



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

**L'effet des facteurs abiotiques sur le contenu Nodulaire d'une
espèce fourragère *Hedysarum pallidum* Defs., poussant dans
deux régions différentes**

Présenté et soutenu par : *Mahfouf Oussama*

Le : 12/06/2016

Boukhiet Issam Eddine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Alatou.Radia (Maitre de conférences - UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Benhizia.Yacine (Professeur - UFM Constantine).

Examinatrice : Mme Riah nassira (Maitre de conférences - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Nous remercions notre grand Dieu ALLAH El karim le tout puissant qui nous a guidés, aidé pour réussir nos études et pouvoir réaliser ce travail

Nous remercions nos chers parents pour leurs amour, soutien et conseilles.

Durant cette période on a en l'occasion de travailler avec professeure Y.Benhizia du laboratoire d'écologie microbienne qui nous a honorés en acceptant de nous encadrer et nous proposé le sujet de mémoire.

Professeure Y.Benhizia, on ne peut que vous saluer pour votre rigueur, dynamisme, motivation, efficacité, discernement, précision, discipline, générosité et disponibilité.

Nous remercions Dr Boukous .L vous nous avez fournie la solution la mieux adapté à nos besoin grâce a vos connaissances et expérience aussi riche. On vous remercie pour notre générosité et disponibilité.

Sans oublier de remercier nos collègues chaque un en son noms (promotion D'ÉCOLOGIE MICROBIENNE 2015-2016)

Et de ma part Mahfouf Oussama je tiens à remercier mon ami Boukheit Issam Eddine que durant cette période j'ai eu le grand plaisir la bonne occasion de travailler avec toi.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, que je ne cesserai jamais de remercier. leur soutien et leurs encouragements ont été et resteront mes meilleurs atouts pour le futur. Puisse DIEU me les garder.

A mon frère Mahfouf Oussama qu'on à travaillé dur pour réaliser ce travail

Sans oublier Benkhebcheche Djamel eddine qui nous a soutenu lors de ce travail

Et tout les gens qui ont travaillé dans le laboratoire de biotechnologie et que j'avais de la chance de travailler avec eux : B. Laila, T. Radja, les collègues de la promos d' Ecologie Microbienne et de la Microbiologie et de Génétique

Merci pour ces bon moments que nous avons partagés ensemble durant ce petit temps.

La présente étude est une contribution à la caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules racinaires d'une espèce végétale *Hedysarum pallidum* récolter des deux sites différents pour réaliser une comparaison para-port à l'effets des facteurs abiotiques (pH et NaCl) dans le but de voir s'ils ont le même comportement physiologique sur les isolats .

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, des tests biochimiques nutritionnels et physiologiques ainsi qu'une détermination de la résistance et de la sensibilité des souches aux pH et la salinité.

Les résultats obtenus montre que nos isolats se comportent de la même façon que les souches témoins vis-à-vis au pH, mais ne présente pas les mêmes profils du point de vue d' NaCl.

Cette étude reste insuffisante afin de confirmer que ces isolats susceptible d'appartenir à la famille des des Rhizobiaceae ou bien à d'autre genres ou espèce des B.N.L.pour une position taxonomique rapproché, il est utile de compléter ces tests par d'autres marqueurs, tels que SDS-PAGE, Séquençage du gène ADN_r16S.

The present study is a contribution to the characterization of bacteria isolated from racinaires nodules of botanical species *Hedysarum Pallidum*. This bacteria is collected from two different areas with the aim of making a comparison vis a vis the effects of abiotic factors (pH and NaCl). That is to see whether or not they have the same physiological behavior on isolates.

The characterization of strains in a morphological study brings nutritional and physiological biochemical tests as well as determination of the resistance and the sensibility of origins in pH and salinity.

The obtained results show that our isolates behave in the same way as a control strains against the pH, but they do not represent the same profiles from the point of view of NaCl.

These study remains insufficient to confirm that these isolates are likely to belong to the family of the *Rhizobiaceae* or to an other kind or specie of the B.N.L. for a closed taxonomical position, it is useful to complete these tests by other markers, such as SDS-PAGE, ADNr16S sequencing gene.

هذه الدراسة هي بحث يهدف الى تحديد صفات البكتيريا المعزولة من العقيدات الجذرية لأنواع النباتية *Hedysarum Pallidum*. جمع من موقعين مختلفين لمقارنة الأثار الناتجة عن العوامل غير الحيوية (درجة الحموضة وكلوريد الصوديوم) بهدف معرفة ما إذا كان لديهم نفس السلولت الفسيولوجية .

تحديد صفات السلالات هو دراسة الخصائص مورفولوجية للاختبارات الكيميائية الحيوية الغذائية والفيزيولوجية وكذلك تحديد المقاومة والقابلية لسلالات على درجة الحموضة والملوحة.

النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن السلالات تتصرف بنفس الطريقة لكالسلالات المرجعية فيما يتعلق بسلالات درجة الحموضة، لكن لا تتصرف بلطريقة نفسها فيما يتعلق بسلالات درجة الملوحة.

هذه الدراسة لا تزال غير كافية لتأكيد أن هذه المستخلصات يحتمل أن تنتمي لعائلة Rhizobiaceae أو جنسا أو نوعا من صفات البكتيريا المعزولة من العقيدات الجذرية ، انه من الجيد إكمال هذه الاختبارات بعلامات أخرى، مثل SDS-PAGE , التسلسل الجيني ADNr16s.

Listes des Figures

Figure1 : <i>Hedysarum pallidum</i> Desf : a) pied et fleur d' <i>Hedysarum pallidum</i> Desf. b) pied d' <i>Hedysarum pallidum</i> Desf. c) Grains d) Gousses.	3
Figure.2 : a) conservation des nodules	10
Figure 3 : Test de stérilisation.....	14
Figure 4 : Croissance des isolats provenant du site contaminé sur différents milieux de culture	15
Figure5 : Croissance des isolats provenant du site halophile sur différents milieux de culture	16
Figure .6 : Tolérance aux pH des isolats (Souches Témoins) après 24H	19
Figure.7 : Tolérance aux pH des isolats (Souches Témoins) après 48h	19
Figure.8: Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Babouche	20
Figure.9: Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain babouche	20
Figure.10 : Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 1)	21
Figure.11 : Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain Mlila(Groupe 1)	21
Figure.12: Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 2)	22
Figure.13 : Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain Mlila (Groupe 2)	23
Figure.14 : Tolérance au NaCl des isolats (Souches Témoins) après 24h	25
Figure.15 : Tolérance au NaCl des isolats (Souches Témoins) après 48h	25
Figure.16 : Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Babouche	26
Figure.17 : Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Babouche	26
Figure.18: Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 1)	27
Figure.19: Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Mlila (Groupe 1)	27
Figure.20 Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 2)	28
Figure.21 : Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Mlila (Groupe 2)	28

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralités	3
2. le partenaire végétal	3
2.1 Les légumineuses	3
2.2 Le genre <i>Hedysarum</i>	3
2.3 <i>Hedysarum pllidum</i> Desf.	5
2.3.1 Ecologie et habitat.....	5
3. Le partenaire bactérien : les B.N.L.....	6
4 Mécanisme d'établissement de la symbiose	6
5. Distribution des rhizobiums et les facteurs influençant la fixation symbiotique.....	7
5-1 Le pH.....	7
5.2 L'effet du sel	7
5.3 La température.....	7
5.4 Les insecticides et les métaux lourds	8
5.5 Le stress hydrique	8
5.6 La sécheresse	8

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules	9
1.1 Description de la zone d'études	9
1.2 Collecte des nodules	9
1.3. Conservation des nodules	10

1.4. Isolement des bactéries.....	10
1.4.1. Stérilisation des nodules.....	10
1.4.2. Test de stérilisation	11
1.4.3 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés.....	11
2. Caractères morphologiques et culturaux	11
2.1. Principaux milieux de culture utilisés	11
2.2 Purification des isolats.....	12
2.3 Examen microscopique	12
2.3.1. Coloration de Gram	12
2.4 Conservation des souches	12
2.5 Caractérisation phénotypique des isolats	12
Mesure de la vitesse de croissance.....	12
3 Tests physiologiques	13
3.1. Croissance à différents pH.	13
3.2. Tolérance au NaCl	13

Chapitre 3 : Résultat et discussion :

1. Test de stérilisation	14
2. Caractères morphologiques et culturaux	14
3. Tests physiologiques	17
3.1. Croissance à différents pH.....	17
3.2 Tolérance à la salinité.....	23
Conclusion générale	29
Référence bibliographique	30
Annexes	39

Introduction

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges à partir de primordia racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige, C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries.

Bien que la symbiose légumineuse-*Rhizobium* soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome, et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries .

Lorsque cette symbiose a lieu, elle présente de nombreux intérêts aussi bien pour les deux partenaires que pour la pratique agricole.

Deux grands facteurs affectent le bon déroulement de la symbiose entre rhizobium et légumineuse :

le pH du sol, qui est un facteur environnemental important car il limite la réponse de la plupart des légumineuses à l'inoculation ; l'optimum pour la croissance de la plupart des bactéries se situe entre 6 et 7 et serait de 5,6 à 6,8 pour une symbiose efficace. La symbiose étant entre deux organismes différents, les conditions optimales doivent être définies en tenant compte des exigences des deux organismes.

la salinité est un stress abiotique complexe qui affecte directement la croissance des plantes. Celles-ci sont classées en deux groupes, les glycophytes et les halophytes selon leurs capacités à survivre dans des conditions salines. Le développement des glycophytes est négativement affecté par le sel tandis que les halophytes tolèrent des concentrations élevées en NaCl . Les plantes répondent à la salinité en deux phases : dans la première, le potentiel hydrique externe diminue suite à la présence de sel au niveau des racines, la seconde phase inclut la sénescence de la feuille conséquence de l'accumulation des ions à ce niveau là. Le NaCl à fortes teneurs affecte la croissance, le métabolisme et la disponibilité des nutriments qui inhibe à son tour la photosynthèse par la dégradation des pigments; chlorophylles a et b. (L'un des effets délétères du stress salin est la diminution du taux de germination et l'inhibition de la croissance , diminution de l'absorption de l'eau et la

disponibilité en nutriments , des teneurs excessives de NaCl provoquent un déséquilibre ionique et un stress hyper osmotique chez les plantes (Inhibition de la photosynthèse).

Le genre *Hedysarum* , fait partie de la famille des légumineuses appelé « sulla » ou sainfoin d'Espagne , il est composé d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde ,différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe du Sud .

Parmi ces espèces, *Hedysarum pallidum* Desf., est une plante vivace, cespiteuse, pousse spontanément au Maroc, en Tunisie et également dans l'est algérien, sans pour autant atteindre les Zones Sahariennes , cette espèce se rencontre sur les sols riches en calcaire total à teneur variable en potassium (Abdelguerfi-Berrekia, 1985) .

Ce travaille a été réalisé sur l'espèce *Hedysarum pallidum* récolté de deux cites différents pour réaliser une comparaison par-rapport à l'effets des facteurs abiotique (pH et Nacl) dans le but et de connaître si les isolats de cet espèce malgré les différents facteurs répondent de la même façon face aux facteurs abiotique .

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des souches à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique des souches isolées.
- Caractérisation phénotypique des isolats .

Synthèse Bibliographique

La symbiose Bactéries Nodulants les Légumineuses

1. Généralités

La symbiose légumineuse/*Rhizobium* est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobiums pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement.

Ces bactéries induisent sur la racine de la plante hôte la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. Chez certaines légumineuses tropicales des genres *Sesbania*, *Aeschynomene*, *Neptunia* ou *Discolobium*, la nodulation concerne les tiges (Boivin *et al.*, 1997). À l'intérieur des nodules, la bactérie subit des transformations et fixe l'azote moléculaire de l'atmosphère en le convertissant en ammonium, directement assimilable par la plante. C'est la fixation biologique de l'azote, opérée par le système Légumineuse - BNL. Cette symbiose permet aux légumineuses de coloniser des milieux dégradés ou pauvres et d'enrichir le sol en matière organique, facilitant ainsi l'implantation d'autres espèces végétales et la réhabilitation de l'écosystème dégradé. D'autre part, cette fixation d'azote est importante sur le plan agro économique, car elle conduit à un enrichissement du sol en azote, jouant ainsi le rôle d'engrais naturel.

2. le partenaire végétal

2.1 Les légumineuses

2.2 Le genre *Hedysarum*

Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des papilionaceae qui est très répandue dans le monde pousse sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes et présent, ainsi une grande diversité. Les espèces de ce genre sont rencontrées à l'état naturel dans tout le bassin méditerranéen , en particulier en Afrique du nord .Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation d'azote atmosphérique , peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les sols arides et semi-arides (Hannachi *et al.*, 2004).

Selon Quzel et Santa(1962), le genre *Hedysarum* comporte neuf espèce (annuelles et vivaces) dont plusieurs sont des endémiques très localisées, comme *H.Naudinianum* coss, *H.Perrauderianum* coss. qui ne se développent qu'en Algérie . *H.Carnosum* Desf.

H.pallidum Desf, Qui sont endémiques de l'Afrique du nord, et c'est cette dernière espèce qui fait l'objet de notre présente d'étude (H.Benhizia, 2001).



Figure1 : *Hedysarum pallidum* Desf. : a) pied et fleur d'*Hedysarum pallidum* .

b) pied d'*Hedysarum pallidum* . c) Grains d) Gousses.

2.3 *Hedysarum pallidum* Desf.

Classification :

Régne :	plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae
Genre :	<i>Hedysarum</i>
Espèce :	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf.

2.3.1 Ecologie et habitat

Très peu de données existent sur *H. pallidum* Desf., espèce décrite pour la première fois par Desfontaines . C'est une légumineuse à vocation fourragère, pousse spontanément en Algérie, au Maroc et en Tunisie . Elle a une écologie peu marquée, se rencontre dans des milieux assez divers (H.Benhizia, 2001).

En Algérie *H. pallidum* se rencontre à Sétif, Constantine et dans les Aurès (Quezel et Santa,1962). Selon ces mêmes auteurs, elle se trouve généralement dans les forêts et les broussailles. cette espèce est également signalée dans la région de Tiaret, Nador et Garrouban (Pomel,1874), Tebessa(Abdelkrim,1984), Après de Ain Tedeles, Saida, à Arzew , Oran et près d'El Aouinet (Abdelguerfi-Berreia *et al.*,1988).

2.2.4 Description

Selon Quezel et Santa (1962), la clé de détermination de l'espèce *Hedysarum pallidum* est basée sur les caractères suivants :

- Une fleur formée d'un calice en cloche, à cinq dents égales ou inégales, pétales à onglet très court, carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité et étamines diadelphes (9-1) à tube fendu en dessus.

-Une gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales , orbiculaires ou quadrangulaires se séparant à maturité .

-Des feuilles imparipennées à deux stipules latérales.

C'est une plante vivace, cespiteuse, à longues tiges plus au moins prostrées appartenant à la famille des fabaceae (voir la classification). Elle présente des inflorescence en grappes plus au moins allongées atteignant 10-15 cm à la fructification , de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre , parfois blanches et des calices entièrement hispides .

3. Le partenaire bactérien : les B.N.L

D'un point de vue morphologique et microscopique les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) se présentent sous forme de bâtonnets a Gram négatif , mobiles (grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou à flagelles péritriches)(Werner , 1992) , avec des dimensions approximatives de 0.5 à 0.8 μm de largeur et 1.3 à 3.0 de longueur . Ils se développent facilement dans un milieu de culture proche de la neutralité avec une source de carbone et une source d'azote , à une température optimale de croissance de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$...

La taxonomie moderne des rhizobiums inclus les genres *Rhizobium* , *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* , *Allorhizobium* , *Azorhizobium* , *Badyrhizobium* , *Methylobacterium* . (Jordan 1982 , Deyfus *et al.*,1988 De Lajudie *et al.*,1994 ;1998a ;1998b ;Jarvis *et al.*, 1997 Sy *et al.*, 2001 ;Martens *et al.*,2007 , 2008,Van Berkum *et al.* , 2006,Vinuesa *et al.*,2008 ;Rivas *et al.*, 2009 Ribeiro *et al.*,2009) qui appartiennent à la sous classe des à *Protéobactéries* . Grace aux progrès technologiques utilisés en taxonomie qui se basent sur des critères morphologiques , physiologiques ainsi que sur l'analyse des séquences , d'autres genres appartenant aux à et à *Protéobactéries* ont été découverts (Chen *et al.*, 2001 ; Moulin *et al.* , 2001 Benhizia *et al.* , 2004 ;Franche *et al.* , 2009)

4 Mécanisme d'établissement de la symbiose :

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

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003), les étapes de la mise en place de la symbiose peuvent être énumérées dans un ordre chronologique :

-la racine exsude des flavonoïdes ;

-les rhizobia, en réponse secrètent des facteurs Nod ; sous l'action de ces facteurs , les cellules du cortex se mettent en mitose pour former le primodium nodulaire dans le méristème ;

- les étapes du processus d'infection via un cordon d'infection ,

-la division cellulaire corticale et le primodium nodulaire se développe alors en nodosité pendant que les bactéries pénètrent dans les cellules végétales et se différencient en bactéroïdes formant ainsi le symbiosome dans lequel la fixation de N₂ va se réaliser (Djordjevic, 2004).

5. Distribution des rhizobiums et les facteurs influençant la fixation symbiotique :

Plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice de l'azote après symbiose (Taq *et al.*, 2004; Collavino *et al.*, 2005; Kinkema *et al.*, 2006

5.1. Le pH:

L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

5.2.L'effet du sel

se manifeste par une réduction de la disponibilité en azote pour les plantes, due essentiellement à une faible nitrification (Mengel et Kirkby, 1982) et à une absorption racinaire préférentielle du chlore par rapport au nitrate (Osmond *et al.*, 1980).

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques, ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules .

5.3.La température:

Aux fortes températures la formation des nodules fixateurs d'azote est remarquablement sensible (Abaidoo *et al.*, 1990).

5.4. Les insecticides et les métaux lourds:

La réutilisation croissante des eaux usées traitées et l'épandage des boues résiduelles qui sont souvent chargées en métaux lourds et l'utilisation massive de divers produits chimiques (insecticides), peuvent induire des modifications de la composition structurale des bactéries et une altération de leurs propriétés symbiotiques (Giller *et al.*, 1989).

5.5. Le stress hydrique

Le stress hydrique affecte la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux:

(i) La formation et la croissance nodulaire; (ii) le métabolisme du carbone et de l'azote; (iii) l'activité de la nitrogénase; (iv) la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Zahran et Sprent 1986; Aguirreola et Sanchez-Díaz 1989; Sadowsky 2005).

5.6. La sécheresse :

Inhibe la nodulation et la fixation azotée même chez les plantes inoculées (Zablotowicz *et al.*, 1981). En effet, il existe des taux d'humidité extrêmes tolérés au delà desquels le développement et la survie du rhizobium sont affectés (Vincent, 1982).

Matériels et Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1 Description de la zone d'étude

Notre étude porte essentiellement sur deux régions :

-Ain babouche, Wilaya d'Oum bouaghi (Latitude 7°11'15''E et longitude 35°56'30''N) et plus précisément sur le Djbel Hammimet gîte d'antimoine très considérable et très riche se trouvant à 3 Km de Ain Babouche (Figure4).

Cette région semi-aride du Nord Est Algérien situé à 90 Km de Constantine est réputée pour la caractéristique spécifique de ses sols qui est leur très forte teneur en métaux lourds et plus précisément en antimoine présent sous forme d'un trioxyde d'antimoine Sb_2O_3 ; ce métal est considéré comme très peu soluble dans l'eau, (Germida et *al.*,1998).

Cette zone est constituée de déblais de mine contenant en moyenne 51090 mg d'antimoine/Kg de sol .

-La Sebket Ezzmoul est localisée dans Wilaya de Oum El Bouaghi et située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au nord de la Kabylie et au sud du massif de l'Aurès (latitude 35° 50' à 35° 55'N et longitude 6° 30' à 6° 35'Est)

1.2 Collecte des nodules

La collecte des échantillons a été réalisée au mois de mars et effectuée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegram et Hoben (1994).

-Creuser 15cm autour de la plante et 20 cm de profondeur pour extraire la plante ainsi que tout son appareil racinaire sans autant l'abimer.

-Eliminer soigneusement le sol lié aux racines et casser les blocs de terre avec précaution pour ne pas perdre les nodules.

-Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.

-Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.

-Au laboratoire, la partie aérienne est enlevée, et la partie racinaire est lavée soigneusement à l'eau courante.

-Couper les nodules à 1-2 mm du site d'attache, sécher-les avec du papier absorbant.

1.3. Conservation des nodules

Les nodules sont conservés selon la méthode de Vincent (1970) qui repose sur la dessiccation de ces derniers dans des flacons adéquats (Figure 2) contenant du chlorure de Calcium (CaCl_2), couvert d'une couche de coton sur laquelle les nodules sont déposés. Ces flacons doivent être étiquetés en précisant le nom latin de la plante hôte, le lieu et la date de prélèvement et la date de mise en conservation, puis mis au réfrigérateur à 4°C .

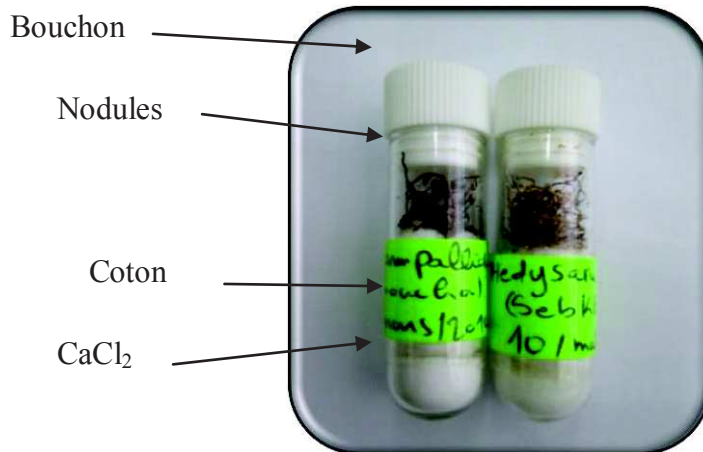


Figure.2 : Conservation des nodules.

1.4. Isolement des bactéries

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodules lavés et mis dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur sont utilisés directement après une heure à température ambiante, alors que ceux qui seront conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur dans l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante.

1.4.1. Stérilisation des nodules

-Immerger les nodules dans l'éthanol à 95% pendant 3-5 secondes sous la hotte à flux laminaire.

-Transférer rapidement dans du chlorure de mercure acidifié 0.1% (1gHgCl₂+5ml HCl+11 eau distillée).

-Rincer à l'eau distillée stérile (10 fois).

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

1.4.2. Test de stérilisation

Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant sur le milieu YMA+Rouge Congo (Annexe 1), incubé à 30°C pendant 24 heures, pour vérifier la technique de stérilisation utilisée.

1.4.3 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Selon la méthode de Vincent(1970), la technique consiste à déposer, dans une boîte de Pétri stérile ; un nodule et dessus une ou deux gouttes d'eau distillée stérile.

Ecraser le nodule avec une pince stérile (immergée dans l'éthanol et flambée au bec Bunsen) jusqu'à obtention du jus nodulaire. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie sous la hotte à flux laminaire .

A l'aide d'une anse de platine, une suspension de chaque nodule écrasé est étalée selon la méthode des quatre quadrants et avec flamage (figure2) sur les milieux , YMA+rouge Congo et GPA+Bromocrésol pourpre (Annexes 1) de manière à obtenir des colonies séparées, puis les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures .

Récupérer le jus restant en l'ensemencant sur un bouillon YMB (Annexe1), incubé à 30°C pendant 24 heures. répéter l'opération pour environ cinq nodules .

L'utilisation d'un milieu gélosé au cours de la phase d'isolement permet de différencier chaque isolat issu d'un même nodule , de localiser et d'éliminer les éventuels contaminants, ce qui est impossible avec un milieu liquide.

2. Caractères morphologiques et culturels

2.1. Principaux milieux de culture utilisés :

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaires à la croissance des bactéries ; et pour cela on doit utiliser :

-Milieux liquide : YMB (Yeast Manitol Broth)

-Milieux solides : YMA+RC (Yeast Manitol Agar+ Rouge congo)

YMA (Yeast Manitol Agar)

2.2 Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegran et Hoben,1994),des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaire pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant du YMB (Annexe 1) puis les placer dans un bain-marie agité 120 tours/min à 30°C. Le bouillon étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologiques sont enfin réalisés.

2.3 Examen microscopique

2.3.1. Coloration de Gram

Une observation microscopique est réalisée sur des lames dont une préparation de culture en YMB est étalée en couche mince ; séchée et fixée. La préparation des lames est réalisée sous la hotte à flux laminaire, puis les lames subissent une coloration de Gram (Annexe 2).

L'examen microscopique a une importance majeure lors de la purification , car une lame homogène, suppose une bonne purification des souches .

2.4 Conservation des souches

Les souches pures (selon l'aspect macroscopique et microscopique), sont conservées sur des boites et des tubes en gélose inclinée par ensemencement par la méthode des stries simples, à partir d'un bouillon ensemencé par la souche, 24 heures à l'avance, sur le milieu YMA+CaCO₃ (Annexe 1), comme agent neutralisant de l'acidité (Vincent 1970). Incuber à 30°C puis conserver à 4°C et ceci pour une durée de 6-12 mois (Vincent 1970).

2.5 Caractérisation phénotypique des isolats

.Mesure de la vitesse de croissance

La Vitesse de croissance des Rhizobia est étudiée en les cultivant sur milieu YMA additionné de bleu de Bromothymol (Annexe1). Sur ce milieu les souches provoquent une acidification révélée par un virage de couleur au jaune.

Le temps nécessaire à cette réaction colorimétrique distingue les bactéries à croissance rapide, qui modifient le pH après 24 heures d'incubation, tel que les genres (*Rhizobium*, *Mesorhizobium* , *Sinorhizobium*...); et les bactéries à croissance lente dont l'acidification peut atteindre 4 à 5 jours , tel que le genre *Bradyrhizobium*.

3 Tests physiologiques

3.1. Croissance à différents pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 4 , 4.5, 5,5.5, 5.8, 6.8, 7.8, 8.8, 9.8, 10,11

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures et 48 heures.
- Mesurer la DO à 600nm

3.2. Tolérance au NaCl

Les souches sont cultivées sur le milieu Lactate-aspartate de sodium (Gloux et le Rudulier, 1989). (Annexe 1).

Les différentes concentrations de NaCl : 0.01M (10mM), 0.1M (100mM), 0.2M (200mM), 0.5M(500mM), 1M(1000mM), 1.5M(1500mM), 2M(2000mM).

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures et 48 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

Résultats et Discussion

L'isolement des bactéries à partir des nodules de *Hedysarum pallidum* poussant dans deux sites écologiquement différents: Site contaminé par l'antimoine et un site halophile, a permis la constitution d'une collection de trente cinq isolats. Les souches isolées sur lesquelles on a travaillé ont été précédemment isolées par M^{elle} BOUKAOUS Leila (Doctorante au sein du Laboratoire de biologie Moléculaire et cellulaire) Les souches ont été caractérisés en présence des souches témoins : des souches rhizobiales et des souches Gammaproteobacteries dont leur position taxonomique est connue : SAM12 (*Rhizobium leguminosarum*. (Collection de Samia Dekkiche maitre assistant classe (A) à l'université de Batna), et 76T *Mesorhizobium* sp. de Samia Dekkiche), Gamma 6 (HS6 *Pantoea agglomerans*. Y.Benhizia- Constantine .Algérie), et Gamma 10(HP10b *Enterobacter cloacae*, Y.Benhizia. Algérie). Cette identification est basée sur des caractères morphologiques, culturels et phénotypiques.

1. Test de stérilisation

Ce test permet de vérifier que la technique utilisée pour la stérilisation des nodules à été efficace, et ceci se manifestera par l'absence de croissance de bactéries sur le milieu YMA +RC, ce qui a été le cas pour nos nodules (Figure 3).



Figure 3 : Test de stérilisation

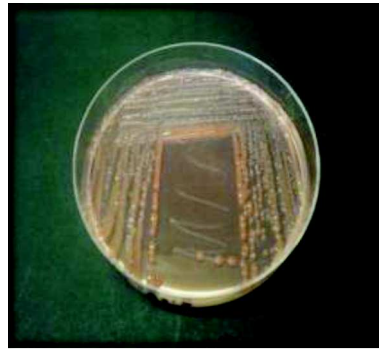
2. Caractères morphologiques et culturels :

La croissance sur les milieux de cultures YMA+RC et YMA, montrent une diversité entre les isolats. les résultats obtenus révèlent que nos isolats diffèrent dans leur absorption du rouge Congo. Elles ont bien poussé sur le milieu YMA au bout de 2 à 3 jours, la taille des colonies est variable, d'une couleur blanchâtre, jaune ou crème et montrent une texture translucide ou opaque avec un aspect brillant. Tous nos isolats présentent une acidification du milieu YMA+ BTB après 24 à 48 heures ce qui prouve que nos isolats ont une croissance

rapide L'examen microscopique des isolats donne des bacilles et des coccobacilles à Gram négatif de différentes tailles



a. Croissance sur YMA+RC



b. Croissance sur YMA+RC



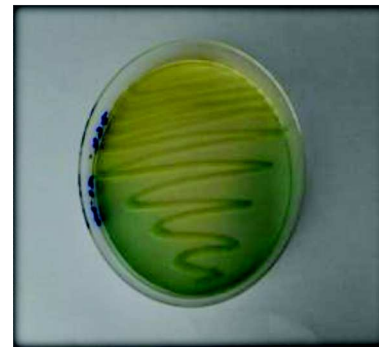
c. croissance sur YMA



d. Croissance sur YMA



e. Croissance des isolats sur YMA+BTB



f. Croissance des isolats sur YMA+BTB



g. examen microscopique x10



h. examen microscopique x10

Figure 4 : Résultats des isolats provenant du site contaminé sur différents milieux de culture



a. Croissance sur YMA+RC



b. Croissance sur YMA+RC



c. Croissance sur YMA



d. Croissance sur YMA



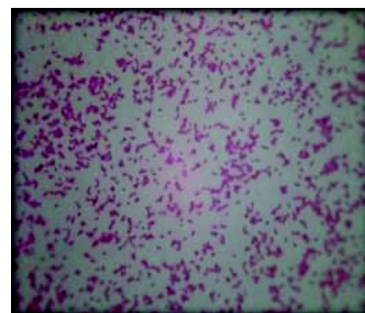
e. Croissance des isolats sur YMA+BTB



f. Croissance des isolats sur YMA+BTB



g. examen microscopique x10



h. examen microscopique x 10

Figure5 : Résultats des isolats provenant du site halophile sur différents milieux de culture

3. Tests physiologiques

3.1. Croissance à différents pH

L'effet du pH montre que la majorité des souches isolées sont capables de pousser dans une gamme de pH allant de 4 à 10. L'optimum de croissance varie d'une souche à une autre ce qui suggère une diversité entre nos isolats.

Face à l'acidité, la majorité des souches isolées à partir des deux sites ainsi que les souches de référence ont tendance à tolérer le pH le plus bas (pH 4).

L'acidité est beaucoup plus répandue que l'alcalinité dans plusieurs régions du monde. Les souches de *rhizobium* varient largement dans leur tolérance aux pH acides. En effet, *Sinorhizobium meliloti* a été rapporté être sensible au pH acide (Brockwell *et al.*, 1991). *Rhizobium tropici* et *Mesorhizobium loti* sont considérés comme des souches très tolérantes à l'acidité (Graham *et al.*, 1994 ; Wood *et al.*, 1988). Certaines souches rhizobiennes peuvent même supporter et survivre dans un pH très bas de l'ordre de 3,5 (Yadav et Vyas, 1973).

Dans notre étude, la tolérance aux différents pH est mieux observée après 48 heures d'incubation. Les souches isolées à partir du site contaminé par l'antimoine varient dans leur tolérance aux pH allant de pH 5.0 à pH 10. En effet, certains isolats préfèrent les milieux légèrement acides à neutres où la meilleure croissance est observée à pH 5 pour la souche S42 avec une densité optique maximale égale à (DO=0.728) et (DO=0.761) pour la souche N45b (pH 6.8). En outre, d'autres isolats préfèrent les milieux basiques et leur croissance maximale est notée pour la souche N42 à pH 9.8.

les seuils de tolérance aux pH trouvés concorde avec les résultats d'El Boutari (2009) qui a rapporté une tolérance au pH comprises entre 9 et 9,5 des *Rhizobiums* spécifiques isolés de *Hedysarum coronarium* L.,

Concernant les souches du deuxième site, les figures (8-9) montrent que les isolats sont mieux développés dans les milieux de pH variant de 4 et 6.8. Tandis que les souches du deuxième groupe les figures (10-11-12-13) présentent une bonne croissance dans l'intervalle de pH allant de 6.8 à 10 avec un optimum de croissance noté pour la souche 312 à pH 10. De même, les sept souches témoins de *Rhizobium* et Gammaproteobacteries présentent une bonne croissance à des valeurs de pH comprises entre pH 4 et pH 10, sauf, pour la souche (76T *Mesorhizobium*) qui s'avère être la moins tolérante par rapport aux autres souches témoins.

Ces résultats concordent avec les résultats obtenus sur les souches isolées en 2004 (Benhizia *et al.*, 2004) où elles sont capables de croître dans une gamme de pH allant de 4 jusqu'à 9.8. Ainsi Raza *et al.*, (2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10)

La tolérance à pH 11 s'est révélée variable selon les souches et en fonction du temps d'incubation. En effet, il existe des souches qui ne peuvent pas supporter le pH 11 (N46b, N1, N43cent, 331(t), N3/2, 214b(t), 213), alors que d'autres souches sont très tolérantes au pH 11 (S41, N45b, N42, N46b) « site contaminé » ; (N3/4, MN63j, 312a, N3/1, MN63b, 20, 214b, 311(o), N4, 312) « site halophile », présentant ainsi une absorbance appréciable arrivant jusqu'à DO=0.759 pour la souche N4. Cette extension de tolérance de nos isolats en fonction du temps est peut être due à une adaptation de nos isolats à des pH alcalins.

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Glenn et Dilworth (1994) qui ont rapporté que le groupe des souches bactériennes à croissance rapide a tendance à tolérer des milieux basiques allant jusqu'à un pH 10. Dans ce sens, Rao *et al.* (1994) ont isolé des rhizobiums de pois pouvant tolérer des pH supérieurs à 11,5.

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessite des pH neutres ou légèrement acides pour s'établir dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994).

Le pH du sol a une grande influence sur la survie et la multiplication des *rhizobia*. Le pH optimal pour les diverses phases de la croissance des *rhizobia* peut varier, mais en général ce sont des bactéries neutrophiles.

Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des *rhizobiums* sous les conditions acides sont nombreux (O'Hara et Glenn, 1994 ; Graham *et al.* 1994). Ces Mécanismes incluent entre l'exclusion et l'expulsion des protons H⁺ (Chen *et al.* 1993), le changement de la composition du Lypo polysaccharide (Chen *et al.* 1993b), et l'accumulation de polyamines (Fujihara et Yoneyama, 1993).

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des *rhizobia*. Cependant, l'effet négatif que représente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux indispensables autant pour le *rhizobium* que pour la plante hôte tel que le fer et le manganèse (Bordeleau et Prévost, 1994).

La sélection des souches tolérantes aux pH extrêmes peut constituer un moyen prometteur pour une augmentation symbiotique potentielle dans les zones à problèmes.

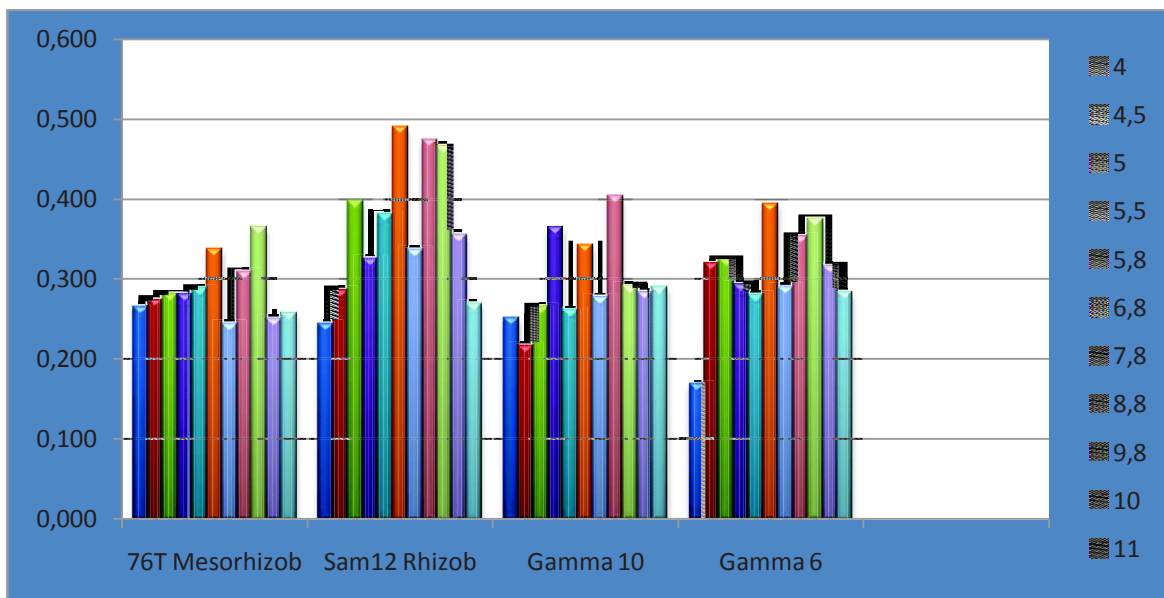


Figure .6 : Tolérance aux pH Souches Témoins après 24H

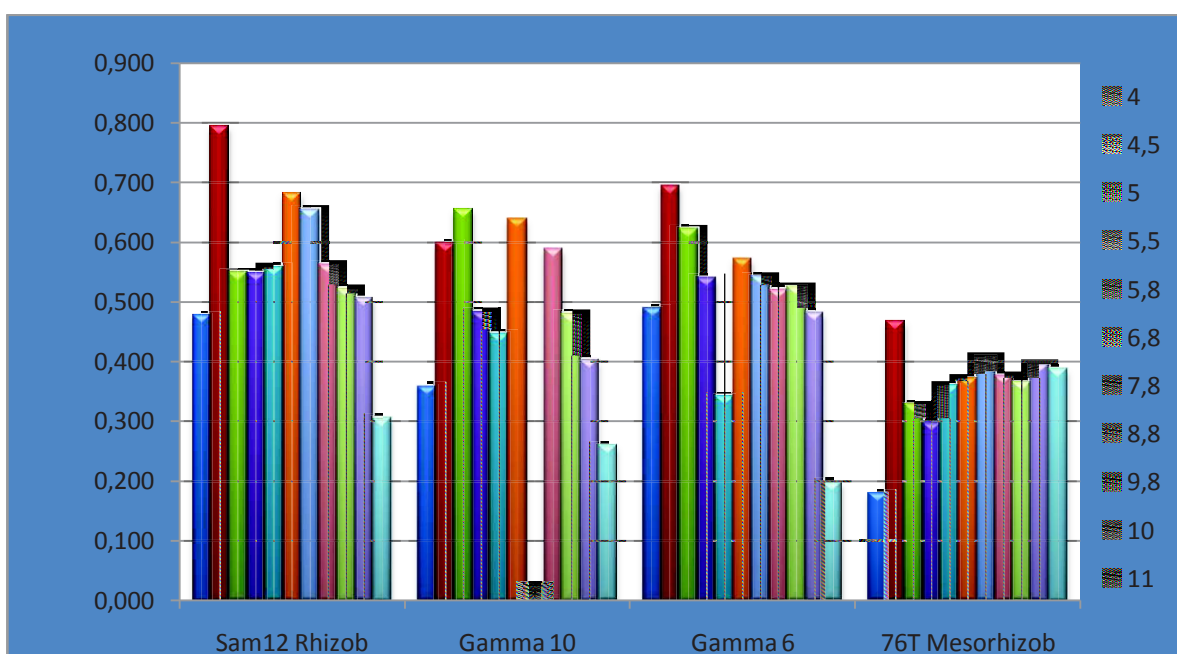


Figure.7 : Tolérance aux pH Souches Témoins après 48h

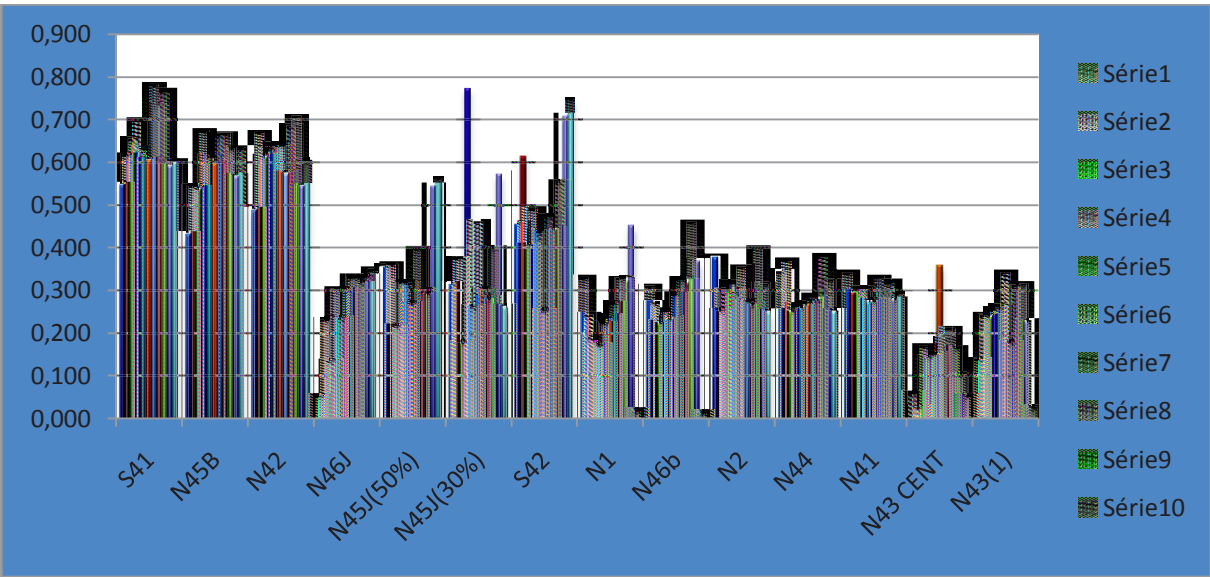


Figure.8: Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Babouche

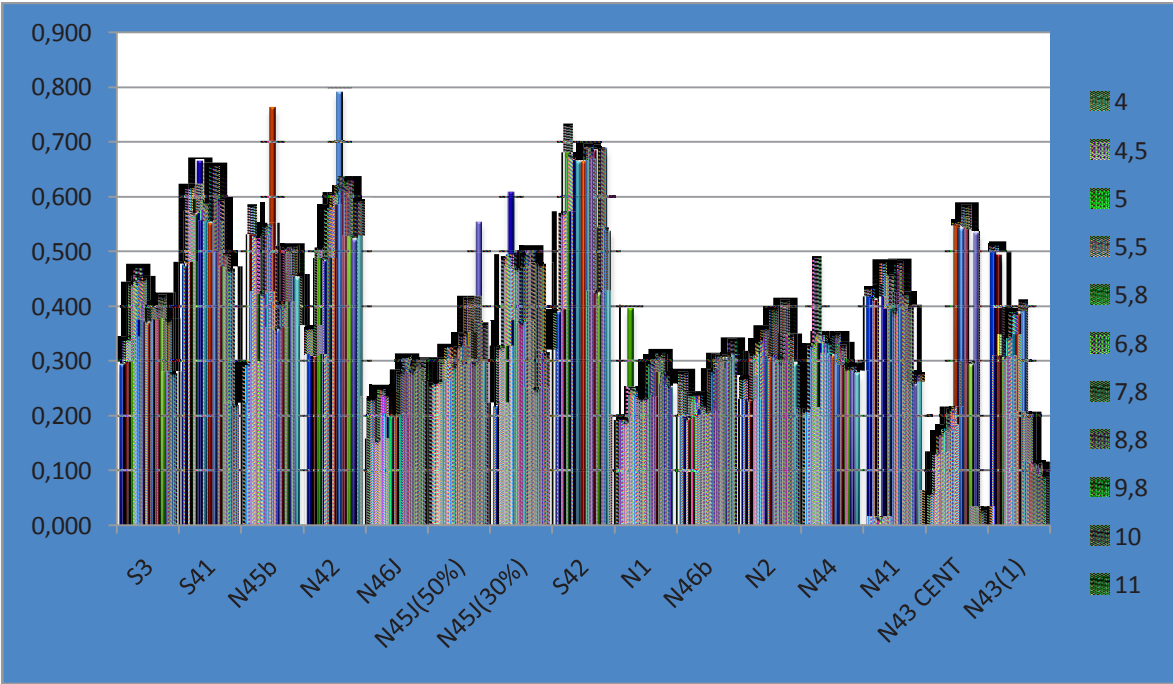


Figure.9: Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain babouche.

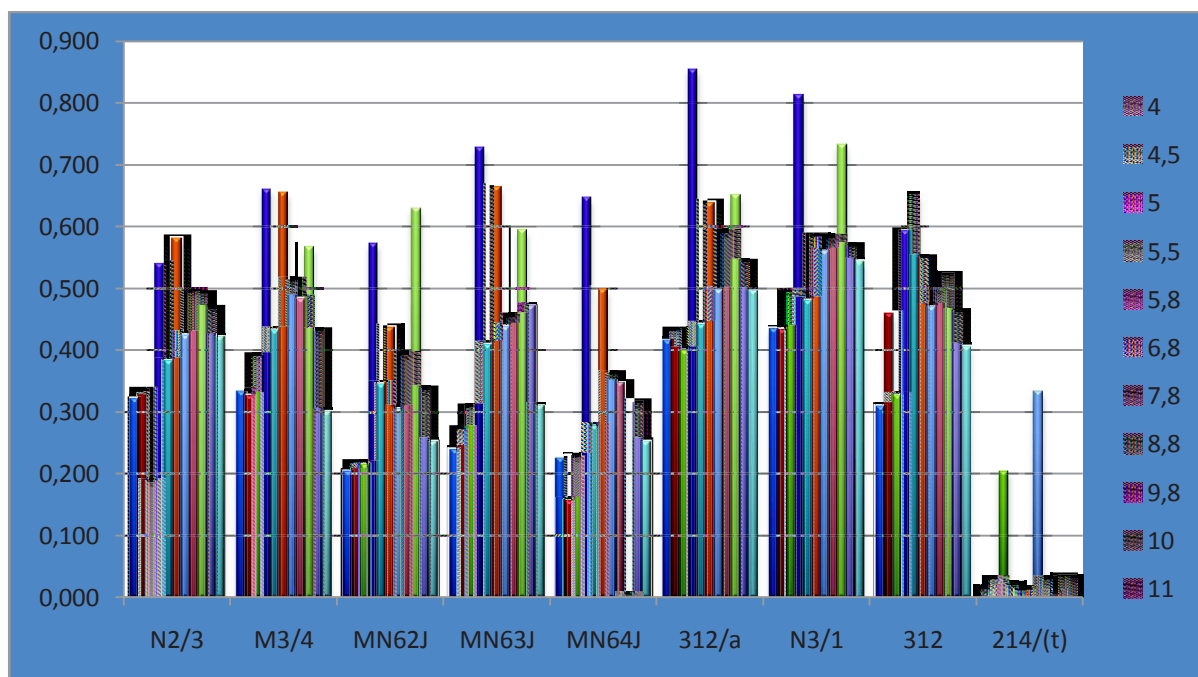


Figure.10 : Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 1).

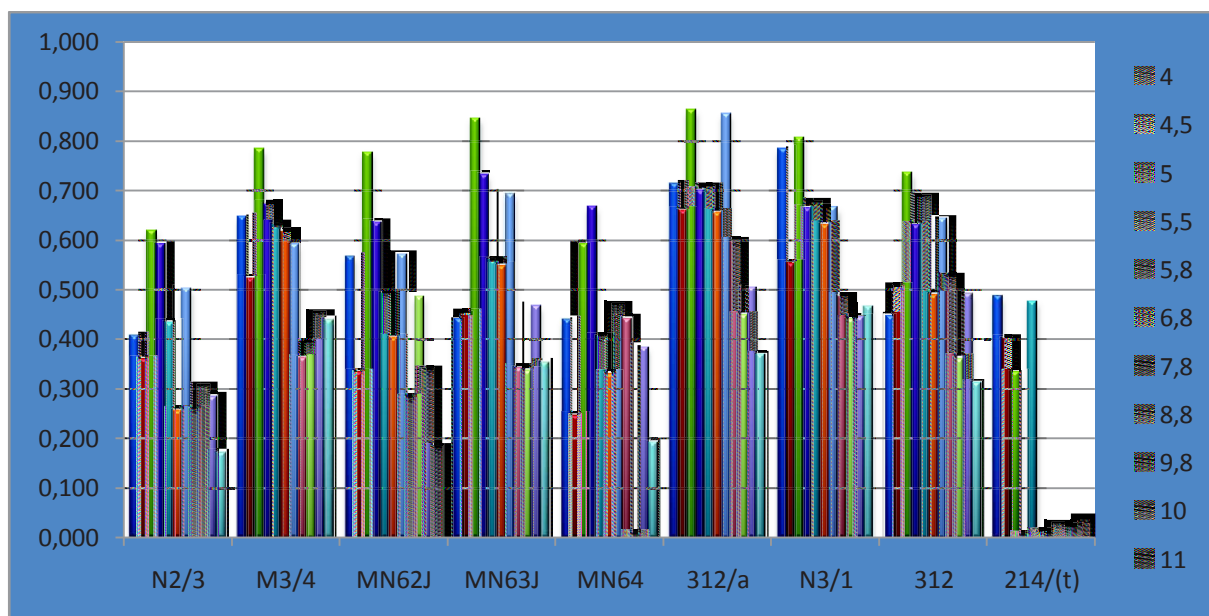


Figure.11 : Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain Mlila(Groupe 1)

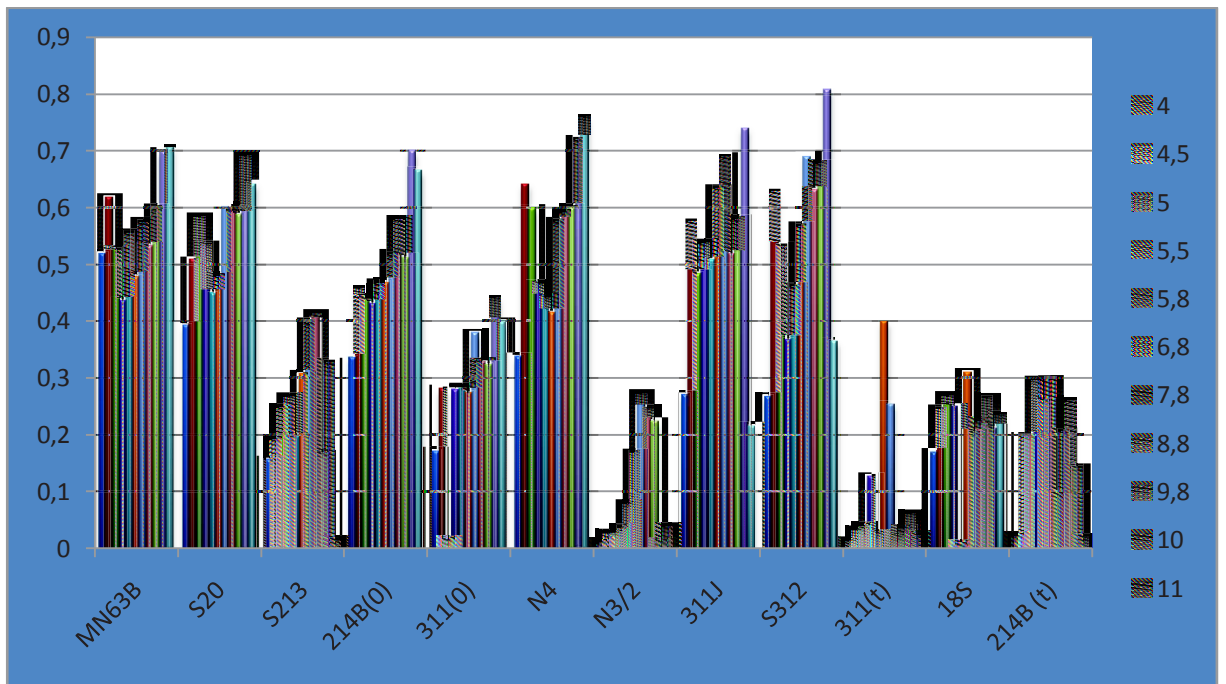


Figure.12: Tolérance aux pH des isolats après 24h Ain Miila (Groupe 2).

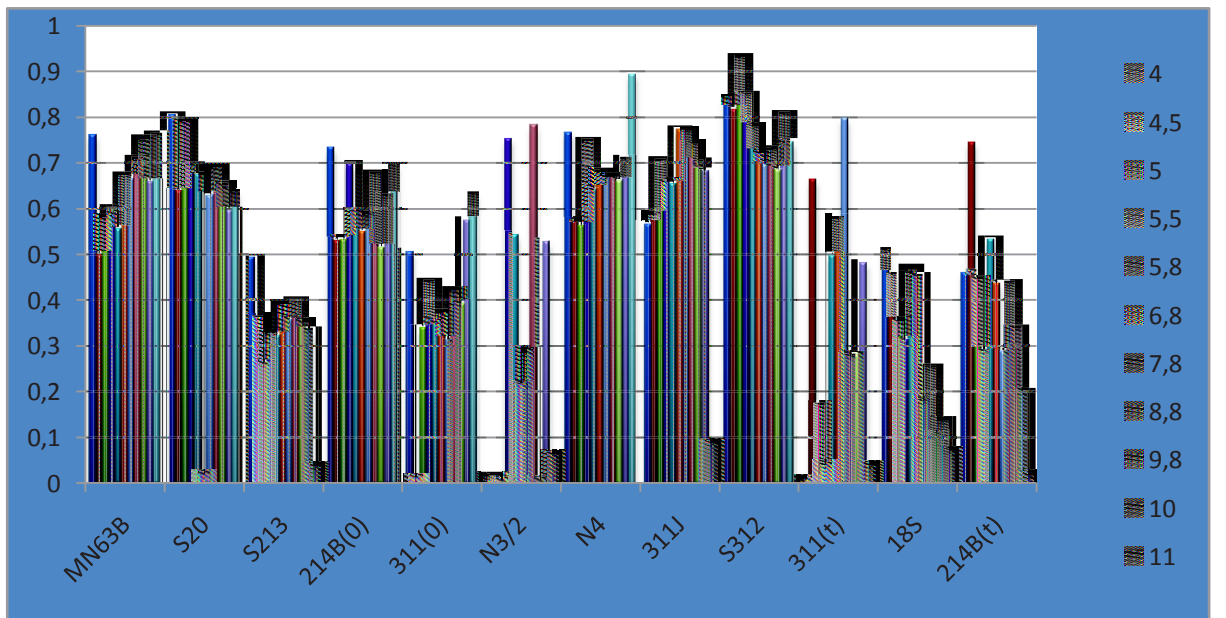


Figure.13 : Tolérance aux pH des isolats après 48h Ain Miila (Groupe 2).

3.2 Tolérance à la salinité

Les résultats obtenus montrent une variabilité relative de la tolérance vis-à-vis de la salinité chez les souches étudiées dans ce travail.

les mesures de la densité optique montrent que jusqu'à une concentration de 0.2M (200mM) de NaCl, la croissance de tous les isolats ainsi que les souches témoins n'est pas affectée avec un optimum de croissance noté pour les souches : S42 (DO= 0.188), MN63J (DO=0.140), 213 (DO=0.20), 76T Mesorhizo (DO=0.119). En outre, quelques souches du groupe 2 (site halophile) montrent une nette sensibilité à cette concentration.

À partir de la concentration 0.5M (500mM) la tolérance s'est révélée variable. En effet, pour le premier site ; la meilleure croissance est observée à la concentration 0.5 M (500mM) pour la souche N45b. Au-delà de cette concentration la croissance diminue progressivement et inhibée à la concentration 2M (2000 mM) pour la majorité des souches. Parallèlement à nos résultats, Wei et *al.*, 2008 ont rapportés que les souches nodulant les genres *Hedysarum*, *Astragalus* et *Lesprdosia* sont incapables de croître à 5% de NaCl. Liu et *al.*, 2005 ont noté aussi que tous les isolats sont sensibles à 4% de NaCl.

Sur le plan de la tolérance NaCl pour les deux groupes de souches isolées à partir du site halophile, on distingue différentes marges de tolérance aux différentes concentrations de sel. Les figures (18-19-20-21) montre que les souches de ce groupe peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 2M (2000mM) de NaCl, ce qui suggère que ces souches sont hautement tolérante. La tolérance au sel qui caractérise les souches étudiées pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement. Un résultat similaire a été rapporté par Maâtallah *et al.* (2002) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche au Maroc et par Mohammed *et al.* (2000) pour des souches nodulant *Acacia* en Libye. Mpepereki *et al.* (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité dans les sites salins peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est dû à l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol durant les périodes sèches.

Malgré que les souches du deuxième groupe ont été isolées à partir du même site, elles sont incapables de supporter les fortes concentrations du NaCl en présentant ainsi une croissance optimale à une concentration de 0.2M (200mM). Cela est peut être du à l'incapacité des souches à s'adapter aux conditions du laboratoire.

De même, les souches témoins sont sensibles aux fortes concentrations de sel, elles peuvent tolérer des concentrations de sel variant entre 0.2M et 0.5M.

La gamme de tolérance au sel des rhizobiums est variable selon la souche et le type de sel (El Sheikh *et al.*, 1989). Certaines sont inhibées par une concentration de 100 mM de NaCl, alors que les plus tolérantes peuvent survivre à des concentrations de 1700 mM de cet élément (Zahran *et al.*, 1994). D'autres comme *S. meliloti* sont tolérantes entre 300 et 700 mM NaCl (Mohammad *et al.*, 1991; Muller et Pereira 1995), alors que *Rhizobium leguminosarum* tolère des variations entre 150 mM NaCl (Rai, 1983) et 350 mM NaCl (Breedveld *et al.*, 1993). Le stress osmotique hydrique ou salin peut modifier la synthèse de certaines composantes cellulaires (protéines et lipopolysaccharides) des rhizobiums (Zahran *et al.*, 1994).

Les légumineuses sont plus sensibles au sel et au stress osmotique que leur rhizobia (Zahran, 1999). La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et coll., 2001).

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1999).

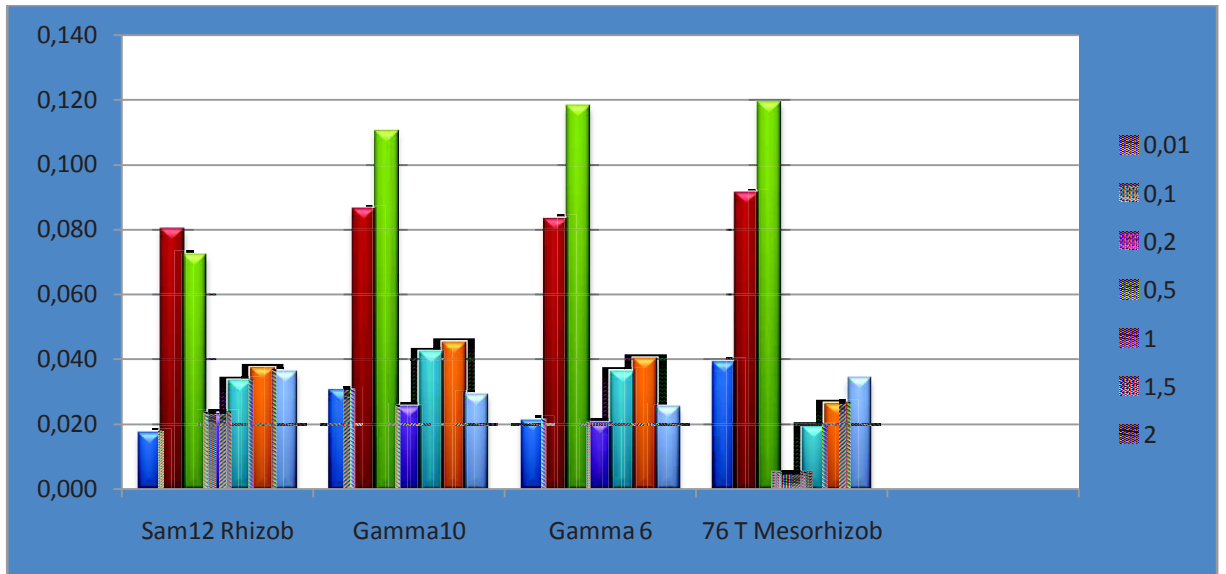


Figure.14 : Tolérance au NaCl Souches Témoins après 24h

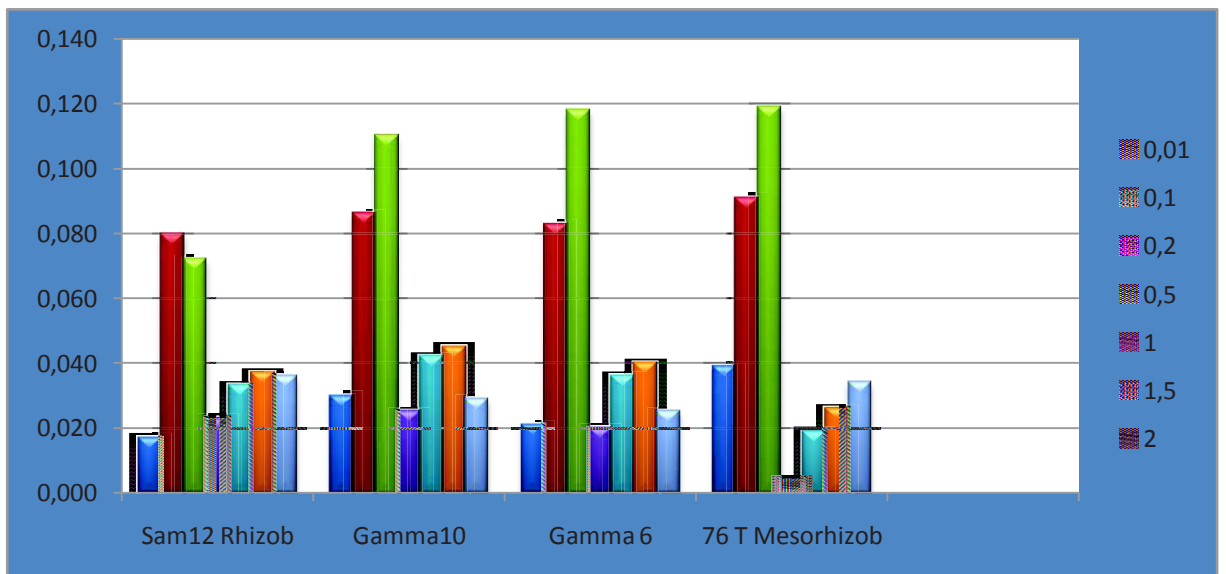


Figure.15 : Tolérance au NaCl Souches Témoins après 48h

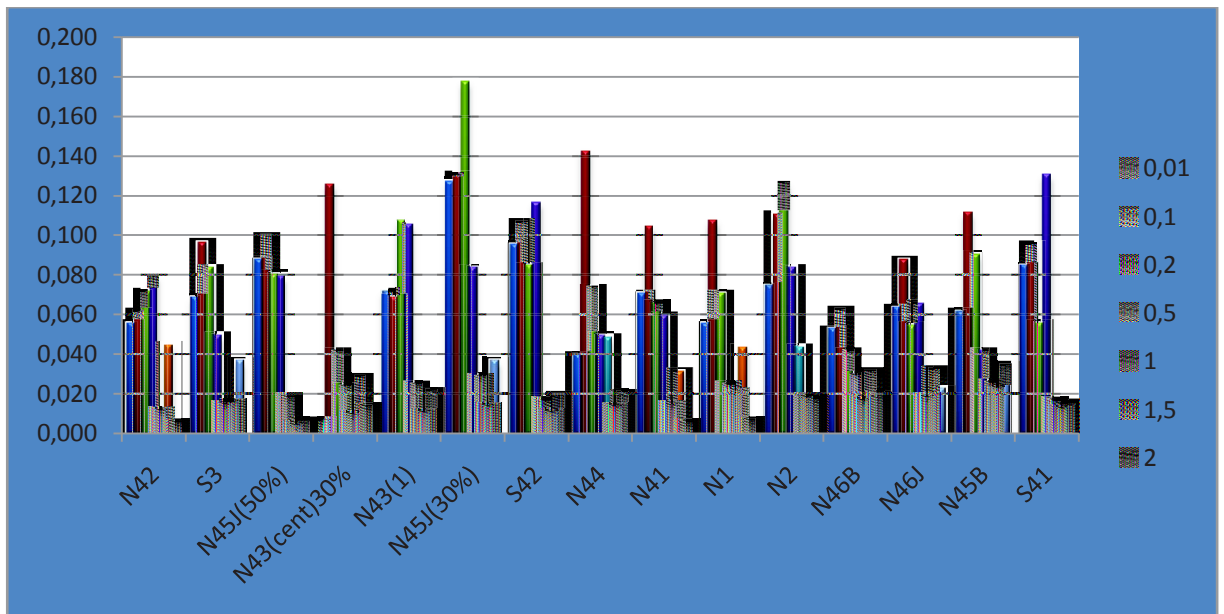


Figure.16 : Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Babouche.

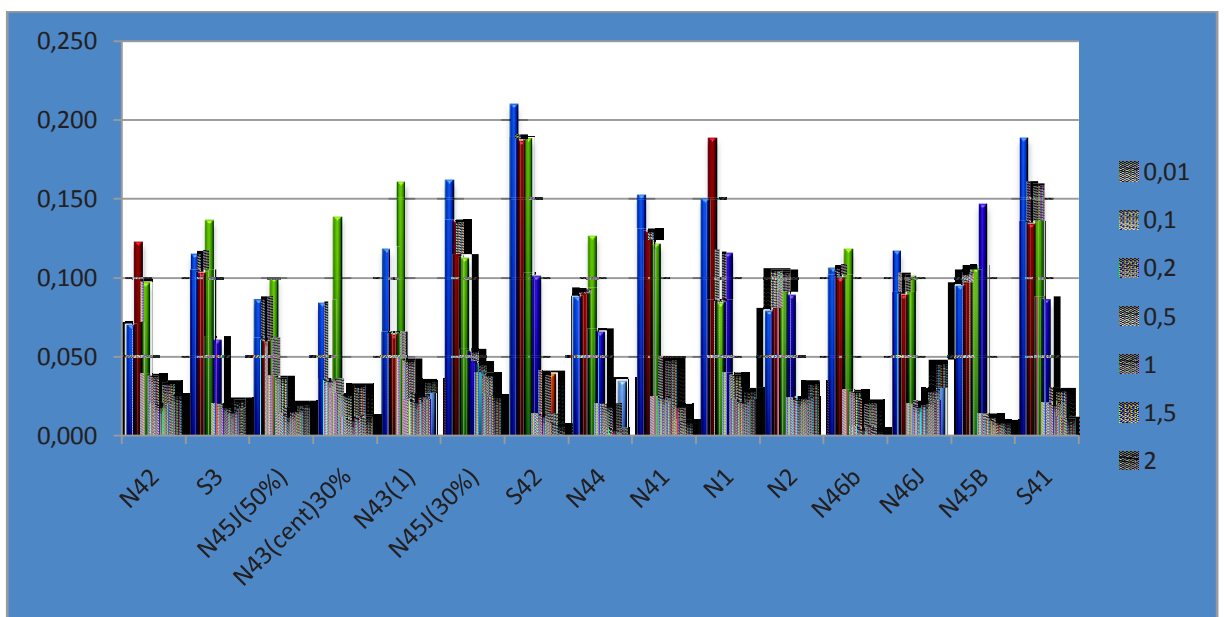


Figure.17 : Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Babouche.

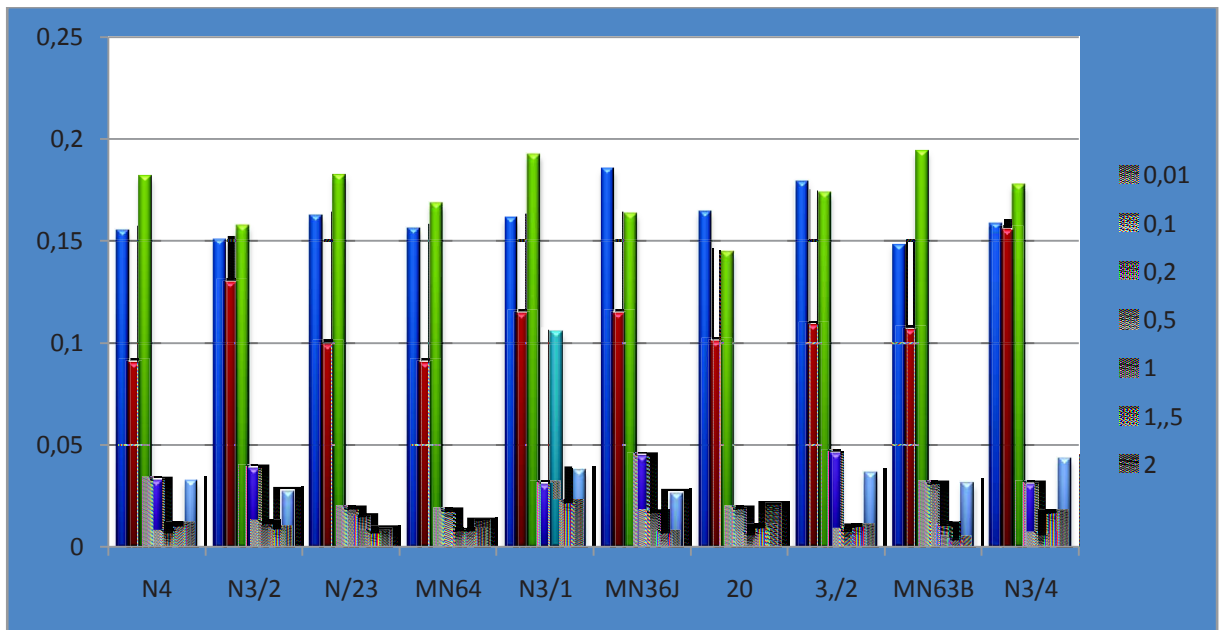


Figure.18: Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 1)

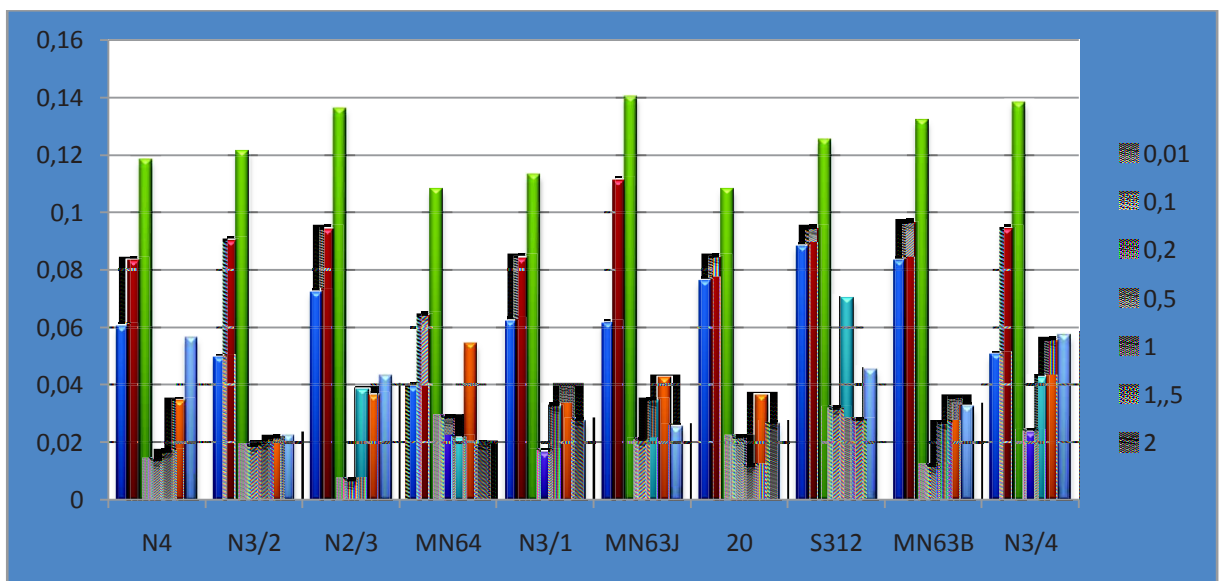


Figure.19: Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Mlila (Groupe 1)

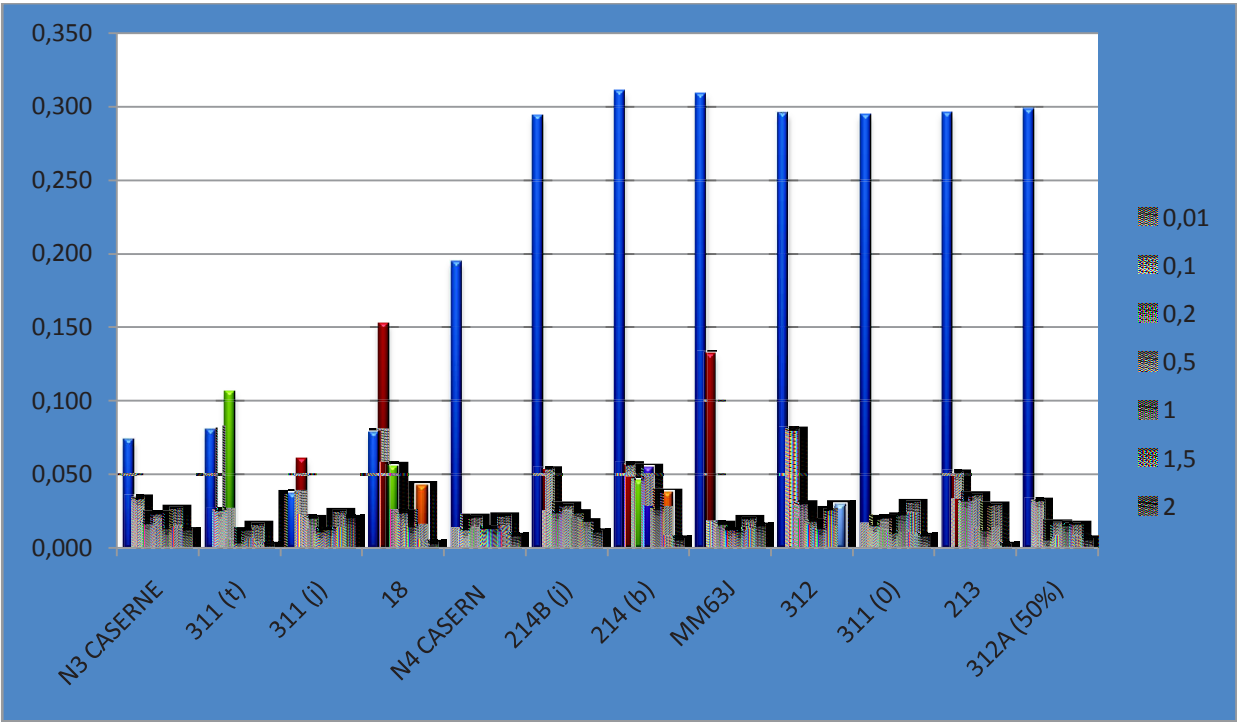


Figure.20 Tolérance au NaCl des isolats après 24h Ain Mlila (Groupe 2)

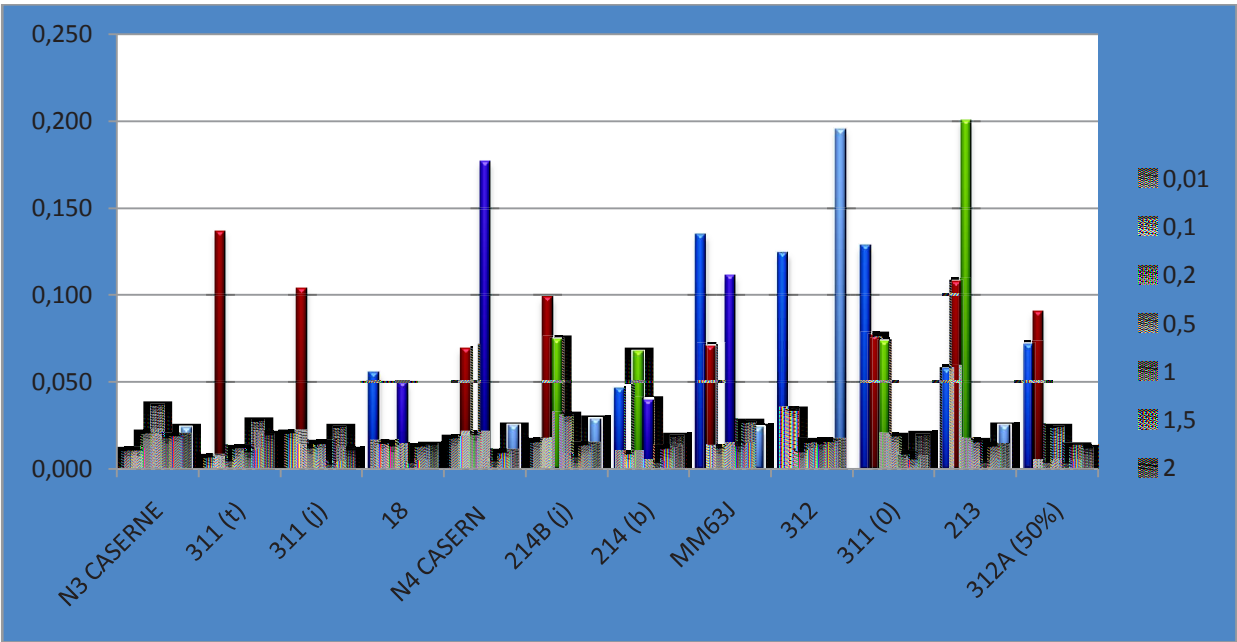


Figure.21 : Tolérance au NaCl des isolats après 48h Ain Mlila (Groupe 2)

conclusion

Notre étude se limite en une contribution à la recherche des caractéristiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires d'une espèce végétale *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites écologiquement différents: site contaminé par l'antimoine et un site halophile. D'une part, Cette caractérisation a pour but la détermination de la position taxonomique des isolats étudiés, par une étude phénotypique en présence des souches de références. D'autre part, afin d'étudier la biodiversité des bactéries isolées et voir l'effet des facteurs abiotiques sur le comportement de nos isolats.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, l'aspect des colonies et l'examen microscopique montre que les isolats ont la description des *rhizobia* ainsi que les *Gammaproteobacteria* (Benhizia, 2004).

L'effet des facteurs intrinsèques donnent l'évidence de la diversité entre les souches isolées. Cette variabilité pourrait être due aux facteurs abiotiques caractéristiques des deux sites.

Nos isolats se comportent de la même façon que les souches témoins (*Rhizobium* et *Gammaprotéobactéries*) vis-à-vis du pH, mais ne présentent pas les mêmes profils du point de vue d'NaCl.

Cette caractérisation reste quand même insuffisante afin de confirmer que ces isolats susceptibles d'appartenir à la famille des *Rhizobiaceae* ou bien à des genres ou espèce des B.N.L. Pour une position taxonomique rapprochée, il est utile de compléter ces tests par d'autres marqueurs, tels que SDS-PAGE, profil plasmidique, Séquençage du gène ADN_r 16S, Séquençage de gènes symbiotiques nifH et nodC...

Références Bibliographiques

Abaidoo R. C., George T., Bohlool B. B. and Singleton P. W. (1990): Influence of evaluation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strain on field grown soybean and common bean, Canadian Journal of Microbiology. pp. 36, 92-96.

Abdelarim H., 1984. Approche phytoécologique et phytosociologique de quelques nappes alfatières des régions de Djelfa et Tébessa . Thèse de Magister . INA. Alger . 1-19p.

Abdelguerfi-Berrekia R.,1985. Contribution à l'étude du genre *Hydisarum L.*, enAlgérie .
Thèse de Magister, option phytotechnie . I.N.A.131 p.

Abdelguerfi-Berrekia R, Abdelguerfi A.,Bounaga N., Guittonneau G.G., 1988. Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum L.* en Algérie I- Etude auto écologique. Ann Inst . Nat . Agro. El-harrach 12 :191-219.

Aguirreolea J. and Sanchez-Dýaz M. 1989. CO₂ evolution by nodulated roots in *Medicago sativa L.* under water stress. J Plant Physiol. 134: 598-602..

Benhaizia H.,2001. Etude caryologique d'une espèce endémique Nord-africaine , *Hedysarum pallidum* Desf. provenant d'un milieu contaminé par l'antimoine . thèse de magister en biologie végétale . Université de Constantine, Algérie .

Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. 2004. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Syst. Appl. Microbiol. 27: 462-468.

Bordeleau L. M. and D. Prevost. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil 161:115-124.

Bovin C.,Giraud E., L.R., Malpica C.A and Rosenberg C.,1997. Genetic analysis of the *rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of d, trigonelline a secondary metabolite present in legumes . journal of Bacteriology . 173 (9) : 2809-2817.

Breedveld M. W., Dijikema C., Zevenhuizen L. P. T. M., and A. J. B. Zehender. 1993. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. J. Gen. Microbiol. 139: 3157-3163.

- Brockwell, J., A. Pilka, and Holliday R. A. 1991.** Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* 31: 211-219.
- Bushby H. V. A. (1982):** Ecology. In Nitrogen Fixation, Vol. 2: *Rhizobium*, W. J. Broughton (Ed), Clarendon Press Oxford. pp. 35-75. 56
- Chen, H., A. E. Richardson, and B. G. Rolfe. 1993a.** Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1798-1804.
- Chen, H., E. Gartner, and B. G. Rolfe. 1993b.** Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1058-1064
- Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P., (2001)-** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1729-1735.
- Collavino M., Riccillo P.M., Grasso D.H., Crespi M., Aguilar OM. 2005.** GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti* - Alfalfa symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:742-750.
- De Lajudie P., Laurent-Fufele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M. D., Kersters K., Dreyfus B. and Gillis M. 1998a.** *Allorhizobium unicola* gen. nov; sp. nov. nitrogenfixing bacteria that efficiently nodulate *Neptuna natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1277-1290.
- De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira E., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M. D., Lindstöm K, Dreyfus B. and Gillis M. 1998b.** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 369-382.
- Djordjevic, J., Zatorre, R.J., Petrides, M. and Jones-Gotman, M. (2004)** The mind's nose: effects of odor and visual imagery on odor detection. *Psychol. Sci.*, 15, 143–148.

Dreyfus, B., Garcia, J.L., and Gills, M., (1988) - Caractérisation of *Azorhizobium Caulnodans* gen.sp.nov., a stem nodulating fixing bacterium isolated from *sesbania rostrata* Int.J.Syst.Bacteriol.**38**(1):89-98

El Sheikh E. A. and Wood M. 1989 a. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. Soil Biol. Bjochem., 21 : 883-887.

El Boutari N., Thami-Alami I., Zaïd, E. and Udupa S. 2009. Genotypic characterization of Indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sullae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses African Journal of Biotechnology 8 (6):979-985.

El-sheikh, E. A. E., and Wood M. 1989 b. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. Soil. Biol. Biochem. 21: 889-895.

Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A., and Chanawy C.P., 2008. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen

Foucher F ., and kondorosi E ., 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago .plant Molecular Biology 43:773-786

Franche C., Lindstro·m K. and Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil. 321:35-59. fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) world . j. Microbiol. Biotechnol.24 : 1187-1193.

Fujihara, S., and T. Yoneyama. 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1104-1109.

Giller K. E., McGrath S. P. and Hirsch P. R. (1989): absence of nitrogen fixation in clover grow on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only infective Rhizobium. Soil Biol. Biochem. pp. 21; 841-848.

Glenn A. R. and Dilworth M. J. 1994. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. FEMS Microbiol. Lett. 123:1-10.

Graham, P. H., K. Draeger, M. L. Ferrey, M. J. Conroy, B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Naarons, and C. Quinto. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and

Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. Can. J. Microbiol. 40, 198-207.

Germida, J. J., Siciliano S. D., de Freitas J. R. and Seid A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 43- 50.

Hannachi-Salhi A., Combes D., Battout H., Figier J., bousaid M., Marrakchi M., Trififarah N., 2004 . Evaluation des resoureces génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen . IPGRI- FAO , 130 :65 -72.

Jarvis B. D., van Berkum W. P., Chen W. X., Nour S., Fernandez M. P., Cleyet-Marrel J. C., and Gillis M. 1997. Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895-898.

Jordan, D.C. (1982)- transfert of *Rhizobium japonicum* buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov. A genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. syst. Bacteriol.* 32:136-139.

Kinkema M., Scott P.T. and Gresshoff M. 2006. Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signaling. *Func. Plant Biol.* 33:707-721.

Limpens E. et Bisseling T. 2003. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 343-350.

Liu J, Wang E.T et Chen W.X. , 2005. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis* , *Cercis Racemisa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone China . *Syst. Appl. Microbiol.* 28:465-477

Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G., and Gresshoff P.M., 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *lotus japonicus* . *Ann . Bot .* 104 :277-285

Maâtallah, J., E. B. Berraho, S. Munoz, J. Sanjuan, and C. Lluch. 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22, 321-329.

Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P. and Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 200-214.

Martens M., Delaere M., Coopman R., De Vos P., Gilli M. and Willems A . 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 489-503.

Mengel K. and Kirkby E. A (1982): Nitrogen. "In Principles of plant nutrition: International Potash Institute, K. Mengel., E. A. Kirkby eds. Woblbafen- Bern. pp. 335-328.

Mohamed, S. H., A. Smouni, M. Neyra, D. Kharchaf, and A. Filali-Matouf. 2000. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant & Soil.* 224, 171-183.

Mohammad R.M., Akhavan-Kharazian M., Campbel W.F. and Rumbaugh M.D. 1991. Identification of salt-and drought tolerant *Rhizobium meliloti* strains. *Plant Soil.* 134: 271-276.

Moulin, L., Munve , A., Dreyfus , B., and Boivin-Masson, C .,(2001) – Nodulation of legumes by members of β subclass of proteobacteria . *NATURE* . 411 / 948-950.

Mpepereki S, Makonese F, and A. G. Wollum. 1997. Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis.* 22, 275-292.

Muller S. H. and Pereira P. A. A. 1995. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant and Soil* 177, 55-61.

Munns D. N. 1977. Soil acidity and related factors. *In* J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Bose (eds.) pp. 211-236.

O'Hara, G. W., and A. R. Glenn. 1994. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 161, 286-292.

Osmond M., Miouel M , Robin P ., Conejer O. G ., Domenac A. H. M. and Bardin R. (1980) : Influence du déficit hydrique sur l'activité nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glycine max* L Merr. cv Hodgson).

Pomel N.A.,1874. Nouveaux matériaux pour la flore atlantique . Bull Soc. Hist . Afrique du Nord . 19 :48-128.

Quezel P., Santa s., 1962 : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris . France .

Rai R. 1983. The salt tolerance of Rhizobium strains and lentil genotypes and the effect of salinity on the aspects of symbiotic N-fixation. J. Agric. Sci. 100, 81-86.

Rao J.R and Cooper J.E. (1994): Rhizobium catabolizes nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. Department of applied Plant Science .17: 5409-5410.

Raza S., Jørnsgård B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L., 2001. - Tolerance of Bradyrhizobium sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Letters in Applied Microbiology 32 (6):379-383.

Ribeiro RA., Barcellos FG., Thompson F.L., Hungria M. 2009. Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. Res. Microbiol. 160: 297-306.

Rivas, Garcia. Fraible p, Velazyquez E. Taxonomy of nodulating legumes Microbiology Inseights. 2009, 2: 51-69.

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

Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE (eds) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, The Netherlands, pp 89-112.

Somasegaran P., Hoben H.Jfrq, 1994. Handbook for Rhizobia. Sringer verlage New York.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C and Dreyfus B. 2001. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. 183: 214-220.

Tak T., van Spronsen P. C., Kijne J.W., van Brussel A. A. N. and Kees Boot J. M. 2004. Accumulation of lipochitin oligosaccharides and NodD-activating compounds in an efficient plantRhizobium nodulation assay. Mol. Plant. Interac. 17: 816-823.

Van Berkum P., Elia P. and Eardly B.D. 2006. Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of Medicago-nodulating rhizobia. J. Bacteriol. 188:5570-5577.

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

Vinuesa P., Rojas-Jime'nez K., Contreras-Moreira B, Mahn S.K., Prasad B.N., Moe H., Selvaraju SB., Thierfelder H. and Werner D. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of Four Bradyrhizobium species that nodulate soybeans on the asiatic continent. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6987-6996.

Wei G.H, Zhang Z.X, Chen C, W.M et Ju W.T., 2008. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astrogalus* ,*Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. Microbiol.Researh. 163:651-662.

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

Yadav N. K. and Vyas S. R. 1973. Salt and pH tolerance of rhizobia. Folia Microbiologica 18: 242-247.

Zablotowicz R. M. and D. D. Focht. 1981. Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 679-685.

Zahran H H,, Rasanen L A., Karsisto M. and Lindström K. 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress.World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 100-105.

Références bibliographiques

Zahran H. H., and Sprent J. L. (1986): Effect sodium chloride and polyethylene glycole root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*. pp. 167;303-309.

Zahran H.H., 1999 . -*Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate*". *Microbiology and Molecular Biology Review*sp. 63(4) : 968-989.

Annexes

ANNEXE 1

Milieux de culture et solution nutritive

Composition de milieux de YMB (Yeast Manitol broth) en g/l.(Vincent,1970)

Mannitol	10.00
MgSO ₄	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillé	1000ml
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition de milieux de YMB (Yeast Manitol Agar) en g/l.(Vincent,1970)

YMB	1000 ml
Agar	15
PH	6.8

Autoclavage 120° C pendant 20 minutes

Annexe

Composition de milieu YMA+Carbonate de calcium en g l (Vincent,1970)

YMB	1000ml
CaCO ₃	1
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition de la solution nutritive en g l (Fahreurs,1957)

CaCl ₂	0.10
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.10
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro élément	1 ml
Solution miro élément g l	
H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ 5H ₂ O	0.22
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.14
PH	6.8

Autolavage 120°C pendant 20 minutes

Annexe

Le milieu de Gloux et rudulier (1989)

La composition chimique de ce milieu de culture est :

Solution A (g l d'eau distillée)

KH_2PO_4	0.30
NaHPO_4	0.30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05

Solution B (mg l d'eau distillée)

H_3BO_3	10
ZnSO_4	1.0
CuSO_4	1.0
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5

Et Aussi :

Biotine	20 μg
Acide aspartique	100mg
Acide lactique	0.74 g

Annexe

Préparation du milieu

Mélanger 100ml de la solution A avec 20 ml de la solution B

Ajouter l'acide lactique et l'acide aspartique

Compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée

Ajuster le Ph à 7.0

Stérilisation à l'autoclave : 20 minutes à 120°C

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu

ANNEXE 02

Coloration de Gram

Préparer des frottis à partir des cultures sur YMA, on prépare des lames bien étalées en couche mince, séchées et fixées, puis colorées selon les étapes suivantes :

- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- Chasser le violet avec du lugol, ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30 secondes
- Décolorer au mélange alcool-acétone (v\v) jusqu'à la décoloration totale du frottis.
- Laver à l'eau de robinet courante.
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1 minute.
- Laver à l'eau, sécher la lame et observer à immersion à m'objectif *100

Annexe

ANNEXE 3

PH/SOUCHES	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
S3	0,290	0,336	0,436	0,469	0,447	0,367	0,401	0,393	0,417	0,370	0,273
S41	0,473	0,615	0,566	0,663	0,587	0,549	0,654	0,590	0,493	0,464	0,215
N45B	0,292	0,581	0,523	0,419	0,544	0,761	0,354	0,400	0,503	0,507	0,450
N42	0,357	0,304	0,502	0,480	0,578	0,600	0,790	0,612	0,629	0,520	0,590
N46J	0,227	0,150	0,248	0,235	0,196	0,196	0,276	0,306	0,277	0,296	0,298
N45J(50%)	0,255	0,257	0,298	0,323	0,286	0,321	0,344	0,411	0,293	0,551	0,365
N45J(30%)	0,215	0,320	0,487	0,606	0,465	0,366	0,492	0,503	0,243	0,472	0,312
s42	0,386	0,565	0,728	0,673	0,662	0,662	0,692	0,682	0,420	0,686	0,536
n1	0,194	0,184	0,394	0,245	0,228	0,227	0,294	0,304	0,314	0,272	0,250
n46b	0,277	0,190	0,236	0,236	0,217	0,204	0,279	0,307	0,305	0,303	0,335
N2	0,266	0,223	0,310	0,334	0,357	0,304	0,392	0,298	0,407	0,342	0,294
N44	0,207	0,324	0,487	0,346	0,332	0,307	0,346	0,326	0,284	0,289	0,274
N41	0,430	0,409	0,008	0,477	0,454	0,387	0,478	0,419	0,394	0,254	0,275
N43 CENT	0,056	0,127	0,164	0,176	0,208	0,554	0,539	0,581	0,290	0,532	0,026
N43(1) 50%	0,510	0,491	0,302	0,341	0,388	0,383	0,407	0,199	0,110	0,108	0,089

Tableau 1 : Tolérance au pH des isolats après 24H Ain Bebouche.

Annexe

Souches/Ph	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
S3	0,29	0,336	0,436	0,469	0,447	0,367	0,401	0,393	0,417	0,37	0,73
S41	0,473	0,615	0,566	0,663	0,587	0,549	0,654	0,59	0,493	0,464	0,215
N45B	0,292	0,581	0,523	0,419	0,544	0,761	0,354	0,4	0,503	0,507	0,45
N42	0,357	0,304	0,502	0,48	0,578	0,6	0,79	0,612	0,629	0,52	0,59
N46J	0,227	0,15	0,248	0,235	0,196	0,196	0,276	0,306	0,277	0,296	0,298
N45J(50%)	0,255	0,257	0,298	0,323	0,286	0,321	0,344	0,411	0,293	0,551	0,365
N45J(30%)	0,215	0,32	0,487	0,606	0,465	0,366	0,492	0,503	0,243	0,472	0,312
s42	0,386	0,565	0,728	0,673	0,662	0,662	0,692	0,682	0,42	0,686	0,536
n1	0,194	0,184	0,394	0,245	0,228	0,227	0,294	0,304	0,314	0,272	0,25
n46b	0,277	0,19	0,236	0,236	0,217	0,204	0,279	0,307	0,305	0,303	0,335
N2	0,266	0,223	0,31	0,334	0,357	0,304	0,392	0,298	0,407	0,342	0,294
N44	0,207	0,324	0,487	0,346	0,332	0,307	0,346	0,326	0,284	0,289	0,274
N41	0,43	0,409	0,008	0,477	0,454	0,387	0,478	0,419	0,394	0,254	0,275
N43 CENT	0,056	0,127	0,164	0,176	0,208	0,554	0,539	0,581	0,29	0,532	0,026
N43(1) 50%	0,51	0,491	0,302	0,341	0,3882	0,383	0,407	0,199	0,11	0,108	0,089

Tableau 2 : Tolérance au pH des isolats après 48H Ain Bebouche.

ph	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
N2/3	0,321	0,333	0,185	0,538	0,381	0,58	0,424	0,494	0,49	0,466	0,42
M3/4	0,332	0,325	0,389	0,66	0,431	0,655	0,511	0,482	0,566	0,43	0,299
MN62J	0,202	0,216	0,214	0,571	0,344	0,436	0,304	0,391	0,628	0,335	0,251
MN63J	0,239	0,271	0,306	0,726	0,408	0,663	0,437	0,453	0,593	0,47	0,308
MN64J	0,225	0,155	0,226	0,645	0,276	0,498	0,36	0,346	0,003	0,315	0,251
312/A(50%)	0,414	0,431	0,399	0,854	0,44	0,638	0,496	0,589	0,65	0,541	0,495
N3/1	0,435	0,433	0,493	0,812	0,479	0,583	0,559	0,581	0,731	0,567	0,543
3N12	0,308	0,457	0,325	0,591	0,652	0,548	0,469	0,498	0,521	0,461	0,405
2N4/(t)	0,013	0,029	0,203	0,019	0,012	0,011	0,331	0,027	0,005	0,033	0,03

Tableau 3 : Tolérance au pH des isolats après 24H Ain Mlila.

Annexe

souches/ph	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
N2/3	0,405	0,358	0,619	0,589	0,432	0,255	0,501	0,257	0,305	0,284	0,169
M3/4	0,645	0,521	0,783	0,671	0,631	0,616	0,589	0,36	0,391	0,451	0,438
MN62J	0,565	0,331	0,776	0,634	0,49	0,401	0,57	0,28	0,485	0,337	0,181
MN63J	0,439	0,452	0,844	0,731	0,558	0,546	0,693	0,342	0,336	0,466	0,352
MN64	0,438	0,245	0,589	0,665	0,404	0,329	0,468	0,441	0,006	0,383	0,191
312/A(50%)	0,711	0,658	0,862	0,698	0,706	0,653	0,853	0,596	0,447	0,503	0,367
N3/1	0,783	0,551	0,805	0,663	0,675	0,63	0,664	0,485	0,439	0,442	0,463
3N12	0,446	0,505	0,735	0,629	0,686	0,488	0,641	0,524	0,361	0,491	0,31
2N4/(t)	0,485	0,400	0,331	0,004	0,475	0,01	0,006	0,026	0,019	0,02	0,038

Tableau 4 : Tolérance au pH des isolats après 48H Ain Milila

SOUCHES/PH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
MN63B	0,518	0,617	0,526	0,435	0,555	0,478	0,575	0,532	0,599	0,698	0,706
S20	0,392	0,506	0,583	0,534	0,448	0,479	0,602	0,597	0,586	0,691	0,641
S213	0,155	0,192	0,248	0,267	0,195	0,306	0,398	0,413	0,165	0,327	0,015
214B(0)	0,334	0,458	0,44	0,43	0,467	0,468	0,519	0,579	0,512	0,699	0,664
311(0)	0,171	0,28	0,014	0,279	0,283	0,274	0,378	0,328	0,323	0,441	0,398
N4	0,336	0,641	0,598	0,465	0,440	0,414	0,576	0,592	0,599	0,72	0,759
N3/2	0,011	0,027	0,027	0,036	0,078	0,168	0,272	0,245	0,223	0,011	0,038
311J	0,27	0,576	0,483	0,537	0,506	0,633	0,689	0,517	0,58	0,739	0,215
S312	0,267	0,628	0,532	0,367	0,461	0,568	0,69	0,63	0,677	0,807	0,363
311(t)	0,013	0,032	0,039	0,126	0,025	0,399	0,252	0,02	0,035	0,060	0,023
18S	0,169	0,245	0,269	0,248	0,007	0,309	0,202	0,224	0,265	0,211	0,235
214B (t)	0,021	0,197	0,197	0,296	0,260	0,297	0,094	0,205	0,261	0,142	0,019

Tableau 5 : Tolérance au Ph des isolats après 24H Ain Milila (Groupe 2)

Annexe

SOUCHES/PH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
MN63B	0,76	0,497	0,58	0,599	0,554	0,671	0,666	0,708	0,752	0,656	0,76
S20	0,802	0,635	0,789	0,693	0,671	0,02	0,628	0,689	0,651	0,594	0,635
S213	0,491	0,362	0,26	0,325	0,321	0,391	0,356	0,398	0,352	0,333	0,037
B(0)	0,732	0,529	0,532	0,696	0,592	0,547	0,586	0,675	0,513	0,628	0,695
311(0)	0,504	0,012	0,337	0,439	0,352	0,371	0,311	0,42	0,392	0,573	0,631
N3/2	0,015	0,015	0,006	0,751	0,542	0,215	0,288	0,781	0,007	0,527	0,063
N4	0,764	0,571	0,56	0,747	0,641	0,679	0,669	0,669	0,658	0,708	0,893
311J	0,564	0,585	0,704	0,657	0,652	0,772	0,77	0,741	0,702	0,679	0,088
S312	0,844	0,816	0,93	0,847	0,779	0,721	0,693	0,728	0,683	0,805	0,744
311(t)	0,009	0,663	0,171	0,041	0,496	0,578	0,795	0,277	0,281	0,479	0,040
18S	0,51	0,455	0,353	0,311	0,469	0,452	0,179	0,252	0,107	0,136	0,069
214B(t)	0,458	0,743	0,445	0,288	0,531	0,435	0,285	0,436	0,337	0,198	0,020

Tableau 6 : Tolérance au pH des isolats après 48H Ain Mlila (Groupe 2).

SOUCHES / PH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
76T Mesorhizob	0,266	0,274	0,281	0,281	0,288	0,338	0,244	0,309	0,365	0,250	0,257
Sam12 Rhizob	0,244	0,286	0,398	0,325	0,381	0,490	0,336	0,474	0,466	0,356	0,269
Gamma 10	0,251	0,216	0,265	0,365	0,261	0,342	0,277	0,403	0,291	0,283	0,289
Gamma 6	0,168	0,319	0,324	0,293	0,280	0,394	0,290	0,353	0,375	0,316	0,283

Tableau 7 : Tolérance au pH des isolats (Souches Témoins) après 24H

souches/ph	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
Sam12 Rhizob	0,476	0,793	0,548	0,547	0,557	0,681	0,654	0,562	0,521	0,506	0,305
Gamma 10	0,358	0,597	0,654	0,482	0,446	0,637	0,023	0,587	0,479	0,402	0,258
Gamma 6	0,488	0,694	0,621	0,539	0,341	0,571	0,541	0,520	0,524	0,481	0,197
76T Mesorhizob	0,178	0,466	0,326	0,297	0,359	0,371	0,407	0,375	0,364	0,395	0,387

Tableau 7 : Tolérance au pH des isolats (Souches Témoins) après 48H

Annexe

NACL(mm)/SOUCHES	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
N42	0,055	0,061	0,071	0,079	0,011	0,044	0,005
S3	0,068	0,096	0,083	0,049	0,014	0,015	0,036
N45J(50%)	0,087	0,099	0,08	0,079	0,018	0,004	0,006
N43(cent)30%	0,006	0,125	0,041	0,023	0,009	0,028	0,013
N43(1)	0,071	0,068	0,107	0,105	0,024	0,01	0,021
N45J(30%)	0,127	0,13	0,177	0,083	0,028	0,013	0,036
S42	0,095	0,106	0,084	0,116	0,016	0,01	0,019
N44	0,039	0,142	0,073	0,049	0,048	0,013	0,02
N41	0,07	0,104	0,065	0,059	0,014	0,031	0,005
N1	0,055	0,107	0,07	0,024	0,021	0,043	0,006
N2	0,074	0,11	0,126	0,083	0,043	0,018	0,017
N46B	0,052	0,062	0,041	0,029	0,016	0,031	0,019
N46J	0,063	0,087	0,054	0,065	0,018	0,032	0,022
N45b	0,061	0,111	0,09	0,041	0,025	0,022	0,034
S41	0,084	0,095	0,055	0,130	0,016	0,012	0,015

Tableau 9 : Tolérance au Nacl des isolats après 24H Ain Bebouche .

NACL(mm)/SOUCHES	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
N42	0,069	0,122	0,096	0,036	0,017	0,032	0,024
S3	0,114	0,102	0,136	0,06	0,017	0,014	0,021
N45J(50%)	0,085	0,059	0,099	0,035	0,011	0,015	0,019
N43(cent)30%	0,083	0,033	0,138	0,024	0,008	0,03	0,01
N43(1)	0,117	0,063	0,16	0,046	0,02	0,024	0,033
N45J(30%)	0,161	0,134	0,112	0,052	0,044	0,037	0,023
S42	0,209	0,186	0,188	0,1	0,011	0,038	0,005
N44	0,087	0,091	0,126	0,065	0,017	0,002	0,034
N41	0,152	0,128	0,121	0,022	0,047	0,017	0,007
N1	0,149	0,188	0,083	0,115	0,037	0,02	0,027
N2	0,078	0,103	0,102	0,088	0,021	0,022	0,032
N46B	0,105	0,099	0,117	0,026	0,003	0,02	0,002
N46J	0,116	0,088	0,1	0,017	0,019	0,027	0,045
N45B	0,094	0,102	0,105	0,146	0,011	0,007	0,007

Annexe

S41	0,188	0,133	0,158	0,085	0,018	0,027	0,009
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tableau 10 : Tolérance au Nacl des isolats après 48H Ain Bebouche

nacl(mm)/souches	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,,5	2
N4	0,155	0,09	0,181	0,032	0,006	0,01	0,032
N3/2	0,15	0,129	0,157	0,038	0,011	0,008	0,027
N/23	0,162	0,099	0,182	0,018	0,014	0,006	0,008
MN64	0,156	0,09	0,168	0,017	0,007	0,007	0,012
N3/1	0,161	0,114	0,192	0,03	0,105	0,021	0,037
MN36J	0,185	0,114	0,163	0,044	0,016	0,006	0,026
20	0,164	0,1	0,144	0,018	0,005	0,009	0,02
3,/2	0,179	0,108	0,173	0,045	0,007	0,009	0,036
MN63B	0,148	0,106	0,194	0,03	0,01	0,003	0,031
N3/4	0,158	0,155	0,177	0,03	0,005	0,016	0,043

Tableau 11 : Tolérance au Nacl des isolats après 24H Ain Mlila (Groupe2)

souches/Nacl(mm)	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,,5	2
N4	0,06	0,083	0,118	0,013	0,016	0,034	0,056
N3/2	0,049	0,09	0,121	0,018	0,019	0,021	0,022
N2/3	0,072	0,094	0,136	0,006	0,038	0,036	0,043
MN64	0,039	0,064	0,108	0,028	0,021	0,054	0,019
N3/1	0,062	0,084	0,113	0,016	0,032	0,039	0,027
MN63J	0,061	0,111	0,14	0,02	0,034	0,042	0,025
20	0,076	0,084	0,108	0,021	0,011	0,036	0,026
S312	0,088	0,094	0,125	0,031	0,07	0,027	0,045
MN63B	0,083	0,096	0,132	0,011	0,026	0,035	0,032
N3/4	0,05	0,094	0,138	0,023	0,042	0,055	0,057

Tableau 12 : Tolérance au Nacl des isolats après 48H Ain Mlila (Groupe2)

Annexe

souches/nacl	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
N3 CASERNE	0,073	0,033	0,016	0,022	0,012	0,026	0,011
311 (t)	0,08	0,024	0,106	0,003	0,011	0,015	0,001
311 (j)	0,036	0,06	0,019	0,01	0,011	0,024	0,019
18	0,078	0,152	0,055	0,023	0,013	0,042	0,002
N4 CASERN	0,194	0,011	0,02	0,012	0,012	0,021	0,007
214B (j)	0,293	0,052	0,022	0,028	0,023	0,017	0,01
214 (b)	0,31	0,055	0,045	0,054	0,025	0,037	0,005
MM63J	0,308	0,131	0,015	0,011	0,01	0,019	0,014
3120	0,295	0,079	0,029	0,017	0,012	0,025	0,029
311 (0)	0,294	0,014	0,019	0,009	0,021	0,03	0,007
213	0,295	0,05	0,03	0,035	0,010	0,028	0,001
312A (50%)	0,298	0,031	0,005	0,016	0,014	0,015	0,005

Tableau 13 : Tolérance au Nacl des isolats après 24H Ain Mlila (Groupe1)

souches/nacl	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
N3 CASERNE	0,01	0,01	0,02	0,036	0,017	0,018	0,023
311 (t)	0,006	0,136	0,004	0,011	0,009	0,027	0,019
311 (j)	0,02	0,103	0,011	0,014	0,002	0,023	0,01
18	0,055	0,014	0,012	0,049	0,003	0,012	0,013
N4 CASERN	0,017	0,069	0,019	0,176	0,004	0,009	0,024
214B (j)	0,015	0,098	0,074	0,03	0,006	0,013	0,028
214 (b)	0,046	0,008	0,067	0,039	0,003	0,011	0,018
MM63J	0,134	0,07	0,011	0,111	0,012	0,026	0,023
3120	0,124	0,033	0,009	0,015	0,014	0,015	0,195
311 (0)	0,128	0,076	0,073	0,018	0,008	0,005	0,019
213	0,057	0,107	0,2	0,015	0,003	0,012	0,024
312A (50%)	0,071	0,09	0,003	0,023	0,003	0,0125	0,011

Tableau 14 : Tolérance au Nacl des isolats après 48H Ain Mlila (Groupe1)

Annexe

SOUCHES/NaCl	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
Sam12 Rhizob	0,017	0,080	0,072	0,023	0,033	0,037	
Gamma10	0,030	0,086	0,110	0,025	0,042	0,045	0,029
Gamma 6	0,021	0,083	0,118	0,020	0,036	0,040	0,025
76 T Mesorhizob	0,039	0,091	0,119	0,004	0,019	0,026	0,034

Tableau 17 : Tolérance au Nacl Souches témoins après 24H

souches/Nacl(mm)	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
Sam12 Rhizob	0,117	0,079	0,160	0,048	0,006		0,029
Gamma10	0,118	0,081	0,168	0,027	0,001	0,022	0,028
Gamma 6	0,124	0,109	0,172	0,034	0,011	0,012	0,015
76 T Mesorhizob	0,159	0,070	0,171	0,017	0,007	0,008	0,033

Tableau 18 : Tolérance au Nacl Souches témoins après 48H

L'effet des facteurs abiotiques sur le contenu Nodulaire d'une espèce fourragère *Hedysarum pallidum* Desf. poussant dans deux régions différents

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

La présente étude est une contribution à la caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules racinaires d'une espèce végétale *Hedysarum pallidum* récolter des deux sites différents pour réaliser une comparaison para-port à l'effets des facteurs abiotiques (pH et NaCl) dans le but de voir s'ils ont le même comportement physiologique sur les isolats .

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, des tests biochimiques nutritionnels et physiologiques ainsi qu'une détermination de la résistance et de la sensibilité des souches aux pH et la salinité.

Les résultats obtenus montre que nos isolats se comportent de la même façon que les souches témoins vis-à-vis au pH, mais ne présente pas les mêmes profils du point de vue d' NaCl.

Cette étude reste insuffisante afin de confirmer que ces isolats susceptible d'appartenir à la famille des des Rhizobiaceae ou bien à d'autre genres ou espèce des B.N.L.pour une position taxonomique rapproché, il est utile de compléter ces tests par d'autres marqueurs, tels que SDS-PAGE, Séquençage du gène ADN_r16S.

Mots clés : *Hedysarum pallidum* Desf. Légumineuse , Caractérisation , Bactéries

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature de la vie, Université Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme *Alatou.Radia* (Maitre de conférences - UFM Constantine).

Rapporteur : M Benhizia.Yacine (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : Mme Riah nassira (Maitre de conférences - UFM Constantine).

Date de soutenance : 12/06/2016