

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 08 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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Microbiologie appliquée

Département : Ecologie et génie de l'environnement

Thème

Contribution à la détermination du rôle des BNL dans le sol

Présenté par :

- Boureneb Chaima
- Rekik Ilhem

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme Hadidi I	MCB	Université de Guelma
Examinatrice : Mme Bedioui S	MCB	Université de Guelma
Encadrant: Mme Torche E	MCA	Université de Guelma

Juin 2025

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions

Un grand merci aux membres du jury: Mme Hadidi .I et Mme Bedioui .S d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance et nos remerciements en premier lieu à notre encadreur Mme Torech A. pour avoir dirigé ce travail, nous la remercions pour sa patience, pour son aide, ses conseils précieux et sa disponibilité entière tout au long de la période de la réalisation de notre mémoire.

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

Nous désirons également remercier 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, et surtout Mme Hayatte et Mme Amina, pour leurs aides et leurs conseils.

Nous remercions chaleureusement le chef de département, tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de terre et l'univers qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire et surtout ceux du département de Biologie de nous avoir transmis leurs savoirs le long de notre cycle universitaire. Ainsi que nos amis de la promotion.

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

Dédicaces

(وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ)

الحمد لله حبا ورضا وامتنانا على البدء والختام

Grâce à **Dieu**, puis à force de détermination et de patience, j'ai atteint ma destination aujourd'hui. Louange à Dieu pour ce qui a été et ce qui sera. Je dédie avant tout cet accomplissement à mon ambition personnelle, qui a persévéré, lutté et n'a jamais désespéré, relevant le défi et la responsabilité.

Je dédie ensuite mon diplôme et mon immense succès à :

Mon cher père, qui a élevé mon nom des plus beaux titres et a toujours été une source de fierté et d'honneur. La première personne à attendre ce moment pour être fière de moi, et mon premier soutien après Dieu. À **Ma mère** bien-aimée, ma première maîtresse, le secret de la vie et le sens de la tendresse. À celle qui a éclairé mon chemin dans les nuits les plus sombres, et qui a prié sincèrement pour moi, car ses prières ont été le secret de ma réussite. Je demande à Dieu de vous accorder santé et bien-être.

À mon frère **Rabah** et à ma sœur **Ikhlas**, qui m'ont soutenu et encouragé en toutes circonstances. Bénédiction que Dieu m'a accordée

. À **mes chères grand-mères** et à **mon précieux grand-père**, bénédictions et joyaux de ma vie, qui m'ont comblé de leurs prières et de leur amour. Que Dieu prolonge vos vies.

À **Dhiaa edinee**, ma compagne et partenaire de réussite, qui m'a toujours soutenue et m'a aidée et soutenue.

À **ma tante** et à **mon oncle**, qui m'ont accueillie avec amour et m'ont traitée comme si j'étais l'une de leurs propres filles.

À **ma tante** adorée, qui m'a soutenue et conseillée tout au long de mon parcours, et qui a été une conseillère et une compagne formidable.

À mes frères et sœurs, jeunes et moins jeunes, qui ont partagé avec moi des moments d'enfance et des souvenirs inoubliables, et qui ont toujours été un soutien et une source d'inspiration : **Rahma, Aziza, Boshra, Basma, Mohamed, Fatima, Suad, Nour, Rania,**

Wiam, Basma, Soundes, Salma, Roumisa, Malak, Adem. À mes petits anges :

Saleh, Fatima Al-Zahra, Moatasem Billah et Israa...

À mon amie de passage et de succès, ma partenaire dans ce parcours **Ilhem**.

À mes chers amis, mes compagnons de route, merci pour les plus beaux moments et souvenirs. Je remercie tout particulièrement mes collègues de mon cours de microbiologie appliquée, **Douaa, Sana, Ikram, Nour, Aya, Abir, Ikram**

À mes estimés professeurs, du premier jour jusqu'à l'obtention de mon diplôme, merci pour chaque mot de connaissance. Vous avez toute ma reconnaissance et ma gratitude.

À tous ceux qui ont contribué, ne serait-ce que par un mot, une prière ou un soutien, à ce parcours.

CHAIMA

Dédicaces

À mes parents, pour votre soutien inébranlable et vos encouragements constants tout au long de mes études. Merci d'être ma plus grande source d'inspiration.

*À mon frère **Adem** et à mes sœurs **ines** et **anfel**, pour votre amour, votre soutien et votre présence précieuse tout au long de mon parcours.*

*À ma grande famille, à ma grand-mère aïcha, à mon grand-père larbi, à mes tantes **Amel**, **Hind**, **Ghizlen**, à mes chères cousines **Hayat**, **manel** et **aridj** et mes cousine **ikram**, **Wassila**, pour leur amour, leur soutien.*

*À mes adorables amies : **lina**, **rayan**, **chahinez**, **doua**, **bachair**, **sana**, **doua**, **soumia**, **wisal**.*

Merci pour votre amitié et tous les bons moments passés et à venir.

*Pour mon très cher binôme : **Chaima**.*

*À tous mes collègues de promotion microbiologie applique en particulier **Sofia**.*

À tous les enseignants qui ont participé le long de ces années à ma formation

ILHEM

Liste des abréviations

CaCl₂ : Chlorure de calcium

HgCl₂: Chlorure de mercure

YMB : Yeast Mannitol Broth

YMA : Yeast Mannitol Agar

YMA-RC: Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo

YMA-BTB: Yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol

GPA-BCP: Glucose Peptone Agar +Pourpre de Bromocrésol

NH₄⁺ : Ammonium

NH₃: Ammoniac

NO₃⁻ : Nitrate

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

N₂: nitrogène

NaCl: Chlorure de sodium

Nod : Gène nodulation

Gène Nif : Gène de fixation de l'azote atmosphérique

PGPR: plant growth promoting rhizobacteria

AIA: Acide indole acétique

HCN: Acide cyanhydrique

PVK: Pikovskaya

CMC: Carboxyl Methyl Cellulose

List des figures

Figure 01 : Représentation microscopique du <i>Rhizobium trifolii</i>	2
Figure 02 : Plante légumineuse <i>Melilotus</i>	4
Figure 03 : Plante légumineuse <i>Pisum sativum</i>	5
Figure 04 : Processus de la fixation biologique de l'azote	6
Figure 05 : Structure de la nitrogénase	6
Figure 06 : Structure de l'hémoglobine	7
Figure 07 : Structure des nodules de légumineuses	8
Figure 08 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose <i>rhizobia</i> légumineuse	10
Figure 09 : Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère	14
Figure 10 : Localisation géographique de zone de prélèvement	15
Figure 11 : Plante légumineuses <i>Melilotus</i>	16
Figure 12 : Conservation des nodules sous CaCl_2	17
Figure 13 : Isolement des bactéries (a) Nodule dans une goutte d'eau (b)ensemencement sur milieux spécifique (c) methodes des cadrans	18
Figure 14 : Milieux de culture utilisés	19
Figure 15: Test de l'oxydase	21
Figure 16 : Test de la catalase	22
Figure 17 : Croissance des souches isolées sur le milieu YMA (a): Isolat de <i>Pisum sativum</i> (b): Isolat de <i>Melilotus</i>	24
Figure 18 : Croissance des souches sur le milieu YMB	25
Figure 19: Absorption du rouge Congo. (a): souche <i>Pisum sativum</i> (b): souche <i>Melilotus</i>	25
Figure 20: Croissance des souches isolées sur milieu GPA+BCP	26
Figure 21: Croissance des souches isolées sur milieu YMA-BTB	27
Figure 22 : Observation microscopique des bactéries (Objectif X100)	27
Figure 23 : Réduction des nitrates	29
Figure 24 : Résultats de test hydrolyse de l'urée	29
Figure 25 : Activité cellulosique	30

Figure 26: Production de pectinase	30
Figure 27 : Résultats de test des catalase et oxydase positive	31
Figure 28 : Production d'AIA par isolats bactériens	32
Figure 29 : Halo de transparence autour de la colonie	33
Figure 30 : Production d' NH_3	34
Figure 31 : Production d'HCN	34

List des tableaux

Tableau 01 : Souches utilisées dans cette étude	18
Tableau 02 : Caractères morphologiques des souches testés	27
Tableau 03 : Résultats des tests enzymatique	31

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

ملخص

Résumé

Summary

Introduction Erreur ! Signet non défini.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1- Les interactions plantes légumineuses- bactéries <i>rhizobia</i>	2
1-1- Généralités sur les <i>rhizobia</i>	2
1-2- Généralités sur les plantes légumineuses.....	3
1-2-1. La plante légumineuse <i>Melilotus</i>	4
1-2-2. La plante légumineuse <i>Pisum sativum</i>	4
1-3- La relation symbiotique plantes légumineuses- <i>rhizobia</i>	5
1-3-1. La fixation biologique de l'azote	5
1-3-2. Les molécules clé de la fixation biologique de l'azote	6
1-3-3. La nodulation.....	7
2- Rôle des bactéries nodulant les légumineuses.....	10
2-1- La fixation de l'azote	10
2-2- Amélioration de la fertilité du sol.....	10
2-3- Stimulation de la croissance des plantes.....	11
2-3-1. Solubilisation du phosphate	11
2-3-2. Solubilisation du potassium	12
2-3-3. La production des sidérophores.....	12
2-3-4. Production des phytohormones	12
2-3-5. Protection contre les pathogènes	13
2-4- Tolérance aux stress.....	14
2-5- Contribution à la durable agricole	14

Chapitre 2 : Matériel et méthode

1- Description de la zone d'étude	15
2- Collecte des nodules.....	15

3-	Conservation des nodules.....	16
4-	Isolement des bactéries à partir des nodules	17
5-	Conservation des souches.....	18
6-	Etude des caractères cultureux et morphologiques	19
7-	Examen microscopique par coloration de Gram	19
8-	Détermination des activités des isolats.....	20
8-1-	La fixation de l'azote.....	20
8-2-	Activités enzymatiques.....	20
8-2-1.	Réduction des nitrates	20
8-2-2.	Hydrolyse de l'urée	20
8-2-3.	Cellulase	20
8-2-4.	Pectinase.....	21
8-2-5.	Oxydase.....	21
8-2-6.	Catalase	21
8-3-	Effet PGPR (Plant Growth Promoting <i>Rhizobacteria</i>).....	22
8-3-1.	Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	22
8-3-2.	Solubilisation des phosphates.....	22
8-3-3.	Production d'ammoniac (NH ₃)	22
8-3-4.	Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	23

Chapitre 3 : Résultat et discussion

1-	Etude des caractères cultureux et morphologiques	24
2-	Examen microscopique par coloration de Gram	27
3-	Détermination des activités des isolats.....	28
3-1-	La fixation de l'azote.....	28
3-2-	Activités enzymatiques.....	28
3-2-1.	Réduction des nitrates	28
3-2-2.	Hydrolyse de l'urée	29
3-2-3.	Cellulase	29
3-2-4.	Pectinase.....	30
3-2-5.	Oxydase.....	31
3-2-6.	Catalase	31
3-3-	Effet PGPR (Plant Growth Promoting <i>Rhizobacteria</i>).....	32
3-3-1.	Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	32
3-3-2.	Solubilisation des phosphates.....	32

3-3-3. Production d'ammoniac (NH ₃).....	33
3-3-4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	34
Conclusion	35
Références bibliographiques	37

Annexe 01

Annexe 02

المخلص

تعرف العديد من بكتيريا التربة بخصائصها المفيدة. في هذه الدراسة، حاولنا تحديد دور بكتيريا العقد الجذرية في التربة حيث عزلنا البكتيريا من النباتات البقولية *Melilotus* و *Pisum sativum* الموجودة في منطقة قالمة

تم تمييز العزلات بالدراسات المورفولوجية والتنموية والمجهريّة، ثم تم إخضاعها لسلسلة من الاختبارات التي تسلط الضوء على الأنشطة والأدوار المختلفة لهذه البكتيريا في التربة. هذه الاختبارات هي اختبار تثبيت النيتروجين، واختبارات للبحث عن إنزيمات خاصة واختبارات لمعرفة تأثير تحفيز نمو النبات لهذه البكتيريا. تُظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن عزلاتنا لها مظهر الريزوبيا، ويمكنها تثبيت النيتروجين الجوي، وتمتلك إنزيمات محددة ضرورية للعلاقة التكافلية وتُظهر سمات تحفيز نمو النبات

الكلمات المفتاحية: الريزوبيا ، *Melilotus* ، *Pisum sativum*، تحفيز نمو النبات بكتيريا ، العقد الجذرية .

Résumé

Plusieurs bactéries du sol sont connues par leurs caractères bénéfiques. Parmi eux il y a les bactéries nodulant les légumineuses (BNL). Dans cette étude nous avons essayé de déterminer le rôle des BNL dans le sol où nous avons isolé des bactéries à partir des plantes légumineuses *Melilotus* et *Pisum sativum* situées dans la région de Guelma. Les isolats sont caractérisés par des études morphologiques, culturales et microscopiques puis sont mis à une série de tests qui met en évidence les différentes activités et rôles de ces bactéries dans le sol. Ces tests sont le test de la fixation d'azote, des tests pour la recherche des enzymes spécifiques et des tests pour voir l'effet PGPR de ces bactéries. Les résultats obtenus démontrent que nos isolats ont l'aspect des *rhizobia*, peuvent fixer l'azote atmosphérique, et possèdent des enzymes spécifiques nécessaires à la relation symbiotique et présentent les caractères PGPR.

Mots clés : *Melilotus* , *Pisum sativum* , PGPR, *rhizobia* ,BNL

Summary

Several soil bacteria are known for their beneficial traits. Among them are legume nodulating bacteria (LNB). In this study we tried to determine the role of LNB in the soil where we isolated bacteria from the leguminous plants *Melilotus* and *Pisum sativum* located in the Guelma region. The isolates are characterized by morphological, cultural and microscopic studies and then are put to a series of tests that highlight the different activities and roles of these bacteria in the soil. These tests are the nitrogen fixation test, tests for the search for specific enzymes and tests to see the PGPR effect of these bacteria. The results obtained demonstrate that our isolates have the appearance of *rhizobia*, can fix atmospheric nitrogen, and possess specific enzymes necessary for the symbiotic relationship and present the PGPR traits.

Key word : *Melilotus* , *Pisum sativum* , PGPR, *rhizobia* , LNB.

Introduction

Introduction :

Le sol est l'un des environnements les plus complexes de la biosphère, abritant une grande diversité microbienne, tant sur le plan taxonomique que fonctionnel. En effet, on estime que 80 à 90 % des processus dans le sol sont des interactions catalysées par des micro-organismes (Nannipieri et *al.*, 2003). Cette interaction est une constante entre deux ou plusieurs organismes hétérogènes, dont les deux bénéficient. Ces dernières années, de nombreuses études ont clairement démontré l'importance scientifique et pratique de ces relations symbiotiques pour toutes les plantes (Fortin et *al.*, 2008). Elles contribuent à la réparation du sol, la survie, la croissance et la santé des végétaux (Heijden et *al.*, 2008). Parmi les associations symbiotiques il y a la symbiose plantes légumineuses- bactéries. Une relation essentielle à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite et aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires à son développement (Wery, 1985). Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *rhizobia* (Ndoye, 1990).

L'association symbiotique des légumineuses avec les rhizobia mène à la formation de nodosités sur les racines et les tiges des légumineuses, une structure organisée dans laquelle le microsymbiote est capable de fixer l'azote atmosphérique (Benhalima, 2006). En effet, lorsqu'elle est réussie, cette symbiose peut assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et assurer une production adéquate, permettant aux agriculteurs de réduire leur consommation d'engrais azotés chimiques et d'atténuer la pollution environnementale (Faghire, 2012).

Le sol abritent également des bactéries appelées PGPR (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes) qui favorisent la croissance des plantes par des mécanismes biologiques tels que la fixation de l'azote, la production phytohormones, la synthèse des antibiotiques et la réduction du stress environnemental dans le sol (Fuentes et *al.*, 2005).

L'objectif de notre travail est de déterminer le rôle des bactéries nodulant les légumineuses dans le sol et de voir si elles ont un effet PGPR en plus de leurs rôles symbiotiques. Ces bactéries BNL sont isolées à partir des nodules des deux plantes légumineuses *Pisum sativum* et *Melilotus* situées dans la région de Guelma.

Ce travail est divisé en trois chapitres principaux :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique approfondissant notre compréhension du contexte scientifique de notre problématique.
- Le deuxième chapitre présente le matériel et la méthodologie réalisée dans ce travail.
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus avec leurs discussions.
- Enfin, notre document est clôturé par une conclusion générale.

CHAPITRE 1

Revue bibliographique

2- Les interactions plantes légumineuses- bactéries rhizobia

2-1- Généralités sur les rhizobia

Le terme général «*rhizobia*» couvre toutes les bactéries qui induisent la formation de nodules sur les racines, ou parfois sur les tiges, d'une légumineuse hôte, où ils fixent l'azote atmosphérique N₂ (de Lajudie et Young, 2017).

Les *rhizobia* sont des bactéries du sol, appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, Gram négatif, non sporulantes. On distingue deux formes ; une forme végétative où les bactéries apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur et sont mobiles par un flagelle polaire ou un flagelle subpolaire pour les *Rhizobia* à croissance lente ou par deux à six flagelles péritriches pour les *Rhizobia* à croissance rapide (Holt et al., 1994). A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les *Rhizobia* se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers ayant une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).



Figure 01: Représentation microscopique du *Rhizobium trifolii* (Vincent, 1982)

La culture des *rhizobia* se diffère selon le groupe ; le premier groupe comporte les *rhizobia* à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe des *rhizobia* à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h. Le milieu le plus

utilisé pour la culture des *Rhizobium* est le milieu YMA (yeast mannitol agar) contenant des sels minéraux, du sucre, de l'extrait de levure et de l'agar (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les *rhizobia* sont des bactéries chimioorganotrophes, utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leur croissance (Somasegaran et Hoben, 1994).

Ces bactéries sont des aérobies ou microaérophiles et peuvent croître à une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de 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 optimale se situe entre 25-30°C (Holt et al., 1994), mais certaines souches tolèrent des températures de l'ordre de 40, 42 et 45° C (Ruiz-Diez et al., 2009).

Le génome des *Rhizobia* a une longueur de 6 872 702 pb avec une teneur en GC de 61,18% et comprend 5 réplicons, un chromosome circulaire de taille 4 537 948 pb et 4 plasmides circulaires de taille 4 537 948 pb. Parmi 6 643 gènes prévus, 6 581 sont des gènes codant pour des protéines et 62 gènes codent pour un ARN. La majorité (72,44%) ont reçu une fonction putative, tandis que les autres ont été annotés sous forme de protéines hypothétiques (Reeve et al., 2010).

2-2- Généralités sur les plantes légumineuses

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Fabacées* qui représentent la troisième famille de plantes par un nombre d'espèces 1900 références après les *Astéracées* et les *orchidées* (Schneider et al., 2015). Les légumineuses se répartissent en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Papilionoideae* et les *Mimosoideae*. Cependant, environ 463 genres et 18000 espèces de légumineuses ont été décrites (Skerman 1982 ; Franche et al., 2009).

Les légumineuses sont caractérisées par des fleurs papilionacées (en forme de papillon) pour la plupart des espèces cultivées. Une gousse contenant des graines (la gousse étant le fruit issu de l'ovaire de la fleur). Pour la majorité des membres de cette famille, la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique (N₂) pour produire ses propres composants protéiques. Cette capacité est permise par la symbiose avec des bactéries du sol fixatrices de l'azote au sein d'organes spécialisés (les nodules) qui se développent sur les racines (Schneider et al., 2015).

2-2-1. La plante légumineuse *Melilotus*

Melilotus, sont des plantes appartenant à la famille des légumineuses, sous famille *Fabacées* de *papilionacées* qui comprend des plantes herbacée annuelles ou bisannuelles, plus rarement vivaces. Le feuillage est fait de feuilles trifoliolées dentées ; foliole médiane pétiolée, les latérales subsessiles. Deux stipules adnées au pétiole. Les fleurs sont blanche au jaune regroupées en grappes axillaires, les gousses sont généralement à une ou deux graines, Le nom évoque en grec un lotier (lotos) ayant l'odeur du miel (meli), sont souvent considérées comme des mauvaises herbes (Quèzel et Santa, 1962 ; Arbeille et *al.*, 2000; Al Sherif, 2009).



Figure 02: plante légumineuse *Melilotus* (Laouar, 2013)

2-2-2. La plante légumineuse *Pisum sativum*

Le petit pois, *Pisum sativum*, est une Plante grimpante herbacée annuelle, c'est une plante diploïde ($2n=14$ chromosome), appartient à la famille des légumineuses (*Fabacées*) (Krajinski et *al.*, 2011), autogame (Deulvot et *al.*, 2010). La tige de petit pois est herbacée de hauteur variable, creuse et grêle, arrondie ou légèrement anguleuse (Prioul et *al.*, 2004). La tige est mince cylindrique de 30 à 150 cm de long avec peu ou pas de ramifications (Lim, 2012). Le petit pois forme des feuilles alternantes avec 1-3 paire de folioles et un long pétiole creux. Les folioles opposées ou non sont rhomboïdes, asymétriques et pourvues de courts pétioles. La fleur est de type papilionacé comprend 5 pétales, 5 sépales et 10 étamines. La fécondation se fait par auto-pollinisation. Le fruit est une gousse à deux valves et d'une longueur de 4,5-11 cm. Les gousses contiennent en moyenne 5 à 10 graines. Les graines sont de couleur verte ou crème. Elles sont globulaires et lisses (Nyabyenda, 2005).



Figure 03: plante légumineuse *Pisum sativum*

2-3- La relation symbiotique plantes légumineuses- rhizobia

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est un processus bénéfique et réciproque permet pour les légumineuses (macrosymbiontes) de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire des bactéries appelées *rhizobia* (microsymbiontes) (Gibson et *al.*, 2008).

2-3-1. La fixation biologique de l'azote

Certains micro-organismes, principalement des procaryotes, utilisent l'azote moléculaire (N_2) présent dans l'air pour synthétiser leurs protéines. Ce mécanisme repose sur l'activité d'une enzyme spécifique, la nitrogénase, qui catalyse la conversion du N_2 en ammonium (NH_4^+), une forme d'azote directement assimilable par les plantes (Franche et *al.*, 2009). Elles sont donc dépendues d'organismes procaryotes essentiellement les bactéries qui possèdent la nitrogénase qui est une enzyme capable de réduire l'azote atmosphérique dont les cellules eucaryotes sont totalement dépourvues (Figure 04), la vitesse du processus de fixation limite la croissance végétale dans beaucoup de situations (Singh, 2017).

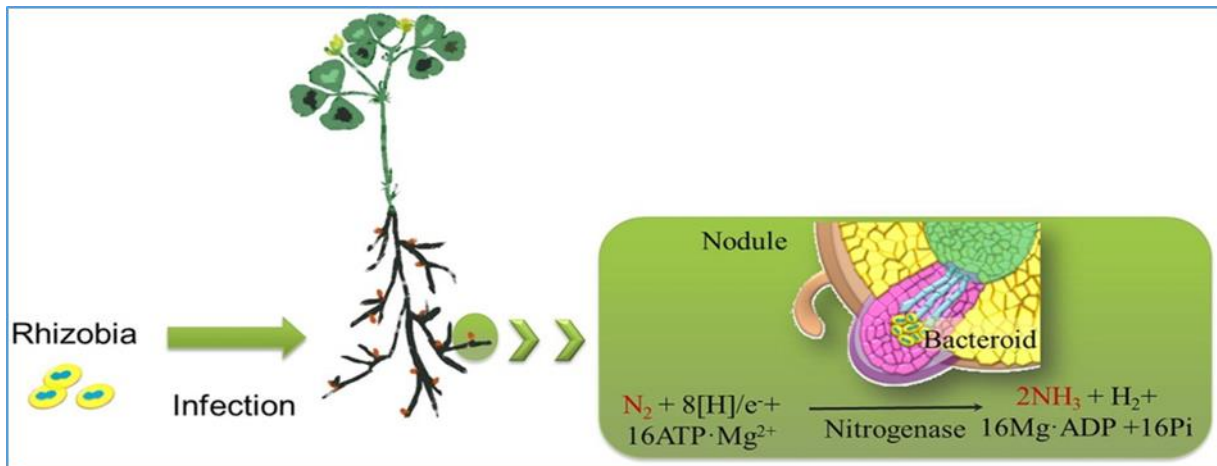
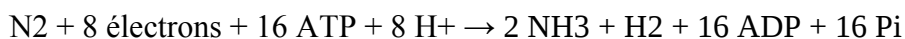


Figure 04: processus de la fixation biologique de l'azote (Teng et al., 2015)

2-3-2. Les molécules clé de la fixation biologique de l'azote

2-3-2.1. La nitrogénase

La nitrogénase est un complexe enzymatique qui convertit l'azote de l'atmosphère en ammonium dans le milieu microaérophile du nodule. La nitrogénase catalyse la conversion du N_2 en ammoniac dépendante du Mg ATP (Saidi., 2021).



La nitrogénase est une enzyme multi sous unités constituée de deux protéines de taille différentes (Hopkins, 2003 ; Davet, 1996 ; Werner, 1992). La Fe-protéine petite protéine, est constituée de deux sous-unités polypeptidiques identiques. Elle a une masse moléculaire de 64 KDa. La protéine du nitrogénase la plus grande nommée Mo-Fe-protéine, est un tétramère qui se compose de deux sous-unités distinctes de type $\alpha\alpha\beta\beta$. La masse moléculaire est de 245 KDa (Hopkins, 2003 ; Werner, 1992).

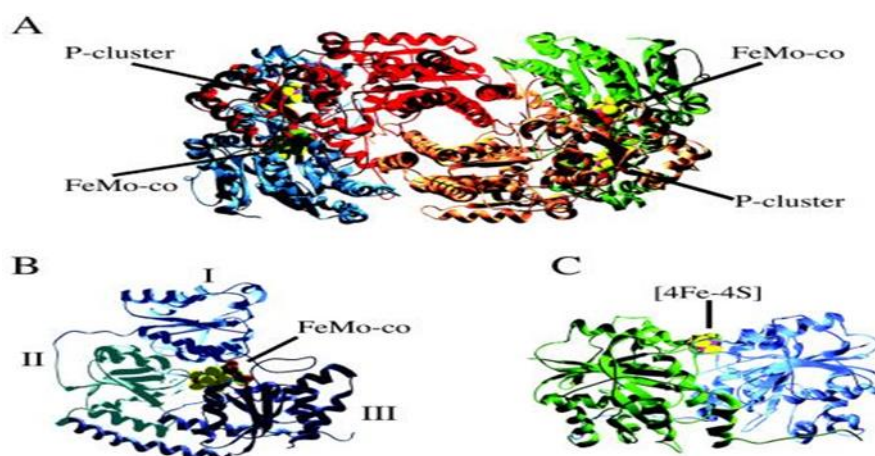


Figure 05: Structure de la nitrogénase (Rubio et Ludden, 2005)

Le complexe nitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote atmosphérique. Cette enzyme n'existe que chez les organismes procaryotes. Elle est constituée de deux composants : le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités représentées en bleu et vert et deux sous-unités représentées en rouge et orange (**A**), le détail de la sous-unité est donné (**B**) et le composant II est un homodimère (**C**) (Rubio et Ludden, 2005).

2-3-2.2. La lèghémoglobine

La protéine lèghémoglobine présente uniquement dans les nodosités racinaires. La production de la lèghémoglobine est déterminée par les données génétiques fournies par la plante et la bactérie, aucune des deux entités n'étant en mesure de la synthétiser de manière autonome (Perry et *al.*, 2004). La globine est codée par le génome de la plante tandis que l'hème est contrôlé par le génome de la bactérie symbiotique (Madigan et *al.*, 2007). Elle teinte de rouge les nodules racinaires, ce qui constitue un indicateur de l'activité des nodules des légumineuses en symbiose (Tourte et *al.*, 2005). Le rôle exclusif de cette molécule est de capturer avec une grande affinité, toute présence d'oxygène susceptible d'entrer dans le nodule, préservant ainsi la nitrogénase bactérienne de son effet néfaste. En effet, elle est aussi responsable de la fourniture d'oxygène aux oxydases qui se trouvent à l'extrémité de la chaîne d'oxydoréduction des bactéroïdes (Wajcman et Kiger, 2002).

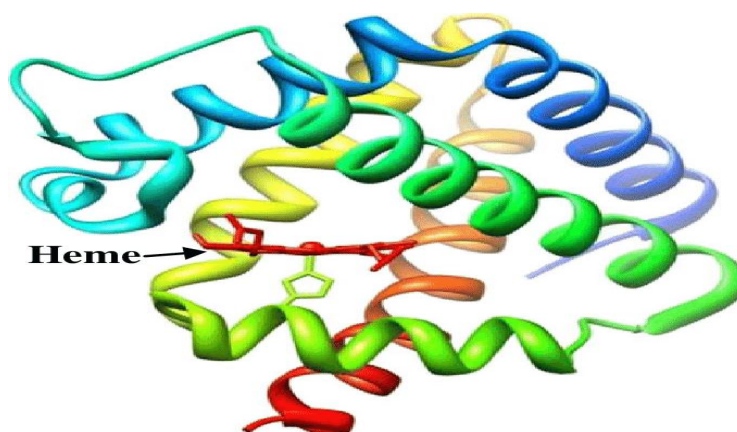


Figure 06: Structure de la lèghémoglobine A du soja (M. I. Oshtrakh et al. 2013).

2-3-3. La nodulation

Le mutualisme entre les Fabaceae et les rhizobia conduit à la formation de structures spécialisées sur les racines ou les tiges, connues sous le nom de nodules ou nodosités. Ces nodosités sont des organes dédiés à l'échange métabolique entre les bactéries et la plante. À l'intérieur de ces structures, les microsymbiotes convertissent l'azote atmosphérique en ammonium, une forme assimilable qu'ils échangent avec la plante en contrepartie de produits photosynthétiques (substrats carbonés) (Wang et *al.*, 2012).

Deux types de nodules ont été identifiés. Les nodules indéterminés, de forme allongée, et les nodules déterminés, de forme arrondie. Cette classification repose sur la localisation du système vasculaire (au niveau de la racine ou de la tige) ainsi que sur la persistance ou non d'une zone méristématique (Domergue, 2017).

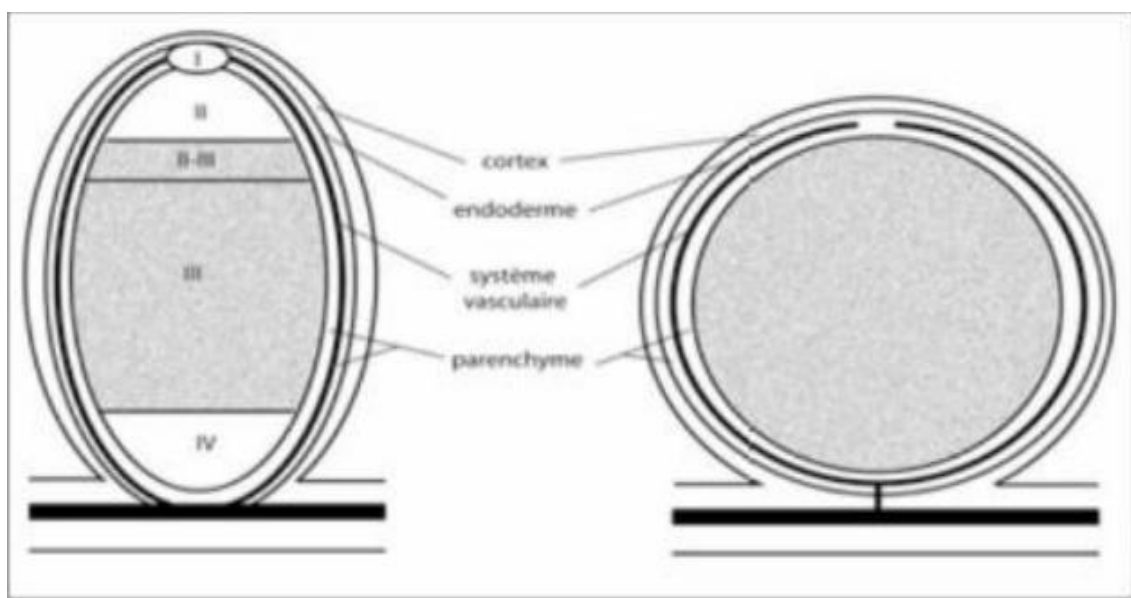


Figure 07: Structure des nodules de légumineuses A: Nodule de légumineuse de type indéterminé. B : Nodule de légumineuse de type déterminé. I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV :zone de sénescence (Chabbi, 2010).

2-3-3.1. Génétique de la nodulation

En général, trois gènes symbiotiques interviennent dans le processus de nodulation et de fixation azotée chez la bactérie. Il s'agit des gènes *nod* nécessaires à la nodulation, des gènes *nif* codant pour la nitrogénase et des gènes *fix* indispensables pour la fixation de l'azote (Kouakou, 2011). Les gènes *nod* sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes *nif* et les gènes *fix* sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

Les gènes spécifiques de la plante hôte codent pour des nodulines, protéines impliquées soit dans la formation des nodosités, soit dans des fonctions postérieures comme la synthèse de la leghémoglobine, des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005). Ces nodules sont codées par des gènes *Nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003).

2-3-3.2. Les étapes de la nodulation

- **Echange de signal d'infection**

Le processus de nodulation débute par un échange complexe de signaux entre la plante hôte et les bactéries symbiotiques. Les racines de la plante, à travers leur métabolisme primaire, libèrent dans leur environnement rhizosphérique divers composés organiques, dont certains, tels que les flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonones), exercent une activité chimiotactique, attirant spécifiquement certains microorganismes du sol, dont les *Rhizobium* (Rasanen, 2002). Ce signal perçu par les *Rhizobium* induit l'expression des gènes Nod, lesquels codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse des facteurs de nodulation, à savoir les lipochitoooligosaccharides (LCO) (Denarié, 2000).

Ces facteurs Nod interagissent avec des récepteurs spécifiques sur la surface de la plante, induisant la modulation de son programme organogénétique et la formation des nodules racinaires, permettant ainsi l'établissement de la symbiose (Patriarca et al., 2004).

- **Infection**

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli et al., 2003; Perry et al., 2004). Les facteurs Nod émis par les *Rhizobiums*, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca^{2+} . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques (Pelmont, 1995; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobia (Esseling et al., 2003).

L'infection qui s'accompagne d'une digestion de la paroi cellulaire du poil racinaire peut avoir lieu à travers les poils absorbants, les blessures, ou l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002).

- **Développement du nodule et maturation des bacteroides**

Les *rhizobia* sont libérés dans les cellules hôtes au niveau sous-méristématique. Cette libération semble se produire dans la région du cordon infectieux où la gaine cellulosique est localement absente. Une fois libérées, les bactéries se retrouvent dans le cytoplasme de la cellule hôte, encapsulées dans une membrane qui les sépare du cytoplasme végétal. Cette membrane dérive principalement du plasmalemm des cellules envahies (Ndoye, 1990).

Les bactéroïdes sont ainsi isolés du cytoplasme végétal par une membrane spécialisée, appelée "membrane pér bactéroïde" ou membrane de séquestration. Cette membrane joue un

rôle clé dans l'échange de nutriments entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. À l'intérieur de cette structure, les bactéries différenciées se transforment en bactéroïdes responsables de la fixation de l'azote (Gharzouli, 2006). Le nodule mature se compose de deux régions distinctes : les tissus internes, où se trouvent les cellules infectées par les bactéries et où se déroule la fixation de l'azote, et les tissus externes, qui facilitent les échanges avec le reste de la plante et assurent la protection des tissus internes (Selami, 2015).

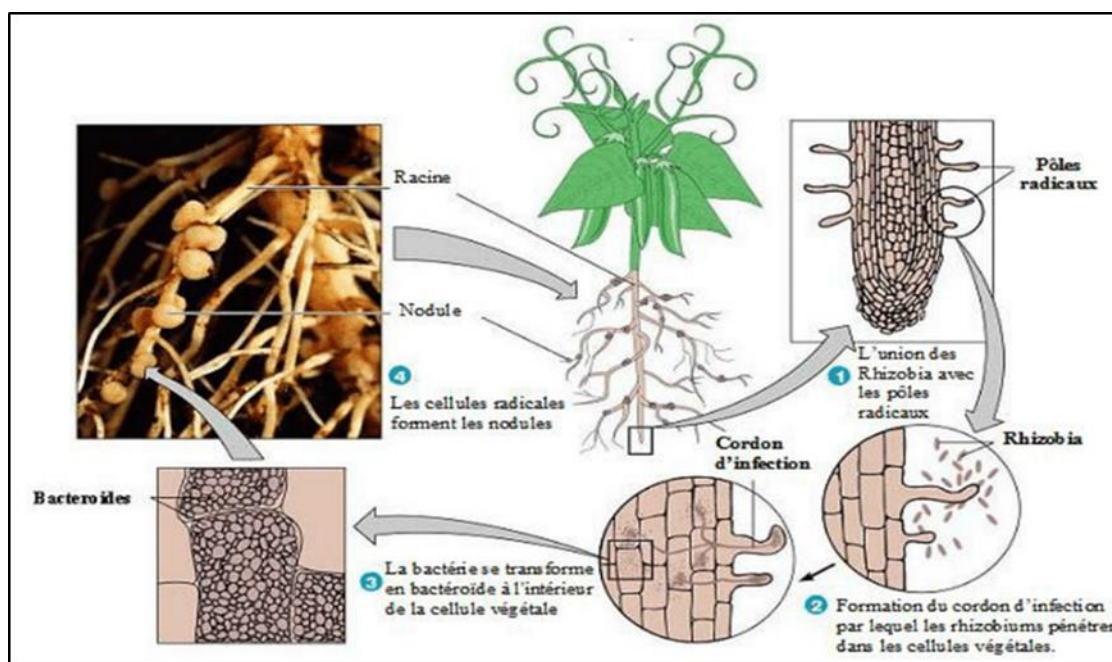


Figure 08: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.(Faghir, 2012)

3- Rôle des bactéries nodulant les légumineuses

3-1- La fixation de l'azote

Les *rhizobia* ont la capacité inhabituelle de fixer l'azote atmosphérique et de le transformer en une forme utilisable par les plantes. Cette capacité unique des *rhizobia* à convertir l'azote atmosphérique en une forme (ammoniac) facilement assimilable par les plantes permet aux légumineuses et autres cultures de prospérer sans, ou avec moins, besoin d'engrais azotés synthétiques (Rifat et *al.*, 2010).

3-2- Amélioration de la fertilité du sol

Les *rhizobia* sont des bactéries importantes du sol qui contribuent au maintien de la structure et de la fertilité du sol. En aidant à créer et à maintenir les agrégats du sol, ils augmentent la porosité, l'infiltration de l'eau et la rétention des nutriments. Cela améliore la santé globale et la productivité du sol, augmente sa résistance à l'érosion et à la dégradation et

améliore la gestion de l'eau, en particulier dans les zones sujettes à la sécheresse ou à la pénurie d'eau (Korir et *al.*, 2017).

La décomposition de la matière organique est assurée par les microbes du sol, ce qui favorise le cycle des nutriments et la libération des nutriments piégés dans les déchets organiques. Ce processus augmente la teneur en matière organique du sol, ce qui est important pour sa fertilité (Mng'ong'o et *al.*, 2023).

3-3- Stimulation de la croissance des plantes

Les mécanismes vitaux que les LNB ou les rhizobactéries (directement ou indirectement) utilisent pour favoriser la croissance et la productivité des cultures comprennent la production de phytohormones, de sidérophores, de solubilisation du phosphate et de réduction de la production d'éthylène (Mng'ong'o et *al.*, 2023). Plusieurs études et chercheurs (Jindo et *al.*, 2010 ; Mendes. et *al.*, 2020) ont identifié différents isolats bactériens qui peuvent contrôler directement la physiologie des plantes en imitant la synthèse des phytohormones, ce qui améliore la disponibilité de l'azote et d'autres nutriments végétaux dans les sols agricoles, accélérant ainsi la croissance et le développement des cultures.

3-3-1. Solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est l'un des éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des végétaux après l'azote. Bien que le phosphore ne soit pas rare dans les sols, il est présent sous des formes insolubles, non disponibles pour le prélèvement par les plantes. La solubilisation du phosphore représente une solution pour augmenter la concentration de P sous des formes biodisponibles (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) sans apport exogène d'engrais minéral. Il existe des bactéries capables de solubiliser le phosphore inorganique, dites *phosphate-solubilizing bacteria* (PSB) (Zaidi et *al.*, 2015). Ces bactéries sont capables de convertir le phosphore insoluble en une forme accessible et facilement assimilable par les plantes (Ahemad & Kibret, 2014; Gupta et *al.*, 2015). Elles mettent en jeu des molécules de faible poids moléculaires telles que l'acide citrique, l'acide gluconique ou l'acide oxalique (Glick, 2012). Leur production est contrôlée par des métabolites secondaires libérés par les bactéries. Donc les microorganismes bénéfiques solubilisant le phosphore convertissent les formes insolubles en formes directement assimilable par les plantes lors de sécrétion d'acides organiques qui diminuent considérablement la valeur du pH de la rhizosphère et entraîne la dissociation des liaisons dans les composés phosphorés insolubles tels que le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, contenu dans les sols calcaires (Afzal et Bano, 2008).

3-3-2. Solubilisation du potassium

Le potassium (K) est le troisième macronutriment essentiel majeur pour la croissance des plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% du potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés (Parma & Sindhu, 2013). Sans potassium adéquat, les plantes auront des racines peu développées, se développeront lentement, produiront de petites graines et auront des rendements faibles. Cela a mis l'accent sur la recherche d'une autre source indigène de potassium pour l'absorption des plantes et de maintenir le statut du potassium dans les sols pour soutenir la production agricole organique. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont capables de solubiliser la roche potassique par la production et la sécrétion d'acides organiques (Kumar & Dubey, 2012).

3-3-3. La production des sidérophores

Le fer est un micronutriment essentiel pour la plupart des organismes vivants. La forme prédominante de fer dans le sol est le (Fe^{3+}), avec une très faible solubilité et donc peu disponible dans les sols cultivés (Ma, 2005). Pour l'obtenir, les micro-organismes ont développé des stratégies en synthétisant des sidérophores (Schwyn et Neillands 1987). Cette synthèse se produit uniquement en cas de carence en fer (Whipps, 2001). De nombreuses plantes peuvent utiliser divers sidérophores bactériens comme source de fer, et de nombreuses bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres de rhizosphère *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* (Kuffner et al., 2008). La production de sidérophores dans des conditions de stress dû au fer confère aux bactéries *Rhizobium* un avantage supplémentaire, éliminant les agents pathogènes de carence en fer (Deshwal et al., 2003).

3-3-4. Production des phytohormones

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des substances qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les *rhizobactéries* favorisant la croissance des plantes produisent des phytohormones telles que les auxines, les cytokines, les gibbérellines et l'éthylène, qui peuvent influencer la prolifération cellulaire dans la structure racinaire par surproduction de racines latérales et de racines avec augmentation ultérieure de l'apport en nutriments et en eau (Arora, 2013).

L'acide indole acétique est une hormone de croissance végétale considérée comme la plus importante du groupe des auxines (Ashrafuzzaman et al., 2009). Il contrôle de nombreux processus physiologiques chez les plantes, notamment l'agrandissement et la division

cellulaires, la différenciation des tissus et leurs réponses à la lumière (Teale et al., 2006). La capacité de produire cette phytohormone a été signalée chez 80 % des rhizobactéries. Parmi les communautés bactériennes du sol, plusieurs genres tels que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Gupta et al., 2015), *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* (Ferreira et al., 2019) *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia* et *Kitasatospora* sont capables de produire l'acide indole acétique participant ainsi à la promotion de la croissance de plusieurs plantes économiquement importantes (Numan et al., 2018).

Les cytokinines sont des dérivés de la purine et qui sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines. Ils favorisent et maintiennent la division des cellules végétales dans les cultures et sont également impliqués dans divers processus de différenciation, croissance des racines primaires (Chaitanya et Meenu, 2015). En effet, ce type de molécules peut être produit par plusieurs rhizobactéries comme *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodospirillum rubrum*, et *Bacillus subtilis* (Gupta et al., 2015). Cependant, les souches de *Rhizobium* sont signalées comme les bactéries les plus productrices des cytokinines (Patil et al., 2017) et en particulier *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium meliloti* (Goswami et al., 2016).

Les gibbérellines sont des hormones végétales impliquées dans presque toutes les étapes de la croissance et du développement des plantes, y compris l'embryogenèse, l'élongation de la tige, la floraison, l'expansion des feuilles et la maturation des fruits (Binenbaum et al., 2018). Parmi les bactéries, la caractérisation des gibbérellines a été d'abord rapportée chez *Rhizobium meliloti* puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante (Joo et al., 2009).

3-3-5. Protection contre les pathogènes

Certaines souches de *rhizobium* posséderaient des propriétés de lutte biologique, luttant contre la croissance des agents pathogènes et des ravageurs présents dans le sol. Il est capable de lutter contre les infections et les maladies des plantes. Les rhizobia et d'autres microbes bénéfiques peuvent interagir de manière antagoniste avec des microbes indésirables, protégeant ainsi les plantes des maladies et réduisant le besoin de pesticides chimiques (Moh et al., 2020).

3-4- Tolérance aux stress

Différentes familles de bactéries, dont *Rhizobium*, peuvent favoriser la croissance des légumes et des cultures dans des conditions de stress abiotique (Yildirim & Taylor, 2005 ; Barassi *et al.*, 2006 ; Egamberdieva & Kucharova, 2009).

3-5- Contribution à la durable agricole

Le rôle des microbes du sol dans la formation de l'humus est dû à leur capacité à décomposer la matière organique. Lorsque les feuilles, les plantes ou les animaux meurent, les micro-organismes les décomposent, permettant à l'humus de se mélanger au sol. Ainsi, l'altération minérale contribue, par l'intermédiaire des produits chimiques et des forces exercées par les communautés microbiennes, à la formation des sols, assurant le recyclage des nutriments des plantes et permettant une productivité durable des terres dans des écosystèmes agricoles durables (Alison *et al.*, 2016).

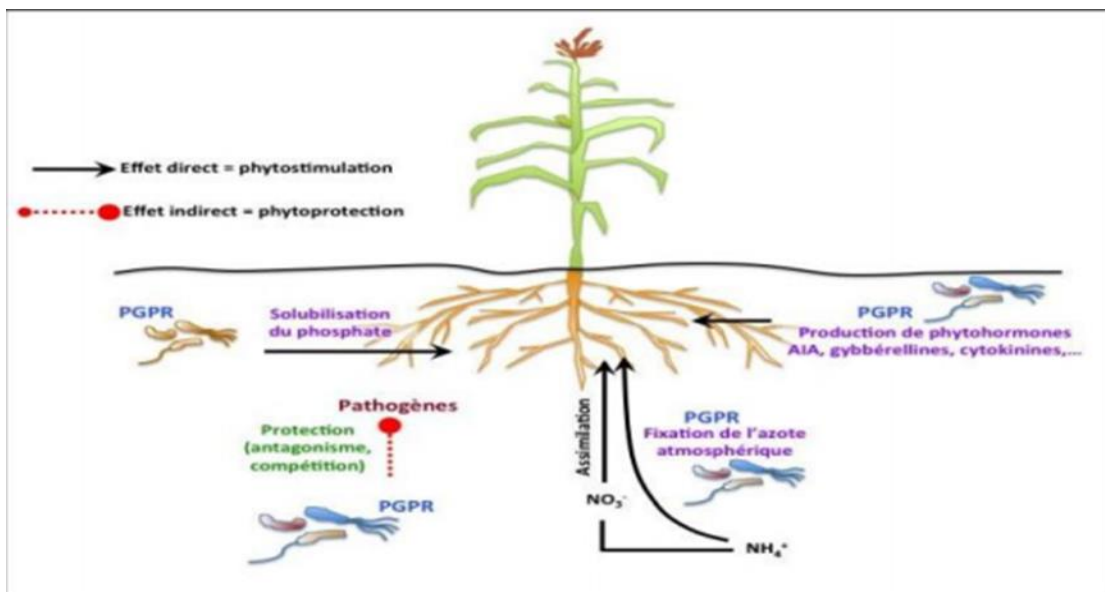


Figure 09: Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009).

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

1- Description de la zone d'étude

Les deux plantes "*Melilotus*" et "*Pisum sativum*" utilisées dans cette étude ont été prélevées de la région de Guelma. Guelma se situe au cœur d'une grande région agricole à 290 m d'altitude. Elle est limitée au Nord par la wilaya d'Annaba (65 km), au Nord-Est par la wilaya d'El-Tarf, au Nord-Ouest par Skikda, au Sud-Ouest par Constantine (116 Km), et au Sud-Est par Souk-Ahras. Les températures moyennes varient entre 4°C en hiver et 41°C en été. Les précipitations annuelles varient entre 654 et 1000 mm (Haddad et al., 2015). Les coordonnées géographiques de la wilaya de Guelma sont 36° 28' 0" Nord, 7° 25' 60" Est avec une Latitude de 36.4667 et une Longitude de 7.4333. (Figure 10)

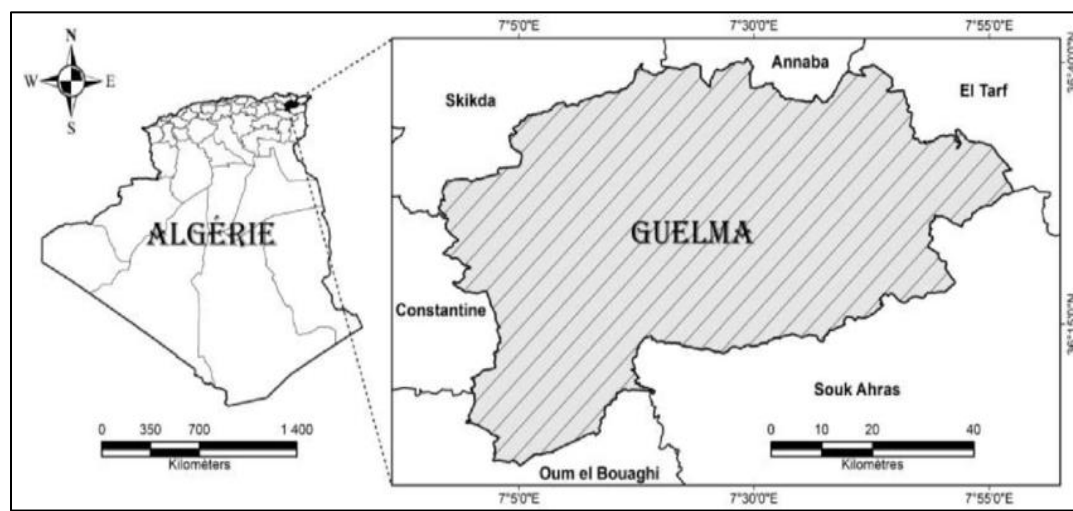


Figure 10: Localisation géographique de zone de prélèvement

2- Collecte des nodules

La collecte des plantes légumineuses *Melilotus* et *Pisum sativum* a été réalisée en période de floraison des plantes au mois de mars selon les techniques préconisées par Vincent, (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) :

Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, puis enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour éviter d'endommager les racines et les racines secondaires ou beaucoup de nodules sont souvent trouvés, ensuite placer délicatement la plante dans un sachet de plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante, pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doit être coupées à l'aide d'un couteau de 1 à 2 mm de site d'attache de nodules, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries.



Figure 11: Plante légumineuses *Melilotus* (prise personnelle)

3- Conservation des nodules

Pour une période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Somasegaran et Hoben (1994). Qui consiste à remplir $\frac{1}{4}$ des flacons stériles par du CaCl_2 . Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules et refermer hermétiquement jusqu'au moment d'utilisation.

Il est recommandé de placer dans un seul tube les nodosités issues d'une même plante. Les flacons sont étiquetés en indiquant le nom de la plante, la date et le lieu de collecte et la date de conservation (Figure 12).

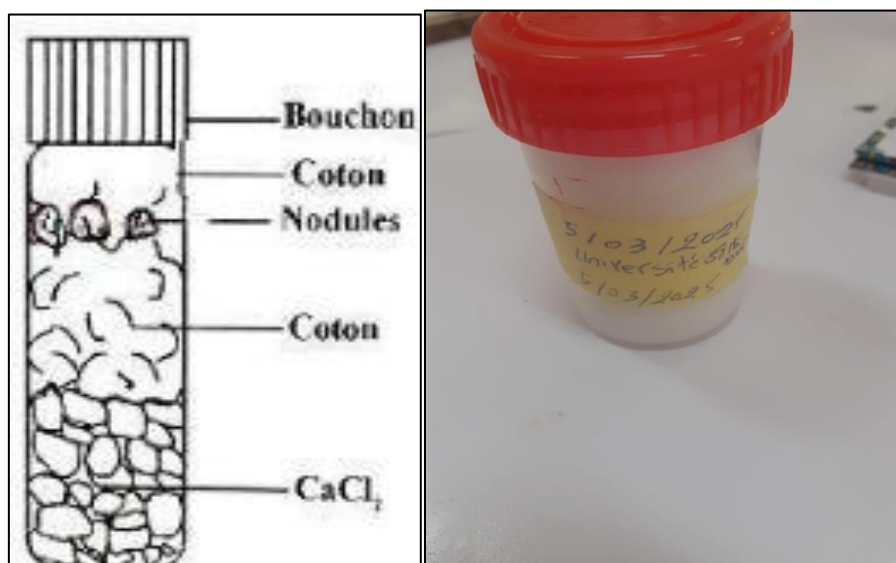


Figure 12: Conservation des nodules sous CaCl_2 (Somasegaran et Hoben ,1994)

4- Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodules sont placés dans un tube contenant l'eau distillée durant toute une nuit à 4°C, puis une heure à une température ambiante.

Les nodules sont stérilisés en immergeant dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes puis transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g Hg Cl_2 + 5 ml HCl + 1 l d'eau distillée) pendant 3 minutes. Enfin rincés abondamment à l'eau distillée stérile (10 fois), et laissés pendant 1 heure dans l'eau distillée après le dernier rinçage.

L'isolement des bactéries est réalisé selon la méthode des nodules écrasés selon Vincent (1970). Devant le bec bunsen, dans une boîte de pétri stérile, chaque nodule stérilisé est écrasé à l'aide d'une pince stérile dans une goutte d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention d'un jus nodulaire. Une suspension de chaque nodule écrasé est étalée par une anse de platine sur la surface des deux milieux spécifiques Yeast-Mannitol-Agar additionné de rouge Congo (YMA-RC) et Glucose peptone agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA-BCP). L'ensemencement est réalisé selon la méthode des trois cadrans et les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures (Figure 13).

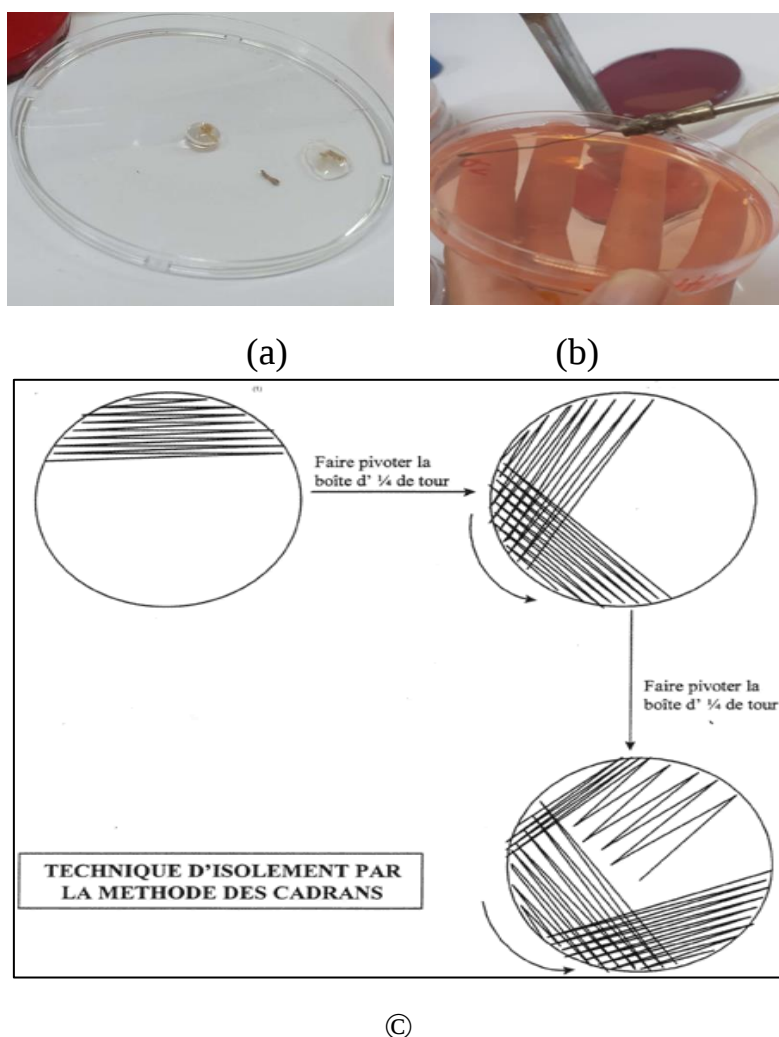


Figure 13: Isolement des bactéries

(a) Nodule dans une goutte d'eau (prise personnelle) (b) Ensemencement sur milieux spécifique (prise personnelle) (c) Méthodes des cadrans

5- Conservation des souches

Cette opération se fait sur le milieu YMA + CaCO_3 , en ajoutant 3g/l de CaCO_3 au milieu YMA. L'ensemencement se fait à partir d'une culture bactérienne fraîche sur la surface d'une gélose inclinée. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48h. Les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. La durée de cette conservation est de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

Tableau 01: souches utilisées dans cette étude

Isolats de <i>Melilotus</i>	M1	M2	M3	M4
Isolats de <i>Pisum sativum</i>	P1	P2	P3	P4

6- Etude des caractères cultureux et morphologiques

Pour faire l'étude morphologique ; les souches sont ensemencées sur le milieu liquides YMB (Yeast Mannitol Broth) et sur 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 et les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48h

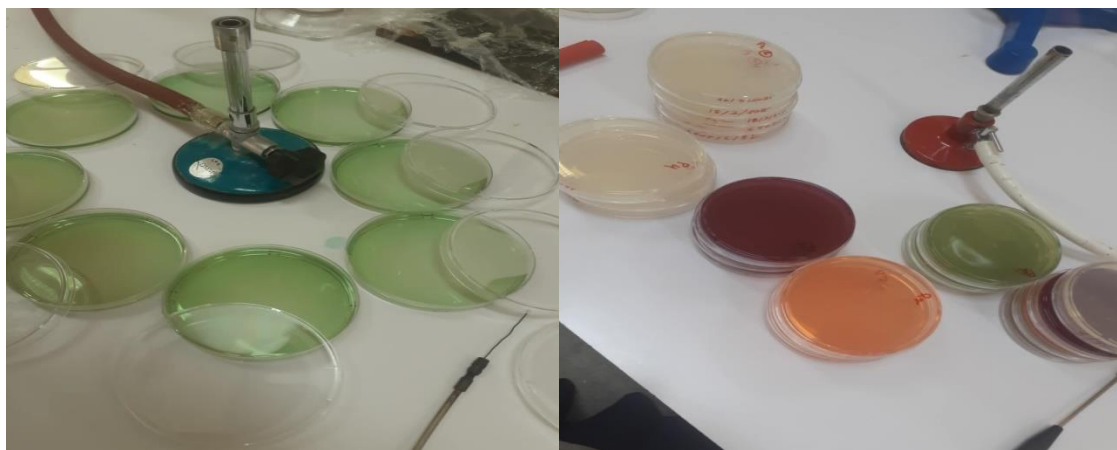


Figure 14: milieux de culture utilisés (prise personnelle)

7- Examen microscopique par coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier

Après préparation du frottis, les étapes de coloration sont les suivantes :

- Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1 minute.
- Verser sur la lame la solution iode et laisser agir 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool-acétone.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine, laisser agir 1 minute.
- Laver avec de l'eau distillée.

- Observer à immersion .

8- Détermination des activités des isolats

8-1- La fixation de l'azote

Pour déterminer l'activité de la fixation d'azote, les isolats sont cultivés sur milieu solide « Burk's N-free ». A partir d'une culture fraîche YMB dépose 100µl de suspension bactérienne à la surface du milieu solide, étaler par un râteau puis incubé à 30°C pendant 5 à 7 jours (Wilson et Knight (1952) et Park et al. (2005)).

8-2- Activités enzymatiques

8-2-1. Réduction des nitrates

Ce test permet de déterminer la présence de nitrate réductase, il est réalisé sur le bouillon nitraté. Après l'ensemencement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 4 jours.

Pour la lecture, ajouter les réactifs :

Réactif Nitrate 1 : l'acide sulfanilique.

Réactif Nitrate 2 : alpha-naphtylamine.

La formation de la couleur rouge est le résultat de la présence de cette enzyme.

8-2-2. Hydrolyse de l'urée

Cette activité enzymatique est déterminée par l'ensemencement sur le milieu Urée-indole. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24-48 heures. Le virage de couleur du milieu vers le rose indique la présence d'uréase.

8-2-3. Cellulase

Les souches sont mises en culture sur le milieu YMA contenant 0,25% de CMC (Carboxy Methyl Cellulose). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante. Les boîtes sont remplies d'une solution de rouge Congo (1 mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve à 30°C. La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1N. Les boîtes sont incubées pendant 30 minutes dans l'étuve à 30°C puis vidées de cette solution. Les colonies qui apparaissent sur fond rouge avec un halo jaune orange indique la présence de l'enzyme endoglucanase chez les souches étudiées (Gupta et al., 2012).

8-2-4. Pectinase

Le milieu pectine agar est utilisé pour la sélection des souches bactériennes productrices de la pectinase. Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les boîtes sont inondées par la solution lugol pendant 10 min. Un résultat positif se traduit par un halo clair autour des stries (Benkahoul et al., 2017).

8-2-5. Oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral (Camille, 2006).

A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur de disque d'oxydase. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Abdlhafid, 2011) (Figure 15).

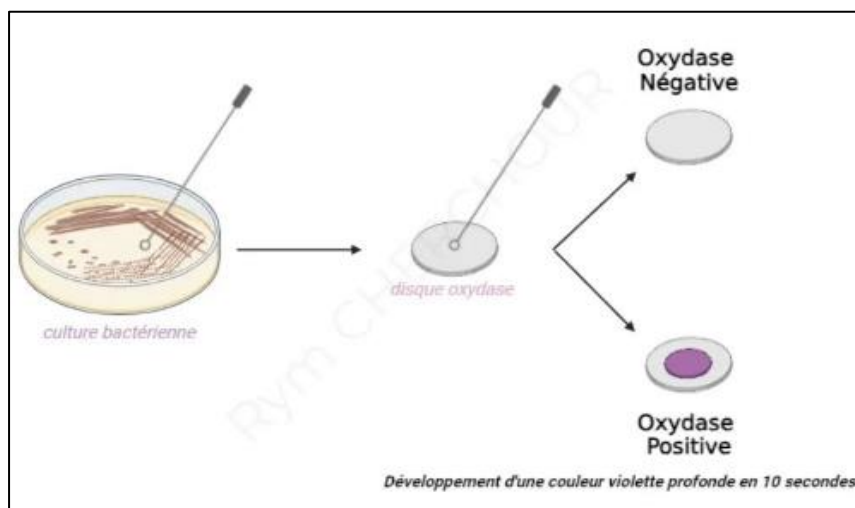
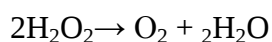


Figure 15: Test de l'oxydase

8-2-6. Catalase

La catalase est une enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante



Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10 volumes. La mise en évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (Graham et Parker 1964).

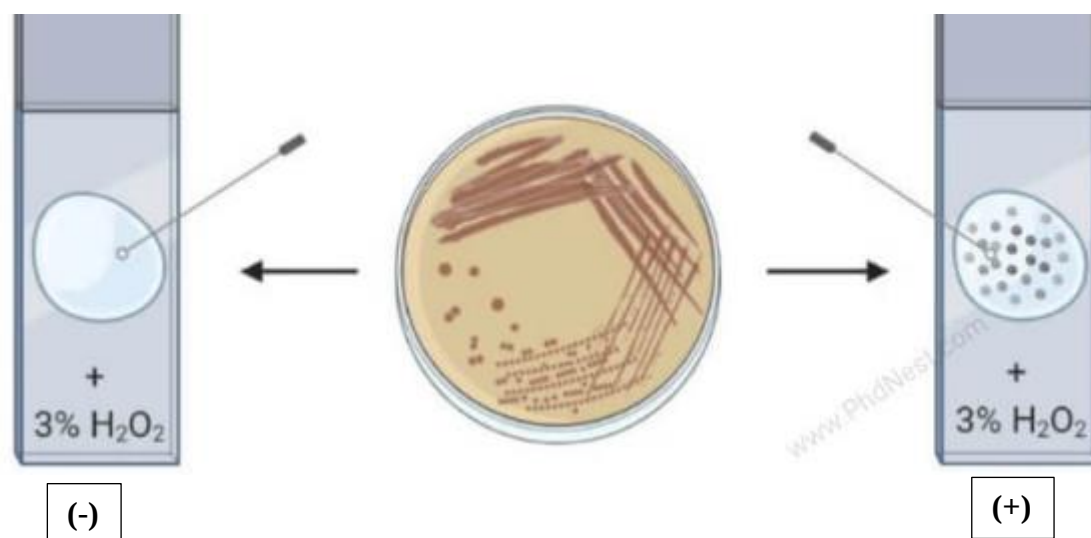


Figure 16: Test de la catalase

8-3- Effet PGPR (Plant Growth Promoting *Rhizobacteria*)

8-3-1. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production d'auxines a été testée sur milieu TSB (Annexe 01). Après ensemencement, les souches sont incubées à 30°C pour une durée de 2 à 5 jours. Pour la lecture environ 1 ml de solution de Salkowsky (2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique) a été déposé sur les colonies en croissance, puis incubé à l'obscurité pendant 1 heure. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence d'AIA (Gordon et Weber, 1951).

8-3-2. Solubilisation des phosphates

Le pouvoir de solubilisation du phosphore des isolats a été testé sur du milieu gélosé de Pikovskaya (PVK) (Annexe 01) contenant du phosphate tricalcique Ca₃(PO₄)₂ selon la méthode de (Pikovskaya, 1948) et incubée à 30 °C pendant 2 à 7 jours. L'apparition d'une zone halo autour des colonies indique la solubilisation des phosphates.

8-3-3. Production d'ammoniac (NH₃)

La production de NH₃ est testée sur l'eau peptonée selon la méthode de Cappuccino et Sherman (1992). 100 µl de la culture bactérienne est inoculée dans les tubes contenant l'eau peptonée, puis à incubée à 30°C pendant 7 jours. L'addition de 500 µl du réactif de Nessler (Annexe 01) donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH₃.

8-3-4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN par les souches bactériennes a été testée sur milieu solide «King B» dans lequel on a ajouté de la glycine (4.4 g/l) selon la méthode de Lorck (1948). Du papier Whatman n°1 (90 mm de diamètre), imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) a été déposé à l'intérieur des boîtes de Pétri contenant la culture bactérienne. Ces dernières sont scellées au parafilm et gardées en position inversée dans l'étuve à 30°C pendant 4 jours. Les boîtes sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches HCN +. L'apparition d'une couleur orange à rouge traduit la production d'HCN par la bactérie productrice.

CHAPITRE 3

Résultats et Discussion

1- Etude des caractères cultureux et morphologiques

- Croissance sur YMA

Sur le milieu solide YMA, les colonies apparaissent avec une couleur blanche ou crème, de forme arrondie, convexe, lisse et elles ont une texture translucide, semi-translucide ou opaque. Les différentes souches ont bien poussé au bout de 48 heures d'incubation sauf la souche isolée P3 qui n'a pas bien poussé sur ce milieu. Les souches isolées M1 et M4 sont plus visqueuses par rapport aux autres souches. La viscosité des colonies est due à une production massive d'exopolysaccharides. Donc nos souches présentent les caractéristiques des rhizobia comme il a été décrit par Vincent (1970) et Jordan (1984) et Howieson et Dilworth (2016).

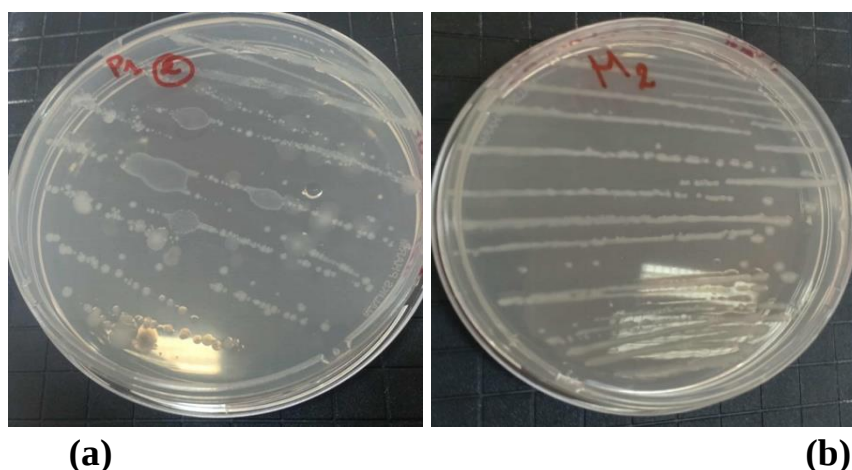


Figure 17: Croissance des souches isolées sur le milieu YMA

(a): Isolat de *Pisum sativum* **(b):** Isolat de *Melilotus*

- Croissance sur YMB

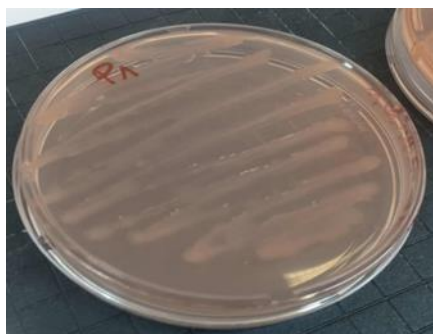
La croissance sur le milieu YMB après 24 à 48 heures, se traduit par l'apparition d'un trouble pour toutes les souches. Ce résultat est similaire avec les observations de Hewedy et al., (2014), qui ont rapporté une turbidité homogène dans le bouillon YMB.



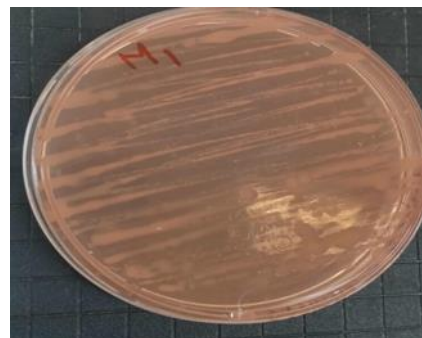
Figure 18: croissance des souches sur le milieu YMB

- **Croissance sur YMA-RC**

La croissance sur milieu YMA additionné de Rouge Congo apparaisse après 24 à 48 heures d'incubation. Nos résultats montrent que certaines souches absorbent bien de rouge Congo et certaines d'autres l'absorbent très peu et apparaissent avec une couleur légèrement rose. Howieson et Dilworth (2016) ont mentionné que bactéries nodulaires *Sinorhizobium* absorbent le rouge Congo. Ces observation sont trouvées chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent ; 1970).



(a)



(b)

Figure 19: Absorption du rouge Congo.

(a): souche *Pisum sativum* (b): souche *Melilotus*

- **Croissance sur GPA-BCP**

Après 48 heure d'incubation, on observe que les souches M2, M4 et P1 provoquent une modification du pH avec un changement de couleur du milieu du violet vers le jaune. Pour les souches M1, M3, P3 et P4 modifient très peu le milieu GPA-BCP et la souche P2 ne modifie pas le pH du milieu.

Il est bien connu que les *rhizobia* poussent faiblement ou pas du tout avec une faible variation de pH sur milieu GPA-BCP, bien que d'autres peuvent croître et acidifier le milieu (Vincent, 1970). Dans une étude antérieure, il a été bien documenté que les *rhizobia* sont incapables de se développer sur le milieu GPA+BCP (Somasegaran et Hoben, 1994), mais il y a des études qui contredisent cette dernière, parmi ces études ceux de Demissie et *al.*, (2018) et Küçük et *al.*, (2006) qui ont trouvé que les espèces rhizobiennes peuvent aussi bien pousser sur ce milieu ce qui indique que les *rhizobia* peuvent utiliser le glucose contenant dans le milieu comme seule source de carbone.

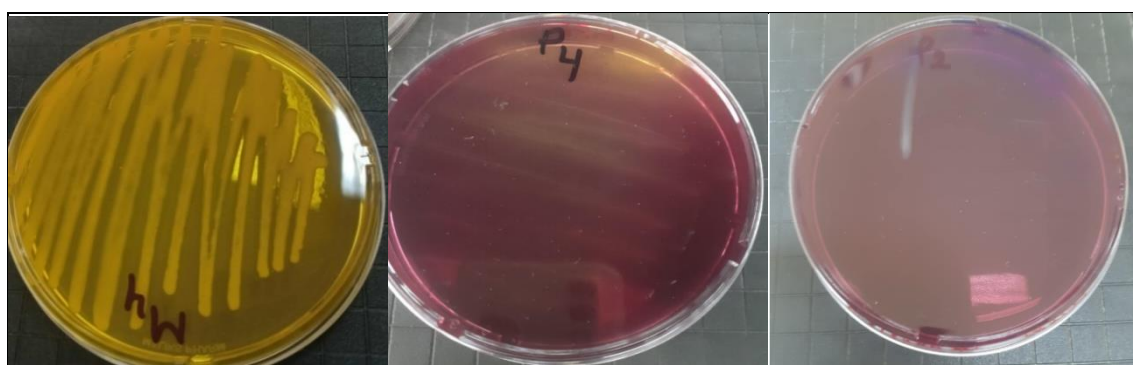


Figure 20: Croissance des souches isolées sur milieu GPA+BCP

- **Croissance sur YMA-BTB**

Dans cette étude, on note l'apparition des colonies avec virage du milieu vers le jaune pour les souches M2, M4, P1, P3, P4 ce qui indique une production d'acide estimée par l'indicateur de pH ceci confirme que les isolats croissent rapidement. Ces observations sont proches des résultats de Talukdar et *al.*, (2008) pour leurs études sur des souches de *Pisum sativum*. En revanche, le milieu reste vert chez les souches M1, M3 et P2, ce qui indique qu'il s'agit de souches à croissance lente.

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck et *al.*, 1993; Pagano, 2008).

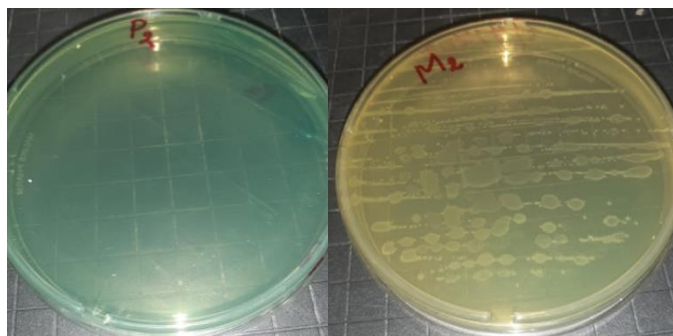


Figure 21: Croissance des souches isolées sur milieu YMA-BTB

2- Examen microscopique par coloration de Gram

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

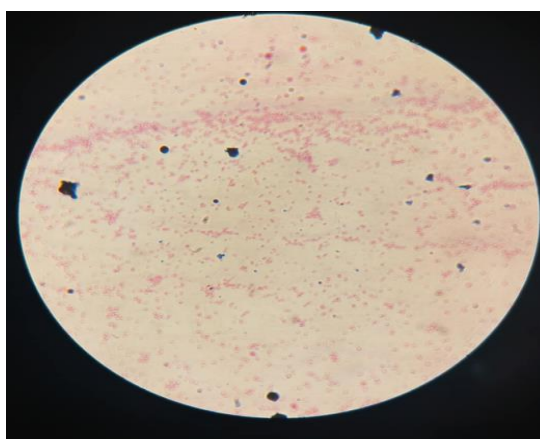


Figure 22: Observation microscopique des bactéries (Objectif X100)

Tableau 02: Caractères morphologiques des souches testés

Souches	Caractères des cellules		Caractères des colonies				
	Gram	Forme	Taille	Couleur	Elevation	Surface	Opacité
M1	Négatif (-)	Bâtonnet	Moyenne	Blanche	Elèves	Lisse	Translucide Opaque
M2	Négatif (-)	Bâtonnet	Petite	Blanche	Elèves	Lisse	Semi translucide
M3	Négatif (-)	Bâtonnet	Moyenne	Crème	Elèves	Lisse	Semi translucide
M4	Négatif (-)	Bâtonnet	Moyenne	Crème	Elèves	Lisse	Translucide Opaque
P1	Négatif (-)	Bâtonnet	Moyenne	Blanche	Elèves	Lisse	translucide
P2	Négatif (-)	Bâtonnet	Petite	Blanche	Elèves	Lisse	translucide
P3	Négatif (-)	Bâtonnet	Petite	Blanche	Elèves	Lisse	Semi translucide
P4	Négatif (-)	Bâtonnet	Petite	Blanche	Elèves	Lisse	Opaque

3- Détermination des activités des isolats

3-1- La fixation de l'azote

La croissance des bactéries sur un milieu de « Burk's N-free » dépend de leur capacité à fixer l'azote. Les résultats obtenus montrent que la majorité des isolats bactériens testés ont bien poussé sur ce milieu ce qui indique qu'elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces résultats sont proches des travaux d'Aouane et Hamani (2017).

3-2- Activités enzymatiques

3-2-1. Réduction des nitrates

Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase, la couleur du milieu a viré au rouge pour les isolats M1, M2, M3, M4, P1 et P4 ce qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites et pour le reste des isolats le milieu est toujours inchangé. Nous avons donc ajouté de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase, pour vérifier la présence des nitrates dans le milieu ou non. Après quelques minutes, l'apparition d'une teinte rouge pour les deux souches P2 et P3, signifie la présence des ions nitrites dans le milieu, donc le nitrate qui était dans les tubes n'a pas été réduit par la NI et la NII. Donc la bactérie ne possédait pas cet enzyme (c'est un résultat négatif (NR⁻)).

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (El-Hilali, 2006). La transformation des ions NO_3^- en ions NO_2^- dans les milieux biologiques, ne peut s'effectuer que sous l'action de l'enzyme nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (Idrissi, 2006).

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et Leyral, 2006). De plus, la variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents *Rhizobia* (Zahran, 1991). En plus, Munns (1968) a indiqué que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des *Rhizobia* aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective.

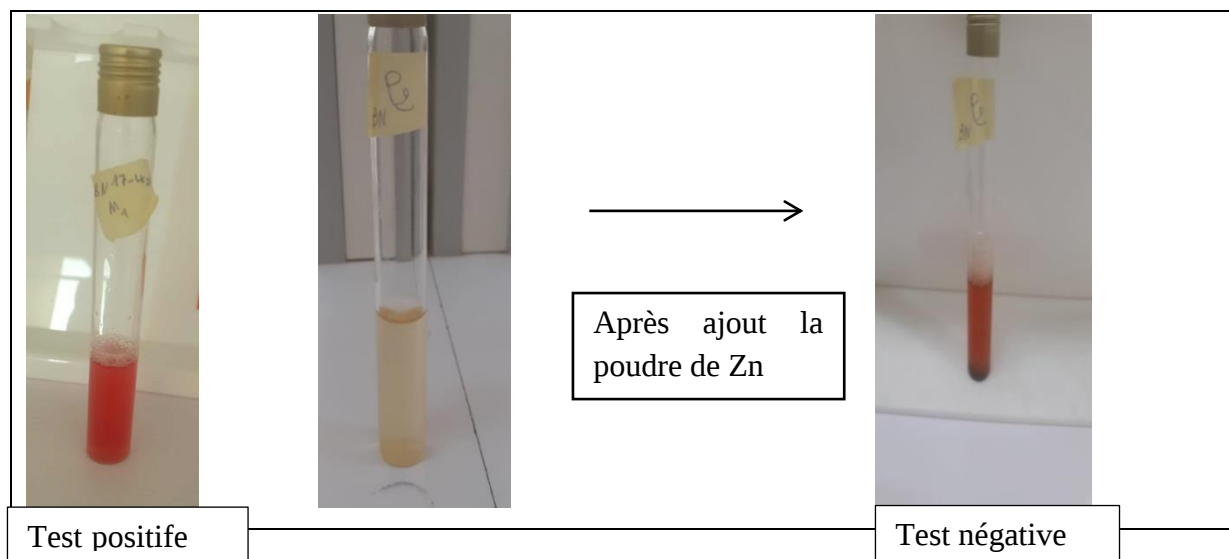


Figure 23: Réduction des nitrates

3-2-2. 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 incubation pendant 48 heures on a observé l'absence de l'activité uréasique chez toutes les souches. Cette absence de l'enzyme a été également observée chez les isolats de Baaziz et Betchine (2013) isolés à partir des nodules du pois fourrager.



Figure 24: Résultats de test hydrolyse de l'urée

3-2-3. Cellulase

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer le cellulose, l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies indique la présence d'une

endoglucanase (cellulase). Tous les isolats ont présenté une réaction négative sauf les souches M1 et M4 qui ont présenté le résultat positif.

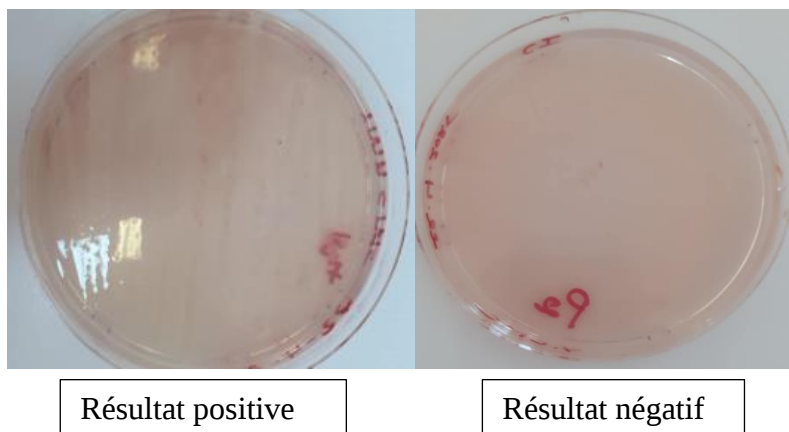


Figure 25: Activité cellulosique

3-2-4. Pectinase

L'activité pectinolytique a été déterminée sur gélose à la pectine. Après 48 heures d'incubation à 30 °C. Un halo clair autour des colonies indique une activité pectinolytique. Les différents isolats ont montré une activité pectinase négative, comme en témoigne l'absence de halo autour des colonies, à l'exception des souches M3 et M4, qui ont montré un résultat positif.

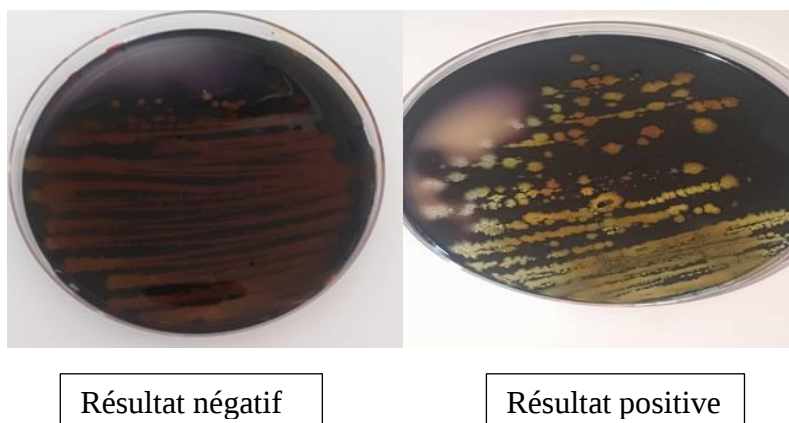


Figure 26: Production de pectinase

Les espèces de *Rhizobium* sont connues pour produire des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques pouvant dégrader les liaisons glycosidiques présentes dans la paroi des cellules végétales, et ces enzymes sont essentiels pour l'infection initiale des racines hôte de légumineuses (Shengwei et al., 2012), facilitent aux *Rhizobium* de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et al., 1992). Les enzymes pectinase, cellulase et amylase jouent un rôle dans la prévention de l'infection des plantes par les agents

pathogènes. Les pectinases sont un groupe d'enzymes connues pour catalyser les matières pectineuses par réaction de dépolymérisation, et sont produites en grande proportion (Reetha et *al.*, 2014).

3-2-5. Oxydase

Tous nos isolats étudiés sont oxydase positifs à l'exception des souches M1 et M3 qui sont oxydase négatif. Le *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobie (Werner., 1992 ; Benguedouar., 2000).

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).

3-2-6. Catalase

Pour l'enzyme catalase, toutes les souches étudiées présentent un résultat positif. La présence de la catalase est l'une des caractéristiques clés des souches de *Rhizobium* (Vincent, 1981). Il joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres toxiques qui sont générés en particulier sous l'effet du stress environnemental (Hannachi H, 2019).



Figure 27: Résultats de test des catalase et oxydase positive

Tableau 1: Résultats des tests enzymatique

Isolats	P1	P2	P3	P4	M1	M2	M3	M4
Tests								
Nitrate réductase	+	-	-	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Activité cellulolytique	-	-	-	-	+	-	-	+

Activité pectinolytique	-	-	-	-	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	-	+	-	+

+ : activité enzymatique positive ; - : activité enzymatique négative

3-3- Effet PGPR (Plant Growth Promoting *Rhizobacteria*)

3-3-1. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La capacité de la production de l'AIA testée sur milieu TSA démontre que nos souches ont développé une coloration rose après l'addition du réactif de Salkowski (Figure 28). Cette couleur est le résultat de la réaction entre l'acide indole acétique synthétisé par les souches et le réactif de Salkowski.

La production phytohormone (en particulier l'AIA) est l'un des mécanismes directs les plus importants utilisés par les bactéries pour augmenter la croissance et la productivité, car cette hormone végétale coordonne divers processus de développement chez les plantes (Ali et *al.*, 2008).

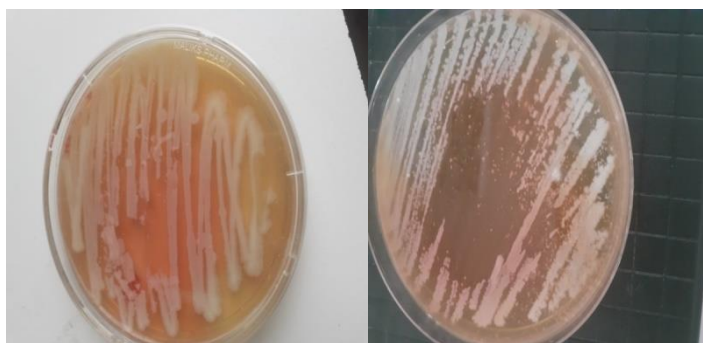


Figure 28: Production d'AIA par isolats bactériens

3-3-2. Solubilisation des phosphates

La capacité des différentes bactéries isolées à solubiliser le phosphate a été étudiée sur milieu PVK solide. L'apparition d'une zone de solubilisation autour des colonies a été observée chez tous les souches testés.

La solubilisation du phosphore se produit comme conséquence de l'action des acides organiques de faible poids moléculaire synthétisées par les bactéries, et qui se traduit par la formation d'un halo autour de la colonie (Zaidi et *al.*, 2009).



Figure 29: Halo de transparence autour de la colonie

3-3-3. Production d'ammoniac (NH_3)

Après incubation à 30°C pendant 7 jours de l'eau peptonée inoculée avec les suspensions bactériennes des isolats, et après addition du réactif de Nessler. Un précipité jaune-brun s'est formé pour tous les isolats, indiquant la production d'ammoniac.

La production d'ammoniac par les bactéries est l'un des mécanismes impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (Kavitha et *al.*, 2013). Cette production est considérée comme un facteur crucial chez les rhizobactéries, car elle améliore indirectement la croissance des plantes (Joseph et *al.*, 2007). L'ammoniac fixé est assimilé en glutamate et glutamine qui sont importants pour former des composés azotés organiques dans les cellules telles que les acides aminés, les acides nucléiques, les protéines, etc. Après la mort bactérienne et la lyse, ces composés sont rejetés dans l'environnement et utilisés comme sources d'azote par d'autres organismes tels que les plantes (Hartono et *al.*, 2016).

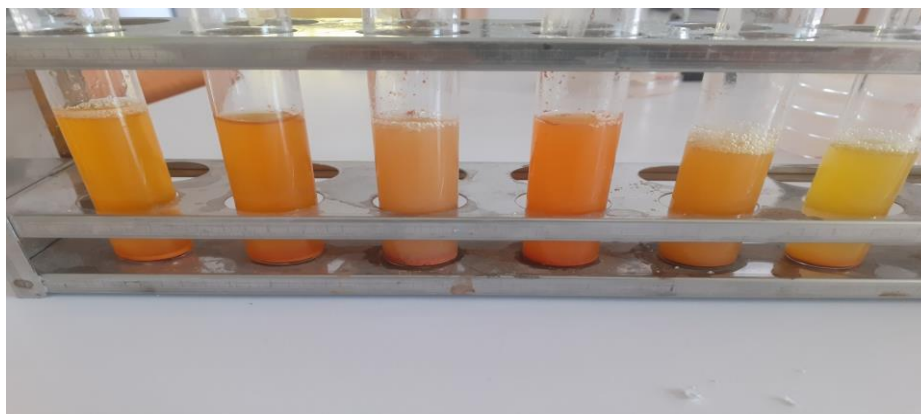


Figure 30: Production d' NH_3

3-3-4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La couleur jaune du papier Whatman imprégné d'acide picrique changée vers marron orangé indiquant la capacité de produire du HCN. La production est faible chez P2,P3,M2 ,M1 tandis qu'elle est forte chez P1,P4, M3, par contre la souche M4 n'a pas la capacité production HCN.

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire volatile qui inhibe la croissance et le développement des microorganismes. Cet acide (HCN) produit par les bactéries provenant de la rhizosphère joue un rôle primordial et important dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Siddiqui et *al.*, 2006).

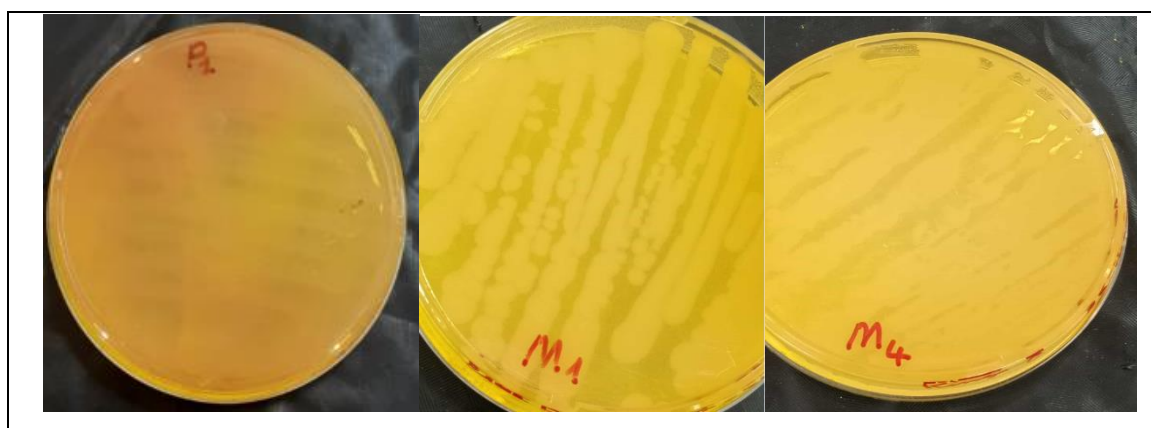


Figure 31: Production d'HCN

Conclusion

Conclusion

Dans la rhizosphère peuvent cohabiter différents microorganismes qui interfèrent avec la plante. Parmi ces microorganismes, il existe les bactéries du sol du genre *Rhizobium* qui peuvent également avoir un effet bénéfique sur la plante.

Dans cette étude nous avons essayé de déterminer le rôle des bactéries nodulant les légumineuses dans le sol.

Le travail de recherche commence par la collecte des nodules des espèces légumineuses situées dans la région de Guelma *Pisum sativum* et *Melilotus*.

Pour avoir des bactéries nodulant les légumineuses, nous avons effectué un isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés. Les isolats obtenus ont subi une étude morphologique et culturale sur des milieux de culture spécifiques suivi d'un examen microscopique par coloration de Gram.

Le rôle des BNL est déterminé par plusieurs tests qui démontrent les activités de ces bactéries dans le sol et leurs effets sur la relation symbiotique. Nous avons effectué le test de la fixation d'azote, des tests pour la recherche des enzymes spécifiques (nitrate réductase, cellulase, pectinase, uréase, catalase et oxydase) et des tests pour voir l'effet PGPR de ces bactéries (production d'ammoniac, production des phytohormones, solubilisation du phosphate, et production de cyanure d'hydrogène).

Les résultats de l'étude morphologique montrent que nos isolats possèdent l'aspect morphologique des *Rhizobia* avec des cellules bâtonnet à Gram négative et des colonies blanchâtres et crémeuses avec des bords réguliers. La croissance sur milieu YMA- RC montre que les souches absorbent le rouge Congo mais avec une différence dans l'absorption et certaines souches modifient le pH sur GPA-BCP. Pour la vitesse de croissance sur le milieu YMA-BTB les résultats démontrent que les isolats sont classés dans le groupe des bactéries à croissance rapide.

Les résultats obtenus sur milieu Burk's N-free montre que nos souches sont aptes pour fixer l'azote atmosphérique. Pour les tests enzymatiques nous avons trouvé que les souches bactériennes possèdent des enzymes spécifiques nécessaires à la relation symbiotique et des enzymes utilisés dans le bio contrôle.

La solubilisation du phosphate tricalcique et la production d'ammoniac a été constatée pour tous les isolats, soulignant leur potentiel à améliorer la croissance des plantes. La production d'HCN, un composé important pour la suppression des agents pathogènes fongiques, varie selon les isolats, la majorité présente une production forte. Certaines souches possèdent également la capacité de synthétiser une phytohormone appartenant à la famille des auxines (AIA).

Ce travail est une contribution à l'étude d'un groupe de bactéries du sol et leur rôle écologique et agricole. Ce travail pourra être complété par d'autres études citons :

- Élargir l'étude des micro symbiotes associés à d'autre plantes légumineuses de l'Algérie.
- Élargir l'étude sur l'amélioration de la qualité des plantes par les PGPR.
- Poursuivre les recherches sur la diversité, l'écologie et les applications des BNL
- Intensifier les efforts pour garantir une utilisation optimale des BNL en agriculture.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

A.D. Gernand, K.J. Schulze, C.P. Stewart, K.P.W. Jr Micronutrient Deficiencies in Health Effects and Prevention Nat. Publ. Gr. (2016), 10.1038/nrendo.2016.37.

Aoune maroua et Hamani Hanen (2017). Etude des PGPR “Plant Growth Promoting rhizobacteria” des plantes actinorhiziennes : cas de *Casuarina equisetifolia* et d'*Elaeagnus angustifolia* Faculté des sciences de la nature et de la vie UFM Constantine 1.

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 .en vues de l’obtention du diplôme de doctorat–es- sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen, page 43.

Afzal A, Bano A. (2008). Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticuma estivum*). International Journal Of Agriculture & Biology, 85-88

Ahemad M. & Kibret M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science, 26 (1): 1 20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001> .

Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K., Hasnain, S., 2008. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. Lett. Appl. Microbiol. 48, 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>

Arora, N.K., Tewari, S., Singh, R. (2013). Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In: Arora NK (ed.)

Arbeille S, D'Ersu V G, et Koenig O (2000) Toutes les fleurs de Méditerranée. Edition Delachaux et Niestle S A, Lausanne, Paris.

Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah et S. Meon (2009). Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.* , 8 : 1247-1252.

B

Baaziz H et Betchine K., (2013). Isolement et Caractérisation phénotypique des bactéries, Nodulant la légumineuse *Pisum sativum* L., isolées après piégeage et sans piégeage du sol de la plante. Mémoire de Master : Option de Microbiologie : Université Mentouri Constantine. 101p.

Barassi C.A., Ayrault G., Creus C.M., Sueldo R.J., Sobero M.T., Seed inoculation with *Azospirillum mitigates* NaCl effects on lettuce. *Sci Hortic*, 2006, 109, 8–14.

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

Benguedouar A., 2000: Etude de la symbiose *Rhizobium- Hedysarum coronarium*: essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium "hedysari"*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.

Benhalima-Chenini, Mounira., 2006.Essai de caractérisation de quelques isolats de *Rhizobium* nodulant le pois chichi (*Cicer arietinum* L.).Mémoire de Magister en Science Agronomiques. Institut National Agronomique. El Harrach. 111p.

Benkahoul ,M., Talhi, A., Boulefkhad, M; 2017. Bactéries des environnements chauds Algériens : isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. Sciences & Technologie, N°45, pp.25-35.

Binenbaum J, WeinstainR,Shani, E. (2018). Gibberellin localization and transport in plants. Trends Plant Sci. 23: 410–421.

C

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

Cappuccino, J. C. et N. Sherman (1992). Microbiology: A Laboratory Manuel, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.

Chabbi R., 2010. -Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella*L (légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister. Université Mentouri .Constantine. Algérie.p.126.

Chaitanya, K.S, Meenu.2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) : à review.E3 J of Agricultural Research and Development 5: 0108-0119

Crossman L.C., 2004. Plasmid replicons of *Rhizobium*. Biochemical Society Transactions Volume 33, part 1.

D

Dardanelli M., Angelini J. and Fabra A. 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. Canadian journal of microbiology 49: 399-405.

Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. INRA, Paris. P 384.

de Lajudie, P. M., & Young, J. P. W. (2017). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* Minutes of

the meeting, Budapest, 25 August 2016. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2485-2494. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002144>

Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche des bactéries et de levures-moisissures. TEC & DOC, p: 269-411.

Demissie, N., Degefu, T., Ergena , A., et Ojiewo, C. (2018). phenotypic characterisation of rhizobial and non-rhizobial isolates recovered from root nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in Ethiopia. *Afr.J.microbiol Res* vol 12 (4).

Dénarié J., Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000

Deshwal V K, P Pandey, S C Kang & D K Maheshwari (2003) .Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi *Indian Journal of Experimental Biology* Vol. 41, October 2003, pp. 1160-1164

Deulvot, C. Charrel, H. Marty, A. Jacquin, F. Donnadieu, C. Lejeune-Hénaut, I. Burstin, J. Auber, T.G. 2010. Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea *BMC Genomic*, 11: 468

Domergue O. (2017). Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France. Thèse de doctorat, Université de Montpellier.

Dupuy Y.et Nougier P., 2005. Les microorganisms. Du gene à la biosphere. Edition Ellipses. Paris

E

Egamberdieva D., Kucharova Z., Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biol Fert Soil*, 2009, 45, 563–571.

El Hilali I., 2006. La Symbiose Rhizobium-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez *Lupinus- luteus*. Thèse de Doctorat : Microbiologie et Biologie moléculaire. Université Mohamed V-AGDAL.Rabat.189p.

Esseling J.J., Lhuissier FGP. and Emons AMC. 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.

F

Faghir M. 2012.Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse de Doctorat en Agro-physiologie et Microbiologie des symbioses, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc, 111 p

Ferreira, C. M. H., H. M.V.M. Soares et E. V. Soares (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Sci. Environ.*, 682: 779–799.

Fortin, J.A. Plenchette, C et Piché, Y., 2008. Les mycorhizes : la nouvelle révolution verte. Québec, Edition Multi Mondes. 138p.

Franche, C., Lindstrom, K., and Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321, (1-2), 35- 59 (cité in boukaous en 2020)

G

Gage D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.

Gauri, Singh A.K., Bhatt R.P., Pant S., Bedi M.K., Naglot A. 2011. Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of Trifolium alexandrium. *int.j.a.t.* 7(6) : 1705-1723

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 Master en Génétique Moléculaire. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p128.

Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. 42: 413–441.

Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications Hindawi Publishing Corporation, Scientifica vol 2012. Article ID963401. p 15.

Gordon, S. A. et R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.*, 26:192–195. these set AIA

Goswami, D., J. N. Thakker et P. C. Dhandhukia (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.*, 2(1): 1-19. *nvironment, Agriculture Biotechnology*, 2: 238-708.

Graham PH. 1964. Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek*. 30: 68-72.

Gupta G., S. S. Parihar, N. K. Ahirwar, S. K. Snehi et V. Singh (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.*, 7(2): 96-102.

Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B. et Tewari, R., 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis Miller. Microbiological Research 167: 3583 363.

H

Haddad, S., Hanane, S., Houhamdi, M. (2015). La reproduction de l'hirondelle rustique (*Hirundo Rustica*) dans un milieu urbain nord-africain: quel impact des conditions climatiques et de l'application des insecticides?. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, 70(3), p. xxx-xxx.

Hannachi Hafsa-Sara ,Bentahar ,Maria (2019) . Analyse phénotypique du partenaire symbiotique de la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L. Diplôme de Master en Ecologie microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine

Hartono, H., Nurfitriani, Fais, A., Harniyati, C., Nur, I.H. & Muhammad, J. (2016). ability of ammonium excretion, indol acetic acid production, and phosphate solubilization of nitrogenfixing bacteria isolated from crop rhizosphere and their effect on plant growth. ARPN journal of Engineering and Applied Sciences 11(19): 11735-11741.

Heijden mga van der , bardgett rd, van straalen nm.(2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11: 296–310

Hewedy, O. A., Eissa, R. A., Elzanaty, A. M., Nagaty, H. H. et Abd Elbary, M. I. (2014). Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia nodulating Faba bean from various Egyptian locations. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(5), 1.

Holt, J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. pp: 95-97. 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore

Hopkins W.G., 2003 : *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119

Howieson J.G., et Dilworth M.J. (2016): Workingwith Rhizobia; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale: 312

J

Jindo, K, L.P. Canellas, A. Albacete, L.F. Dos Santos, R.L. Frinhani Rocha, D.C. Baia, N.O. Aguiar Canellas, T.L. Goron, F.L. Olivares, Interaction between humic substances and plant hormones for phosphorous acquisition, *Agronomy* 10 (2020), <https://doi.org/10.3390/agronomy10050640>.

Joffin J. N & Leyral G. (2006). Microbiologie technique, 2ème Ed, Collection Biologie technique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux. 304p.

Joo, GJ., SM. Kang, M. Hamayun, Na. CI. Kim, DH. Shin et IJ. Lee (2009). *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J Microbiol.* 47:167–171.

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

Joseph, B., RR. Patra et R. Lawrence. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141 -152.

K

Kavitha T., Nelson R. et Jesi S.J. (2013). Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*, *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4: 177-186.

Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. (2009-a). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch Agron Soil Sci*, 56: 73 - 98.

Korir.H, N.W. Mungai, M. Thuita, Y. Hamba, C. Masso Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil *Front. Plant Sci.*, 8 (2017), pp. 1-10, 10.3389/fpls.2017.00141.

Kouakou R. F. (2011). Diversite genetique des rhizobia associes à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* I.). Mémoire. Yamoussoukro

Krajinski, F. Cubero, J.I. Rubiales, D. 2011. Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Mycosphaerella pinodes* in pea using microarray technology. *BMC Genomics*, 13: 12-28.

Kucuk, C., Kivanc , M., et Kinaci, E. (2005). characterization of *Rhizobium* sp isolated Bean *Turk.J.biol*, pp 127-132.

Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A.(2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304: 35- 44

Kumar P. & Dubey R.C. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of CurrentPerspectives in Applied Microbiology*, 1: 6-38.

L

Laouar, Amina. 2013. Importance des plantes médicinales dans les agrosystèmes cultivés dans la région de Ouargla (Synthèse bibliographique). Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah, Ouargla. Algérie. 96p.

Lim t.k (2012). *Vicia faba*. Fruits. 2 :925-936

Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*: 142-146.

M

M. I. Oshtrakh • A. Kumar • I. V. Alenkina • A. P. Zakharova • V. A. Semionkin • S. Kundu 2013 Characterization of monomeric soybean leghemoglobin using Mossbauer spectroscopy with a high velocity resolution Hyperfine Interact DOI 10.1007/s10751-013-1001-8

M. Tariq, A. Khan, M. Asif, F. Khan, T. Ansari, M. Shariq, M.A. Siddiqui, Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management, *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci* (2020) 507–524, <https://doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262>.

Ma, J. F. 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Crit.Rev. Plant Science*, 24: 267-281.

Madigan M. et J. Martinko (2007). Brock, Biologie des microorganismes. 11e Edition. Person Education France. pp. 599-601, 676-681

Marco E. Mng'ong'o ,Fredrick Ojija ,Becky . Aloo The role of Rhizobia toward food production, food and soil security through microbial agro-input utilization in developing countries Case Studies in Chemical and Environmental Engineering 8 (2023), 100404

Mateos P.F., Jose I., jimenez-zurdo., jin chen., Squartini A., Haack S.K., Martinezmolina S., Hubbell D.H., Dazzo F.B., 1992 : *Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in Rhizobium leguminosa Biovar Trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 58, N°6, pp 1816-1822.

Mendes. R, P. Andrea, E. Diaz, L. Lana, B. Lobo, Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane : Characteristics and Applications, vol. 4, 2020, pp. 1–15, <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>.

Munns, D.N. (1968). Nodulation of medicago sativa in solution culture: Iii. effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant and Soil*, 33 - 47.

N

Nannipieri, P., Ash er, J., Ceccherni, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 54 (4): 655- 670.

Ndoye, Ibrahima., 1990. contribution a l'étude de la symbiose entre Azorhizobium, Rhizobium et Sesbania rostrata. Th. Doct. Université des Sciences et Techniques de Lille. p.188.

Numan, M., S. Bashir, Y. Khan, R. Mumtaz, Z. K. Shinwari, A. L. Khan, A. Khan, A. AL-Harrasi (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiol. Res.* , 209: 21–32.

Nyabyenda,P.2005. Les plantes cultivées en région tropicales d'altitude d'Afrique. Les presses agronomiques de Gembloux, 225 p

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.

Park, M., Kim, C., Yang J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., et al. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res* 160(2) : 127-133.

Parmar P. & Sindhu S.S. (2013). Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3: 25- 31.

Patil, A., A. Kale, G. Ajane, R. Sheikh et S. Pati (2017). pp: 105-134. In: *Rhizobium Biology and Biotechnology, Soil Biology*. Hansen *et al.* (Eds.). Springer International Publishing.

Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. and Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 234: 201-62

Pelmont J. 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541-572

Perry J.J., Stalex J.T. et Lory S. 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France.

Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17: 362-370.

Prioul, s. Frankewitz, a. Deriot, g. Morin, g. Baranger, a. 2004. Mapping of quantitative trait loci for resistance to mycosphere pinodes in pea (*pisum sativum*), at the seedling and adult plant stage. *Theor appl genet*, 108: 1322-1344

Q

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

R

R. Hayat, S. Ali, U. Amara, R. Khalid, I. Ahmed, Soil benefiial bacteria and their role in plant growth promotion: a review, *Ann. Microbiol.* 60 (2010) 579–598, <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>.

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

Reetha.S, G. Selvakumar, G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan, T. Ravimycin 2014Screening of Cellulase and Pectinase by Using Pseudomonas fluorescence and Bacillus subtilis 10.18052/www.scipress.com/ILNS.13.75 International Letters of Natural Sciences Vol. 13 (2014) pp 75-80 Department of Botany, Annamalai University, Annamalai Nagar - 608 002, India

Reeve, W., P. Chain, G. O'Hara, J. Ardley, K. Nandesena, L. Bräu, J. Howieson (2010). Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419. *Standards in Genomic Sci.*, 2(1): 77–86.

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

Rubio LM., Ludden PW., 2005. -Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle.

Ruiz-Diez, B., S. Fajardo, M. A. Puertas-Mejia, M. del Rosario de Felipe et M. Fernandez-Pascual (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain.*Arch. Microbiol.*, 191: 35-46

S

Saidi Samira (2021) Amélioration de la symbiose *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* après co-inoculation par des Actinobacteria. Effets bénéfiques sur les paramètres de croissance sous stress salin diplôme de doctorat en sciences. Université ferhat abbas sétif 1

Schneider, A. et Huyghe C. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Paris : Quae. p: 81-136

Schwyn, B. et J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.*, 160: 47-56..

Selami, Nawel., 2015. Etude des associations symbiotiques de *Retamamonosperma*: approches morphologique, anatomique et ultra structurale, caractérisation moléculaire des isolats. Thèse de doctorat en Sciences. Université Mohamed Boudiaf. Oran. Algérie. p.150.

Siddiqui, I. A., et al. (2006). "Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(6): 641 -650.

Singh, S., & Varma, A. (2017). Structure, function, and estimation of leghemoglobin. In A. P. Hansen, D. K. Choudhary, P. K. Agrawal, & A. Varma (Eds.), *Rhizobium biology and biotechnology* (pp. 309–330). Springer

Skerman P J (1982). Les légumineuses fourragères tropicales. Edité par Food & Agriculture Org (FAO), p : 40-49.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Quantifying the growth of rhizobia. In *Handbook for rhizobia*, pp. 47-57

T

Talukder, M., Solaiman , A., Khanam, D., et Golan Rabbani, M. (2008). Characterization of some *Rhizobium* isolates and their effectiveness on pea. *Bangladesh J Microbio*, vol 25 n°1, pp 45-48.

Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K. 2006. *Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development.* *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847–859

Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. ; et Luo, Y., (2015). *Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils.* In: *Frontiers in Plant Science*, P : 6 (FEB)

Torche A. (2006). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magistère. Université de Mentouri. Constantine.

Tourte, Y., M. Bordonneau et M. Henry (2005). Le monde des végétaux - Organisation, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France

V

Vincent J. M. (1982). Nitrogen fixation in legumes. Academic Press Australia

Vincent, J. M. (1970). *The manual for the practical study of root nodule bacteria.* Oxford, United Kingdom : Blackwell Scientific Publication Ltd.

W

Wajcman, H. et L. Kiger (2002). L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme: un motif structural unique, des fonctions multiples. 325(12) :1159-1174. Edition Scientifique et médicale Elsevier SAS.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. Cellular Microbiology, 14(3), 334-342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>

Wang, J., R. Li, H. Zhang, G. Wei et Z. Li (2020). Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiol.*, 20 (38): 1 -12.

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

Wery, J. (1985). Relation entre la nutrition azote et la production chez les légumineuses. In: nutrition azotée des légumineuses. Ed. INRA, Paris. 213p.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52: 487-511.

Wilson, P.W. & Knight, S.C. (1952). Experiments in bacterial physiology Minneapolis, Minn: Burgess Publishing Co, USA, pp.

Y

Yildirim E., Taylor A.G., Effect of biological treatments on growth of bean plants under salt stress. *Ann Rep Bean Improv Coop*, 2005, 48, 176–177

Z

Zahran, H.H. (1991). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1): 73 - 80.

Zaidi A, Ahmad E, Khan M S, Saif S, Rizvi A.(2015). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. In: *Scientia Horticulturae*. Septembre 2015. Vol. 193: 231 -239.

Zaidi, A., Khan, MS., Ahemad, M., Oves, M., Wani, PA. et al. (2009). Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. In: Khan MS, et al. editors. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp.23-50.

Annexe

Annexe 01 :

Milieux de culture et solutions utilisées

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

Mannitol	10.00g
K ₂ HPO ₄	0.50g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20g
NaCl	0.10g
Extrait de levure	0.50g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

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

YMB	1000ml
Agar	15g
pH	6.8

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA+Rouge Congo en g/l

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

Autoclavage à 120 °C 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	15g

pH 6.8

Autoclavage à 120 °C 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 de bromocrésol g/l(Vincent, 1970)

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

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

Composition de milieu nitrate réductase en g/l.

Nitrate	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Milieu Burk's N-free

Phosphate de potassium monobasique	0,4g
Phosphate dipotassique	0,5g
Sulfate de sodium	0,05g
Chlorure de calcium	0,2g
Sulfate de magnésium	0,1g
Sulfate de fer	0,005g
MolybDate de sodium	0,003g
Agar	15g

pH 7,00

Stérilisation à 120°C pendant 20 min

Milieu Pikovskaya (PVK)

Glucose 10g

Extrait de levure 0,5g

Phosphate Tricalcique 5g

Sulfat ammonium 0,5g

Sulfat de magnésium 0,1g

Chlorure de potassium 0,2g

Eau distillée 1000ml

Agar 15g

pH 7,00

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA+CMC en g /l

YMB 1000ml

Solution CMC 10ml

Agar 15g

pH 6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 min.

Après l'ajustement de Ph on ajoute 10ml de CMC (0.25g CMC dans 100ml d'eau distillé), puis on ajoute l'agar.

Milieu Pectine Agar

Pectine 5g

Extrait de levure 5g

Agar 20g

Eau distillée 1000L

pH 7

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Milieu King B ;

King B	38g
Glycerol	10ml
Glycine	4,4g
Eau distillée	1000ml
pH	7

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Eau peptonée :

Eau peptonée tamponnée	16,09g
Eau distillée	1000ml
pH	7

Stérilisation à 120°C pendant 20 min

Milieu Trypticase soja agar

TSA	48g
Eau distillée	1000ml
pH	7.3

Stérilisation à 120°C pendant 20 min

Les Solution :**Chlorure de mercure acidifié 0.1%**

Hg Cl ₂	1g
HCl	5 ml
Eau distillée	1000ml

Solution rouge congo

Rouge congo	0,25g
Eau distillée	100ml

Solution BTB

BTB	0.5g
Alcool	100ml

Solution BCP

BCP	1g
Ethanol	100ml

Réactif Nesler

KI	7g
HgCl ₂	10g
NaOH	4g
Eau distillée	100ml

Solution salkowski

FeCl ₃	4,06g
HclO ₄	75ml
Eau distillée	75ml

Solution rouge congo

Rouge congo	0,2g
Eau distillée	200ml

Solution NaCl

Na Cl	11,688g
Eau distillée	200ml

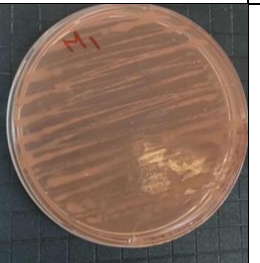
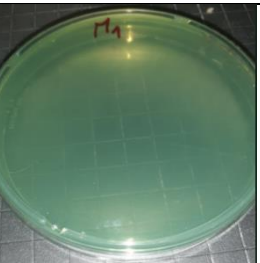
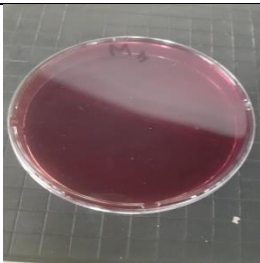
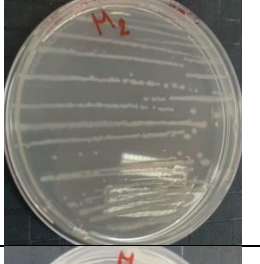
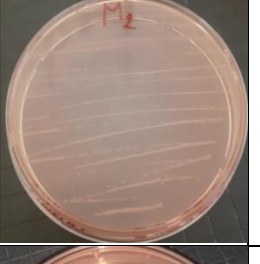
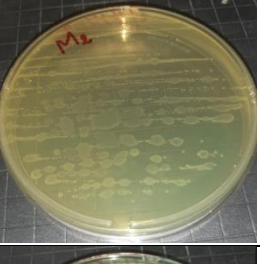
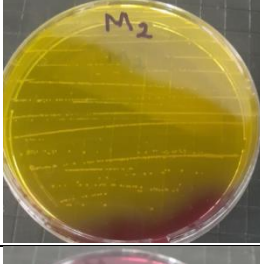
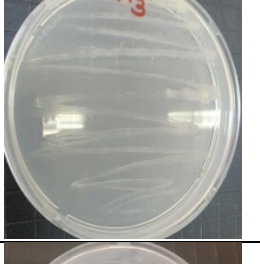
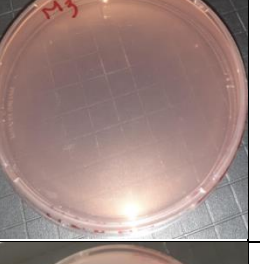
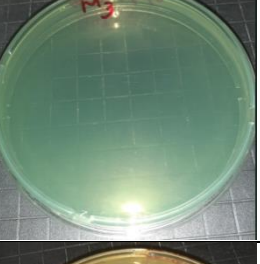
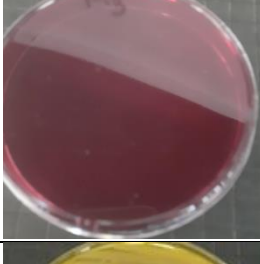
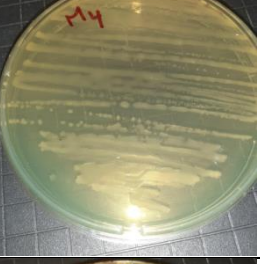
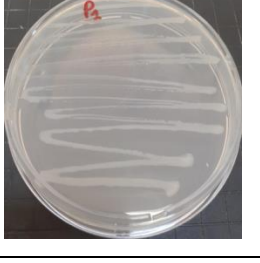
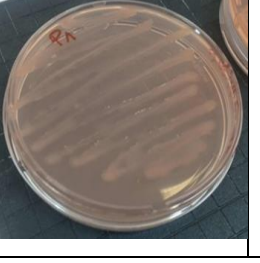
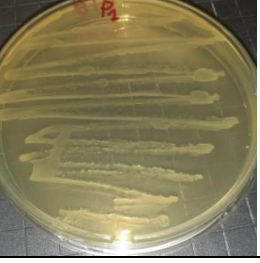
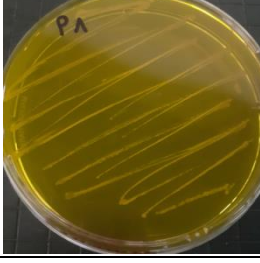
Solution picrate de sodium

Acid picrate	100ml
Carbonate de sodium	0,48g

Annexe 02:

Tableaux des différents résultats

Tableau a: Résultats de étude des caractères cultureux et morphologiques

Souche	YMA	YMA+RC	YMA+BTB	GPA+BCP
M1				
M2				
M3				
M4				
P1				

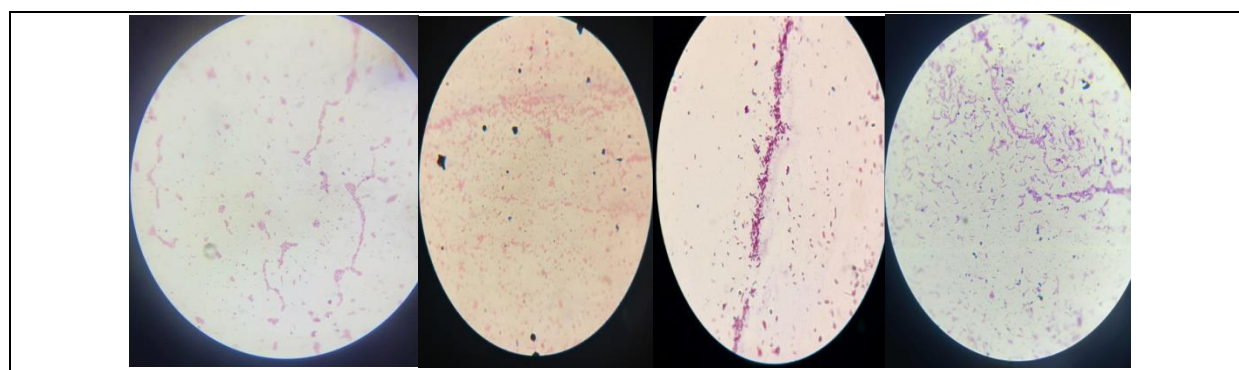
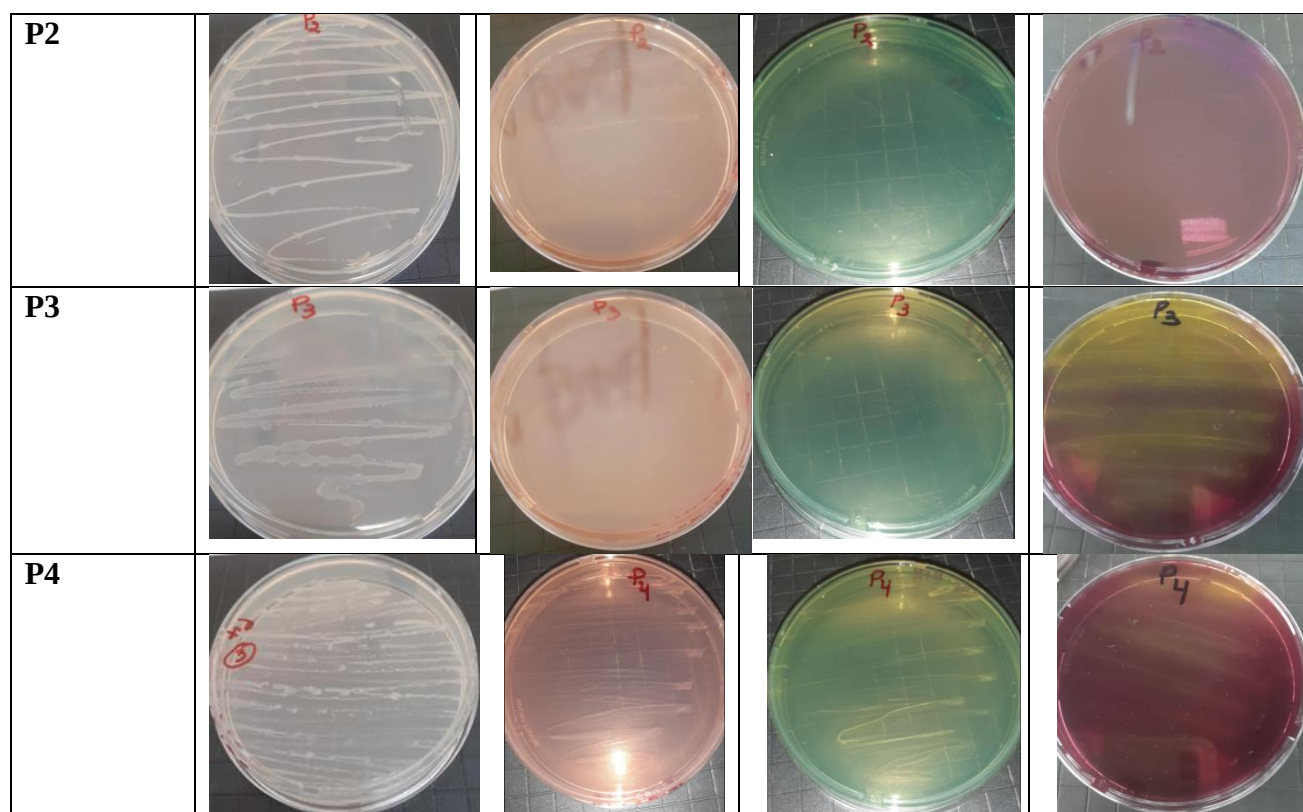
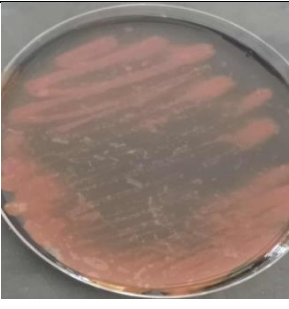
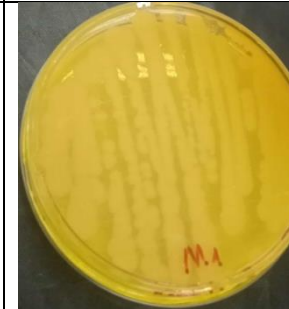
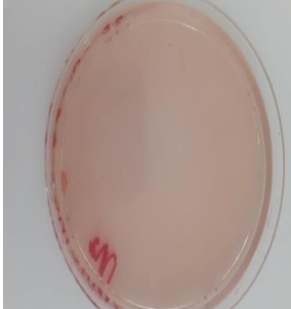
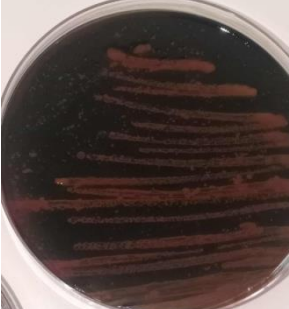
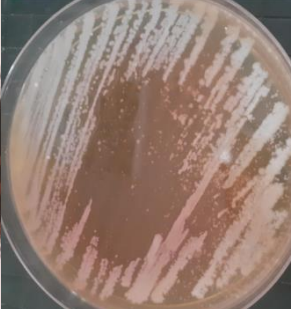
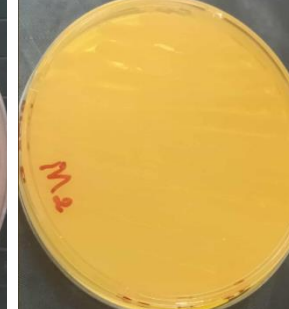
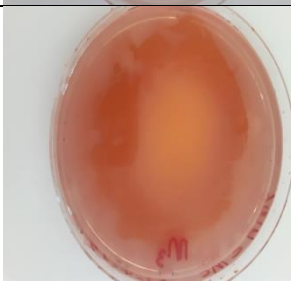
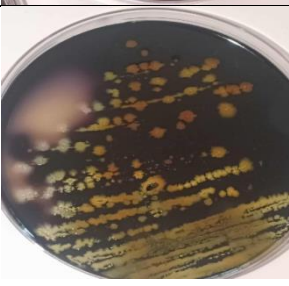
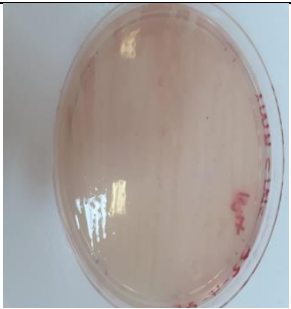
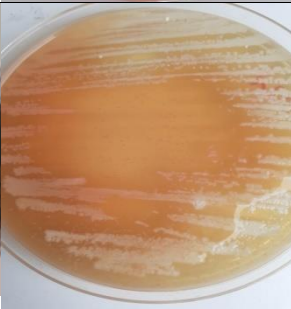


Figure a : résultats Observation microscopique des bactéries (Objectif X100)

Tableau b: Résultats des Différents activités des isolats

Souche	Cellulase	Pectinase	AIA	HCN
M1				
M2				
M3				
M4				
P1	