la croissance et la nutrition azotée D'*acacia cyanophylla Lindl.* *Acta Bot Gall* 148:191–199. doi
- Howieson J.G., et Dilworth M.J.** (2016): Working with Rhizobia; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale: 312.
- Hopkins, William G.** (2003). Physiologie végétale. De Boeck Supérieur. P 99-112.

J

- Jordan D.C.** (1984) : *Rhizobiaceae*. In N. R. Krieg and J.G. Holt (ed), *Bergey's Manual of B Systematic Bacteriology*. Vol 1 the Williams & Wilkins, Co., Baltimore: 234-245.

K

Kouakou Romain F . (2011). Diversité génétique des *Rhizobia* associés à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.). [Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA) en Agronomie Productions Végétales. Ecole supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Boigny de Yamoussoukro, centre de la Côte d'Ivoire.]

L

Labauer DS., Treseder KK. (2008). Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371–379.

Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S(2014). -Legume growth-promoting *rhizobia*: An overview on the *Mesorhizobium genus*. *Microbiological Research*

Lepinay Clémentine. (2013). -Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. [Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.Dijon.] p257.

Lewis, G.A.; Schrire, B.B.; Mackinder, B.C.; Lock, M.D.(2005). *Legumes of the World*; Kew: Royal Botanic Gardens, London, UK

Lydie S. (2015) .Les végétaux des symbioses pour mieux vivre Edition Quae. Parais P: 18 -20-21.

M

Madigan M., Martink J. (2007): Brock Biologie des microorganismes. Person Ed France (Ed.). pp 599-601, 676–681.

Mahdhi M, Nzoue A, de Lajudie P, Mars M.(2008) .Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils, *Progress in Natural Science* 18,43-49

Maougal R T. (2014). Contribution des phytases bactériennes à l'adaptation de *Phaseolus vulgaris* à la faible disponibilité de phosphore en sols méditerranéens actinorhiziennes. *Faculté des sciences de la nature et de la vie Constantine*. 264p.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17:458–66.

Mekky R.H, Thabeta M.M, Rodríguez-Pérezb C, Elnaggara D.M.Y, Mahrousd E.A, Segura-Carreterob A and Abdel-Sattard E.(2020). Comparative metabolite profiling and antioxidant potentials of seeds and sprouts of three Egyptian cultivars of *Vicia faba* L. *Food Research International*, 136 109537.

Mwajita M.R., Murage H., Tani A., Kahangi E.M. (2013). Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters, *Kenya Agricultural Research Institute*, 8.1-9.

Q

Ott .T, J. van Drongen, C. Gunther, L. Krusell, G. Desbrosses, H. Vigeolas, V. Bock, T. Czechowski, P. Geigenberger, M.K. (2005). Udvardi Leghemoglobins are crucial for symbiotic nitrogen fixation but not general plant growth and development this issue *Curr. Biol.*, 15.

P

Pagano, M.C. (2008). *Rhizobia* associé à l'arbre néotropical *Centrolobium tomentosum* utilisé dans la restauration riveraine. *Végétal, sol et environnement*, 54(11), 498-508.

Pelmont J. (1995). Bactérie et environnement adaptation physiologique. Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules, *International Review of Cytology* :p 234: 201 - 62.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S.(2004). Microbiologie. Edition Dunod, Paris. Perry J.J, Stalex J.T et Lory S, 2004. Microbiologie cours et questions de révision. Edition Person Education France. P 617-634.

Prescott, L. M ; Harley, J. P ; Klein, D. A; Claire-Michèle; Bacq-Calberg ; Dusart, J. (2007) Microbiologie, chapitre .22.les bactéries. Les protéobactérie, .Edition. De Boeck université.p.492.

Pujic P, Normand P. (2009) : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plante sactinorhiziennes. *Biofature*. 298: 26–29.

Q

Quezél P,Santa S.(1962).Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionals.Editer par Centre National de la Recherche Scientifique, Parais, France, P :498 501

R

Rao, D.L.N.,S..R.Mohanty,C.Acharya et N.Atolya .(2018).*Rhizobial* Taxonomy –Current Statut .IUNFC Newsletter,4P

Rasanen L. (2002). Biotic and abiotic factors infl uencing the development of N₂-fixin symbioses between *rhizobia* and the woody legumes *Acacia*. [Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd]. 220p.

Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., and Masson-Boivin, C. (2016). Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends Microbiol.* 24:63–75.

Riah N. (2001). Etude de la symbiose *Rhizobium* -pois fourrager (*Pisum arvens L*).Essais de production d'inoculum et inoculation au champ. [Thèse de magister: Biochimie et Microbiologie Appliquée .Université Mentouri Constantine, Algérie].

Roychowdhury, D., Paul, M. and Banerjee, S.K. (2015). Isolation identification and characterization of bacteria (*Rhizobium*) forme chick pea (*Cicer arietinum*) and production of biofertilizer. Eur JBiotech Biosci.3(12), 26-29.

Ruiz-Díez B, Fajardo S, Puertas-Mejia MA, de Felipe MR, Fernández Pascual M. (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. Archives of Microbiology 191: 35-46.

S

Saadallah K, Drevon J.J, Abdely C. (2001). Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21 : 627–634.

Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. [Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie].

Sebihi F. (2008). Les Bactéries Nodulants les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. [Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie].

Somasegaran P et Hoben H.J. (1994). Handbook for *rhizobia*: methods in legumes /*Rhizobium* Technology. New York : Springer verlag. (ISBN) International Standard Book Number: 0-387-94134-7. ; 240-258,450.

T

Talukdar D.(2013). Leguminosae. Brenner’s Encyclopedia of Genetics, 2nd Edition, 4: 212-216.

Tang, M., and Capela, D. (2019). *Rhizobium* diversity in the light of evolution. advances-in-botanical-research. P 94:251–288

Torche Asma., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumi advances-in-botanical-research neuses du genre *Hedysarum*. [Mémoire de Magister: Biochimie et Microbiologie Appliquée. Constantine: Université Mentouri]. 16-166p

Tortora, GJ., Funk, B.R. et Case, C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Eddition du Renouveau Pédagogique Inc. 945 p

V

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Research. 60:407–438.

Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., De Vos, P., Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. Nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), 507–512.

Vernié T. (2008). Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. [Thèse de doctorat en Biosciences Végétales. Université Toulouse III, Paul Sabatier].

Vincent J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England: 164

W

Wei, G.H., Tan, Z.Y., Zhu, M.E., Wang, E.T., Han, S.Z., and Chen, W.X. (2003) Characterization of *rhizobia* isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1575-1583.

Werner D. (1992) : symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

Williames P.E.V, Innes G .M et Brewer A. (1984). Ammonia treatment of straw via the hydrolysis of urea. I Effects of dry matter and urea concentrations on the rate of dry matter degradation of urea. *The journal of animal feed science and technology*, p : 103-113.

Y

Yomeogo-Bougouma V, Cordesse R, Arnaud A et Inesta M. (1993). Identification de l'origine des uréases impliquées dans le traitement de la paille de blé dur à l'urée et caractérisation de la flore microbienne présente. *Ann ; Zootech.* 42:39-47.

Z

Zahran, H.H. (2001) *Rhizobia* from wild legumes Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91(2), 143-153.

Zahran, H.H. (2006). Wild legume rhizobia: biodiversity and potential as biofertilizers. *Handbook of microbial biofertilizers*, Rai MK, (ed) 203-22

Zennouhi O., El Mderssa M., Diouri M., J. Ibijbijen1 Et L. Nassiri1 (2020). « Evaluation de la biomasse ingestible et de la valeur fourragère de deux arbustes: *Bituminaria bituminosa* (L. 1981) et *Bituminaria todghaniensis* (sp. 2017) ». *Fourrages*, 243, 71-76

Sites Web :

- 1 McNear Jr., D.H. (2013). The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and67500617/> (Consulté le : 12/04/2024).
- 2 Mifsud, S. (2022). *Bituminaria Bituminosa* (Pitch Trefoil). Disponible sur : https://maltawildplants.com/FABC/Bituminaria_bituminosa.php (Consulté le : 14/05/2024).
- 3 Lotier comestible. Disponible sur : https://www.picturethisai.com/fr/wiki/Lotus_edulis.html (Consulté le : 14/05/2024).
- 4 Mifsud, S. (2022) *Lotus edulis* (Edible Birdsfoot Trefoil). Disponible sur : https://maltawildplants.com/FABC/Lotus_edulis.php (Consulté le : 14/05/2024).
- 5 Umc.edu.dz. Manuel des travaux pratiques de Bactériologie. Disponible sur : <https://telum.umc.edu.dz/> (Consulté le : 24/05/2024).
- 6 BioMérieux. Galeries d'identification API- Diagnostic clinique. Disponible sur : <https://www.biomerieux.fr/> (Consulté le : 24/05/2024).

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture et solutions utilisés

- **Composition du milieu YMB (Yeast Mannitol Agar) en g /l (Vincent, 1970)**

Mannitol	10 .00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillé	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

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

YMB	1000ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

- **Composition du milieu YMA+Rouge Congo en g/l**

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH, on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25G rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

- **Composition du milieu YMA+bleu de bromothymol en g /l**

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	10ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Après l'ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol, puis on ajoute l'agar.

- **Composition du milieu GPA (Glucose Peptone Agar) +pourpre debromocrésol g/l (Vincent, 1970)**

Glucose	10
Pentone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120C° pendant 20 minutes.

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

- **Composition du milieu Mannitol Nitrate Mobility Medium en g/l**

Mannitol	22 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes

- **Composition du Solution HgCl₂ acidifié 0,1%**

Hg Cl	0.1
H Cl	0.5ml
Eau distillée	100ml

Annexe 2

- **Les résultats de la mesure de la densité optique**

- ✓ **Effet de pH**

souches Tests	B1	B2	B3	B4	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Ph =10	0.319	0.283	0.432	0.347	0.342	0.239	0.260	0.215	0.206	0.275
Ph = 9	0.564	0.513	0.537	0.452	0.387	0.274	0.398	0.323	0.115	0.174
Ph = 8	0.336	0.179	0.225	0.295	0.237	0.271	0.253	0.271	0.272	0.320
Ph = 7	0.444	0.306	0.513	0.503	0.285	0.324	0.341	0.332	0.282	0.466
Ph = 6	0.544	0.331	0.376	0.179	0.302	0.212	0.229	0.224	0.190	0.245
Ph= 6.8	0.364	0.383	0.297	0.429	0.449	0.312	0.385	0.469	0.539	0.509
Ph = 5	0.285	0.337	0.273	0.256	0.274	0.324	0.248	0.339	0.382	0.445
Ph =4	0.276	0.357	0.262	0.202	0.106	0.207	0.205	0.213	0.248	0.252

Annexe 3

1. Galerie API 20 E

➤ Principe

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ Technique

○ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau dans les pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Déposer la galerie dans la boîte d'incubation parallèlement, réaliser le test d'oxydase sur une colonie isolée lactose moins.

○ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de suspension Medium (ou eau physiologique stérile sans additif).
- Prélever à l'aide d'une pipette une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.

- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

○ **Inoculum de la galerie**

- Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.

- Remplir uniquement les tubes et non les cupules des autres tests.

- Créer une anaérobiose dans les tests; ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine.

- Refermer la boîte et la placer à l'étuve à 35-37 °C pendant 18 à 24 heures.

○ **Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs:

-Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

-Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3

-Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

-Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).

-Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe identification).

○ **Identification**

- Avec tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau.

- Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de trois, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacune. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification.

- À l'aide du logiciel d'identification.

➤ **Tableau de lecture**

READING TABLE					
TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-β-D-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
QDC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
CIT	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate yellow reddish brown	
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate colorless pink pale green / yellow	
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless pink / red (5)	
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

2. Galerie API 20 NE

➤ **Principe**

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

➤ **Technique**

○ **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau dans les pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Déposer la galerie dans la boîte d'incubation parallèlement, réaliser le test d'oxydase sur une colonie isolée lactose moins.

○ **Préparation de l'inoculum**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) ;

- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

-Test NO₃ :

Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.

- Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.

-Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.

- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc. La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive. La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

- Test TRP :

-Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

➤ Tableau de lecture

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₂	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYptophane)	JAMES / immédiat incolore vert pâle / jaune rose	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine Dihydrolyase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrale de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUCOSE)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (MANnose)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADipique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacetique	0,8	assimilation (acide PhénylACetique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe 4

✓ Tableau de l'analyse numérique

- API 20 E

souches Tests	B1	B2	B4	L6	Br10	SmM5	R20	R1
OPNG	+	-	+	-	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	-	-	+	+
LDC	-	-	-	+	-	+	+	-
ODC	-	-	-	-	-	+	-	-
CIT	-	+	+	+	+	-	+	+
H2S	-	-	-	+	-	-	-	-
URE	-	-	+	-	+	-	+	+
TDA	-	+	-	+	-	+	+	+
IND	-	+	-	+	-	-	-	-
VP	-	+	-	-	+	-	+	+
GEL	+	+	-	+	-	-	+	-
GLU	+	-	+	-	+	+	+	-
MAN	-	-	+	-	-	+	-	-
INO	+	-	-	-	-	+	+	-
SOR	+	-	+	-	-	+	-	-
HRHA	+	-	+	-	-	+	+	-
SAC	+	+	-	-	-	+	+	-
MEN	+		+	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	-	+	-	-	-
ARA	+	-	+	+	+	+	-	-

- API 20 NE

Souches Tests	L1	L3	L4	SmM1	RtR5	R1	R20
NO3	-	-	+	-	-	-	+
TRP	-	-	-	+	+	-	-
GLU	+	+	+	+	+	-	+
ADH	+	+	+	-	+	+	+
URE	+	-	-	-	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+
GLE	+	+	+	-	-	-	+
PNG	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	-	+
ARA	+	+	+	+	+	-	-
MNE	+	-	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	-	-
NAG	+	-	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	-	-	+	+
CAP	-	-	-	-	-	-	-
ADI	-	+	+	-	-	-	-
MLT	+	+	+	-	-	+	+
CIT	+	+	+	-	+	+	+
PAC	+	-	-	-	+	-	+