



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

**FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE**

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : OUADAHI Islam.

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie

FILIERE : Sciences Agronomiques

OPTION : Améliorations des plantes et biotechnologie.

Thème

***Les Rhizobiums isolés à partir les nodules du Fève (Vicia faba) :
Identification, partielle caractérisation et la mise en évidence de
l'activité anti fongique***

Jury de soutenance :

M ^{lle} . MARFOUA Mériem	MAA	Président
M ^{me} . TOUATI Sihem	MAA	Examineur
M ^{lle} . AMEUR Djamilia	MAA	Encadreur

Promotion : Juin 2015

OUADAHI Islam

Thème : « les *Rhizobiums* isolés à partir des nodules de Fève (*Vicia faba*) :

Identification, partielle caractérisation et la mise en évidence de l'activité antifongique»

Résumé

Selon leurs caractères morphologiques, nous avons isolé et purifié 24 isolats obtenus à partir des nodules de trois échantillons de *Vicia faba* issus de trois zones arides de la wilaya de Laghouat, L'identification préliminaire des isolats, selon leur caractéristiques physiologiques et biochimiques, a montré que six isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) répondant aux caractéristiques du genre *Rhizobium* après coloration de Gram. Divers tests physiologiques et biochimiques (sels, pH, température, galerie API) ont été effectués sur les six isolats et les résultats montrent que l'ensemble des isolats ont présenté des critères physiologiques similaires et des critères biochimiques propres à chacun des isolats. L'activité antifongique de ces six isolats était étudiée vis-à-vis de trois champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*) sur le milieu PDA. L'essai a révélé que deux isolats (FA1 et FN6) ont des activités antifongiques intéressantes respectivement (82% et 74%) sur l'inhibition de croissance mycélienne des champignons. Ces résultats montrent que les six isolats ont des caractères morphologique, physiologique et biochimique qui répond aux caractères de *Rhizobium*, mais cette identification reste préliminaire et insuffisante pour conclure, pour cela nous suggérons de confirmer ces résultats par des techniques plus précises. Ainsi d'étudier leur potentiel protecteur vis-à-vis d'autres agents phytopathogènes en raison de leurs importantes activités antifongiques.

Mots-clé : Fève, *Rhizobium*, Identification, Activité antifongique.

العنوان : «ال *Rhizobiums* المعزولة من عقيدات الفول « *Vicia faba* » : تحديد , تخصيص جزئي و الكشف عن النشاط المضاد للفطريات

ملخص

وفقا لمواصفاتهم المورفولوجية، تم عزل أربعة و عشرون (24) عزلة تم الحصول عليها من العقيدات من ثلاث عينات من نبات الفول من ثلاث مناطق من ولاية الأغواط ،. أثبتت الدراسة الأولية ما قبل تحديد الهوية أن ستة عزلات (FN6 و FA3, FA1,FA11, FN5, FG3) من أصل أربعة و عشرون لديهم مواصفات *Rhizobiums* واعتبرت العزلات الثمانية عشر المتبقية بكتيريا غير *Rhizobiums* وهذا بسبب تصنيفهم لشكل المكورات، وقد أجريت العديد من الاختبارات الفيزيولوجية والبيوكيميائية (الملح، درجة الحموضة، درجة الحرارة و صفيحة API)، على العزلات الستة و قد اثبتت أن المعزولات متشابهة لحد ما في الإختبارات الفيزيولوجية، وتختلف الواحدة منها عن الأخرى في الإختبارات البيوكيميائية، و قد قمنا أيضا بإجراء فحص تجربة ضد ثلاثة فطريات ممرضة للنبات *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*) و قد أثبتت النتائج أن كل العزلات كان لها نشاط فعال على النمو الفطري بنسب متفاوتة.

وتشير هذه النتائج إلى أن للستة عزلات صفات مورفولوجية وفسولوجية وبيوكيميائية تجتمع في خصائص بكتريا *Rhizobiums* ، ولكن هذا التحديد الأولي غير كافي، لذلك نقترح تأكيد هذه النتائج من خلال تقنيات أكثر تحديدا . و كذا دراسة قدرتها ضد النمو الفطري لفطريات اخرى بسبب نشاطها المضاد الكبير بهم.

الكلمات الدالة : الفول، التعريف ، نشاط ضد الفطريات ، *Rhizobiums*,

OUADAHI Islam

Title: « The *Rhizobium* isolated from the nodules of bean (*Vicia faba*): Identification, partial characterization and demonstration of the antifungal activity »

Abstract

According to their morphological characters, 24 isolates were isolated from nodules of three samples of *Vicia faba*, from three of the arid province (Laghouat), the preliminary identification of the isolates according to their physiological and biochemical characteristics, showed that six isolates (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 and FN6) have the characteristics of the genus *Rhizobiums*, and eighteen isolates were considered non-rhizobial bacteria and this due to their cocci form. Various physiological and biochemical tests (salt, pH, temperature, API gallery) were performed on six isolates and the results show that all this isolates presented a similar physiological and biochemical criteria specific to each of the isolates. The antifungal activity of the six isolates was examined against three phytopathogenic fungi on PDA medium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium pseudograminearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*). This tests have proven that two isolats (FA1 and FN6) have interesting antifungal activities respectively (82% and 74%) on the inhibition of mycelial growth of fungi.

These results show that the six isolates of morphological, physiological and biochemical characters are similar in the characteristics of *Rhizobium*. But this is a preliminary identification and insufficient to conclude, therefore we suggest to confirmed these results by more specific techniques, by studying their protective potential against other phytopathogenic agents in the reason of their significant antifungal activity.

Key-word: Bean, *Rhizobiums*, Identification, Antifungal activity.

Dédicace

*Tout d'abord je remercie DIEU, d'avoir pu
achever ce*

*Modeste mémoire, que j'espère qu'en le
consultant vous*

Trouvez un sentiment de joie.

Je tiens à dédier ce travail à :

*Mes très chers parents : **SMAIN** et **DJELLOULI***

***AICHA**, pour tous leurs efforts, leur soutien*

Sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je

voudrais leur exprimer ma reconnaissance

Et ma profonde affectation.

*Mes sœurs et mon frère **ABDELNOUR***

Et toute la famille de près ou de loin.

Je tiens aussi à remercier nos amis de la

*promotion surtout: **NAAS, ABDELKADER,***

ABDO, HICHAM, DADI, AISSA, ILYES,

HAMID, RACHID, HADJER, ZAHRA, FOUAD,

BOUALEM, ALI, YUCEF.

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

La première personne que je tiens à remercier est mon encadrant M^{me}. AMEUR DJAMILA pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

J'exprime ma profonde reconnaissance à tous les membres du Jury MARFOUA. M et TOUATI. S qui sont aussi nos enseignants nous leurs devient un grand respect.

Je tiens à saisir cette occasion et adresser mes sincères remerciements aux corps professoral de département d'agronomie pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Sommaire

<i>Résumé</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>Remerciements</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste de figures</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
INTRODUCTION	01
<i>Chapitre I : Revue bibliographiques</i>	
I. LA RHIZOSPHERE	03
I.1. Interaction plante- microorganisme	03
I.2. Les bactéries fixatrices d'azote	04
I.2.1. Les bactéries fixatrices libres	04
I.2.2. Les bactéries fixatrices symbiotiques	05
II. LES RHIZOBIUM	06
III. INFECTION ET LA NODULATION	09
III.1. Morphologie des nodules	09
III.1.1. Nodules déterminés	10
III.1.2. Nodules indéterminés	10
III.2. Infection	11
III.2.1. Les gènes de la nodulation.....	11
III.2.2. Echange de signaux	11
III.2.3. Processus d'infection	12
III.3. Nodulation	13
III.3.1. La leghémoglobine	13
III.3.2. La nitrogénase.....	14
IV. LES FACTEURS AGISSANT SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE	14
IV.1. Facteurs internes	14
IV.2. Les facteurs externes	15
IV.2.1. La température	15
IV.2.2. La lumière	15
IV.2.3. L'eau	15
IV.2.4. La salinité	16
IV.2.5. Le pH	16
IV.2.6. L'azote	16
V. LE CYCLE DE L'AZOTE DANS LE SOL	16
V.1. L'azote dans le sol	16
V.2. Les sources d'azote du sol	17
V.2.1. Une source atmosphérique N ₂	17
V.2.2. Une source organique	17
V.2.3. Une source synthétique	17
V.3. Les forme de l'azote du sol	17
V.3.1. L'azote organique	17
V.3.2. L'azote ammoniacal	18
V.3.3. L'azote nitrique	18
V.4. Transformation de l'azote dans le sol	18
V.4.1. Humification	18
V.4.2. Minéralisation	18
V.5. Les voies de pertes d'azote dans le sol	19

V.5.1. La dénitrification	19
V.5.2. Volatilisation de l'azote ammoniacal	19
V.5.3. Lessivage	20
VI. RHIZOBIUM ET LUTTE BIOLOGIQUE	21
VI.1. Notion de la lutte biologique	21
VI.2. Rôle de Rhizobium en lutte biologique	21
VI.2.1. Antagonisme entre Rhizobium et flore microbienne (antibiose)	22
VI.2.2. Compétition	22
VI.2.3. Le parasitisme (Hydrolases)	23
VI.2.4. Production de Sidérophores	23
VI.2.5. L'induction des mécanismes de la résistance chez la plante	23

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. ISOLEMENT DES RHIZOBIUMS	25
I.1. Origine des échantillons	25
I.2. Présentation des caractéristiques édaphiques des régions d'échantillonnage ..	25
II. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ISOLATS	26
II.1. Isolement des bactéries	27
II.1.1. Désinfections des nodules	27
II.1.2. Technique d'isolement	27
II.1.3. Validité de la désinfection superficielle	28
II.2. Purification et conservations des isolats	28
II.2.1. Méthode de purification	28
II.2.2. Conservation des isolats	28
III. IDENTIFICATION DES ISOLATS	29
III.1. Identification morphologique des isolats	29
III.2. Tests de Gram	30
III.2.1. Test KOH	30
III.2.2. Coloration de Gram	30
III.3. Identification biochimique des isolats	31
III.3.1. réaction aux milieux de culture	31
IV. CARACTERISATION DES ISOLATS	32
IV.1. Tests de la tolérance des sels	32
IV.2. Tests de la tolérance au pH	32
IV.3. Résistance aux températures	32
IV.4. Test Oxydase	33
IV.5. La galerie API 20 NE	33
V. ACTIVITE ANTIFONGIQUE	34
VI. ANALYSE STATISTIQUE	38

Chapitre III : Résultats et discussion

I. RESULTATS	39
I.1. Isolement et purification des bactéries	39
I.1.1. Validité de la désinfection superficielle	40
I.2. Identification des isolats	40
I.2.1. Identification morphologique des isolats	40
I.2.2. Test de Gram	42
I.2.3. Identification biochimique des isolats	43
I.3. caractérisation des isolats	45
I.3.1. Tests de la tolérance des sels	45

I.3.2. Tests de tolérance au pH	47
I.3.3. Résistance aux différentes températures	48
I.3.4. La galerie API 20 NE	49
I.4. Activités anti fongiques	51
II. DISCUSSION	53
<i>Conclusion</i>	<i>59</i>
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	07
Tableau 2. Table de lecture de la galerie API 20 NE	37
Tableau 3. Résultats de caractéristiques morphologiques des isolats	41
Tableau 4. Résultats de test KOH et Gram	42
Tableau 5. Résultats de caractéristiques physiologiques des isolats	43
Tableau 6. Résultats de tolérances des isolats aux cinq sels et leurs concentrations	46
Tableau 7. Résultats de test de tolérance des isolats à la variation du pH	47
Tableau 8. Résultats du test de la résistance des isolats à la variation de température	48
Tableau 9. Résultats du tests de galerie API20 NE	50

Liste des figures

Figure 1. Une nodosité de légumineuse	10
Figure 2. Schéma du cycle de l'azote	20
Figure 3. Nodules des bactéries fixatrices d'azote	26
Figure 4. Méthodes de purification des <i>Rhizobium</i> selon Somasegaran et Hoben, 1985 .	29
Figure 5. Technique du test antifongique <i>in vitro</i>	35
Figure 6. Protocole de la galerie API 20 NE.....	36
Figure 7. Isolats de <i>Rhizobium</i>	39
Figure 8. Validité de la désinfection superficielle	40
Figure 9. Résultats des isolats sur les quatre milieux de culture	44
Figure 10. Résultats de taux d'inhibition des isolats de <i>Rhizobium</i> sur la croissance mycélienne de : <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>albedinis</i> ; <i>Fusarium pseudograminearum</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopercisi</i>	52

Liste des abréviations

YMA :	Yeast Extract Mannitol Agar	pH :	potentiel d'hydrogène
TRP :	L-tryptophane	g/l :	gram par litre
PNPG :	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	°C :	degré Celsius
<u>GLU</u> :	D-glucose	NO₃ :	nitrate de potassium
<u>ADH</u> :	L-arginine	I :	taux d'inhibition
<u>URE</u> :	urée	% :	pourcentage
ESC :	esculine	ANOVA :	Analysis of variance
PDA:	<i>Potato dextrose agar</i>	GEL:	Gelatine
FOA :	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	GLU:	Glucose
FOL :	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	ARA:	Arabinose
FP :	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	GLU :	D-glucose
RC :	Rouge Congo	ARA:	L-arabinose
BTB :	Bleu de Bromothymol	MNE:	D-mannose
BCP :	Pourpre de Bromocresol	MAN:	D-mannitol
GPA :	Glucose-Peptone-Agar	NAG :	N-acetyl-glucosamine
KOH:	hydroxyde de <u>potassium</u>	MAL:	D-maltose
mm:	millimeter	GNT :	potassium gluconate
G- :	Gram négative	CAP :	acide caprique
µl :	micro mètre	ADI :	acide adipique
G+ :	Gram positive	MLT :	acide malique
NaCl:	chlorure de sodium	CIT :	trisodium citrate
CaCl₂:	chlorure de calcium	PAC :	acide phénylacétique
K₂SO₄:	sulfate de potassium	API :	Analytical Profile Index
N₂SO₄:	sulfate d'ammonium	cm :	Centimeter
KCl:	chlorure de potassium		

Introduction

I. INTRODUCTION

La production végétale et le rendement sont deux critères liés au potentiel de la plante, aussi les conditions environnementales peuvent également contribuer à augmenter cette production (techniques culturales, apport d'engrais,...). Les communautés microbiennes telluriques, qui jouent un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et d'autres éléments, exercent également des effets bénéfiques ou délétères sur la croissance et la santé des plantes (Gobat et *al.*, 2003).

Les interactions positives entre les plantes et les microorganismes de la rhizosphère peuvent améliorer la nutrition des plantes, en augmentant en particulier la fixation biologique de l'azote, en augmentant la tolérance de la plante au stress environnemental et aux pathogènes telluriques réduisant ainsi les besoins d'application d'engrais et de pesticides comme l'augmentation du rendement est une préoccupation majeure de la recherche agricole, l'amélioration de l'aptitude à fixer l'azote est l'une des voies majeures d'amélioration de la productivité des Fabacées (Djigal, 2003).

Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme gazeuse N_2 dans l'air dont il présente près de 4/3 de l'atmosphère ou sous la forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante (Rees et *al.*, 1993).

L'azote est un élément fondamental parmi les trois éléments majeurs (N, P et K). Il est le pivot de toute production végétale, son action positive sur les rendements des cultures fait de lui un élément clé de la nutrition des cultures (Rees et *al.*, 1993).

L'azote, en tant que composant omniprésent dans les biomolécules (protéines, acides nucléiques, vitamines...), est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent limitante pour la bonne croissance des plantes et constitue de ce fait, très fréquemment, le facteur clé de la production agricole (Rigaud et Gadal, 1985).

Les sols des régions arides sont généralement pauvres en éléments nutritifs entre autre l'azote et le phosphore, donc l'utilisation des engrais minéraux reste la plus dominante et le seul moyen efficace pour l'obtention d'une production optimale, mais l'utilisation des

engrais azotés présentent des nombreux inconvénients surtout dans les régions qui se caractérisent par des sols de texture sableuse. Parmi ces inconvénients, le coût élevé des engrais azotés (6000,00 DA le quintal d'Ammonitrate 33%), et la pollution de la nappe phréatique (lessivage des nitrates) (Rigaud et Gadal, 1985).

Parmi les éléments qui peuvent contribuer à augmenter la production végétale et le rendement chez les légumineuses, la mise à profit de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* à travers l'apport d'inoculum (Labassi, 1991).

Les bactéries appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, et *Rinorhizobium Mesorhizobium* (Martinez, Naarons, et Quinto, 1994) qui sont collectivement dénommés les *Rhizobium*, sont capables de former des nodules sur leurs plantes hôtes l'intérieur de laquelle ils fixent l'azote.

Dans ce travail, l'objectif principal est l'isolement, l'identification et la caractérisation des isolats obtenues à partir des nodules de trois échantillons de *Vicia faba*, en utilisant des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques, ainsi que la mise en évidence de leurs activités antifongiques contre trois champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *Fusarium pseudograminearum*).

Chapitre I :
Revue bibliographiques

I. LA RHIZOSPHERE

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. Le sol est un milieu oligotrophe et un fantastique réservoir d'organismes vivant ; des bactéries, des champignons, des algues, les parties souterraines des plantes ainsi que des animaux très variés. Tous participent d'une manière ou d'une autre à la formation et à l'évolution de sol en termes de diversité et de densité (Gobat et *al.*, 2003).

Hiltner (1904) fut le premier à définir la rhizosphère comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne (Lemanceau et *al.*, 2006). Alors la rhizosphère est la région du sol située sous les racines des plantes et soumise à leur influence directe. 10% à 40% des composés photosynthétisés (à partir du CO₂ et de l'eau) par les plantes sont lessivés dans la rhizosphère, soit sous forme de substances libérées directement par les racines (acides organiques, sucres) : c'est l'exsudation racinaire, soit sous forme de tissus végétaux détachés de la plante par frottements mécaniques. Cette « rhizo-déposition » est favorable à la multiplication des micro-organismes (bactéries, champignons microscopiques) (Lemanceau et *al.*, 2006).

I.1. Interaction plante- microorganisme

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes. De nombreuses interactions sont observées entre la plante et les microorganismes ou entre les microorganismes eux-mêmes. Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux). Et certaines sont bénéfiques comme par exemple, la symbiose entre légumineuses et bactéries qui permettent à la plante de fixer l'azote dont elle a besoin. Mais il existe également des bactéries pathogènes pour la plante (Kent et Triplett, 2002 ; Cardon et Gage, 2006).

L'utilisation de microorganismes pour améliorer la croissance et la santé des plantes repose principalement sur l'inoculation. Les microorganismes, tels que les champignons

mycorrhizogènes (Elhassan et *al.*, 2010; Gianinazzi et *al.*, 2010) et les bactéries fixatrices d'azote, représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance des plantes et la lutte biologique contre les maladies d'origine microbienne (Bhattacharjee et *al.*, 2008; Elhassan et *al.*, 2010).

Au niveau de la microflore se tient également une compétition sévère entre les bactéries. Bien qu'il y ait 100 à 1000 fois plus de bactéries dans la rhizosphère que dans un sol nu, les espèces présentes sont 10 à 100 fois moins diversifiées. Seul un faible nombre de micro-organismes sont adaptés à ce milieu dans lequel ils prolifèrent de manière importante. Les bactéries Forment tant au plan quantitatif que plan fonctionnel le groupe majeur des microorganismes du sol (Morel, 1989). Elles prolifèrent dans les milieux les plus riches en N et peu acides, un milieu aéré à pH supérieur à 6. Elles sont surtout abondantes autour des racines de certaines plantes (graminées, légumineuses) au sein de la rhizosphère (Duchaufour, 2001). Le fonctionnement de la rhizosphère reste encore mal connu. C'est pourtant une zone primordiale dans le cycle géochimique du carbone, de l'azote et du phosphore.

I.2. Les bactéries fixatrices d'azote

Deux groupes de bactéries ont été identifiés comme fixatrices d'azote en association avec les plantes supérieures. Il s'agit des *Rhizobium* qui s'associent généralement avec les plantes légumineuses et d'autres espèces aussi (des papilionacées, des mimosacées, césalpiniacées) et des *Frankias*, bactéries filamenteuses sporulantes associées à des plantes dites actinorhiziennes comme les Casuarinacées. Les symbioses fixatrices de l'azote sont extrêmement importantes dans le maintien de la fertilité de sol, elles sont utilisées dans les pratiques agricoles pour augmenter les rendements des cultures (Djigal, 2003).

I.2.1. Les bactéries fixatrices libres

Elle est réalisée par des bactéries dites diazotrophes qui sont des bactéries libres vivant dans le sol et ayant la capacité de fixer librement l'azote grâce à un enzyme qui appelée la nitrogénase (enzyme identique chez tout les bactéries fixatrice d'azote). Ils sont capables de synthétiser leurs propres protéines à partir de composés azotés dans des conditions

d'oxygénation compatibles avec l'activité de la nitrogénase. Notons, cependant, que chez ces bactéries, la quantité d'azote fixé est faible. Ces bactéries, comportent trois familles :

-Les Azotobacters : bactéries aérobies, hétérotrophe pour le carbone, elles fixent de 10 à 20 mg d'azote/g d'ose consommé.

-Les clostridiiums : bactéries anaérobies, hétérotrophes pour le carbone elles fixent de 2 à 12 mg d'azote/g d'ose consommé.

-Les Cyanobactéries ou Cyanophyceés : (anciennement algues bleues), elles sont autotrophes (fixe le carbone par leur chlorophylle) et fixent l'azote même à l'obscurité à partir des oses qu'elles synthétisent ou trouve dans leur alimentation. La quantité d'azote fixé par cette voie est estimée par 10 à 50 kg/ha/an. (Soltner, 2007).

I.2.2. Les bactéries fixatrices symbiotiques

C'est en 1838 que l'agronome français Boussingault montra que les légumineuses pouvaient assimiler l'azote de l'air, et que cette fixation était liée à la présence sur leurs racines de nodosités ou nodules colonisés par des bactéries. Ces bactéries (*Rhizobiums*), découvertes par Hellriegel et Wilfarth (1886). Ces dernières sont connues par leur capacité d'établissement d'une relation de mutualisme avec famille des légumineuses (Azizi, 2005).

Nous savons que toutes les espèces de *Rhizobium* ne fixent pas l'azote en association avec n'importe quelle Légumineuse. Il existe, en effet, une spécificité assez étroite qui est le résultat d'un échange de signaux chimique, une souche de rhizobia donnée ne peut infecter et noduler n'importe quelle légumineuse (Azizi, 2005).

La fixation de l'azote atmosphérique par les microorganismes libres est peu importante. La contribution majeure provient des systèmes symbiotiques. Parmi ceux-ci, l'association *Rhizobium*-légumineuse tient la première place. Viennent ensuite les associations symbiotiques entre les Cyanophycées et les Actinomycètes avec les plantes non légumineuses (Djigal, 2003). D'après Soltner, 2007, la quantité d'azote fixé par cette voie est estimée par 50 à 100 kg/ha/an, jusqu' à 350 kg.

II. LES *RHIZOBIUM*

Le premier partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « *Rhizobium* » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIXème siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Frank, 1889).

Les *Rhizobium* étaient initialement caractérisés par leur vitesse de croissance: on distinguait ainsi le genre *Rhizobium* contenant des souches à croissance rapide, et qui devait plus tard se subdiviser en plusieurs genres (*Rhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*) (Tableau 1), et le genre *Bradyrhizobium* contenant des souches à croissance lente (Jordan, 1982).

Règne : Bacteria
Embranchement : Proteobacteria
Classe : Alpha Proteobacteria
Ordre : Rhizobiales
Famille : Rhizobiaceae
Genre : *Rhizobium*

(Frank, 1889)

Les *Rhizobium* sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où ils se différencient en bactéroïdes (Graham, 1991 ; Haukka et *al.*, 1998 ; Gage, 2004). Ces bactéries du sol sont de formes bâtonnets, à Gram négatif (paroi hétérogène, coloration rouge) aérobie. Elles sont non sporulant chimiohétérotrophes, d'une largeur variant entre 0,5 et 0,9 μ et une longueur comprise entre 1,2 et 3 μ . Elles sont mobiles par un seul flagelle polaire (cas de *Mesorhizobium*) ou par deux à six flagelles péritriches (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Au niveau de leur matière sèche, les cellules des rhizobia contiennent 52 à 55 % de carbone et 4 à 5 % d'azote (Allen et Allen, 1950).

Tableau 1. Classification des différentes espèces de *Rhizobium*

Genre	Espèce /Plante hôte	Références
Allorhizobium	<i>undicola/ Neptunia natans</i>	Robert, 1976
Azorhizobium	<i>caulinodans (Sesbania rostrata)</i> <i>doebereineriae (Sesbania rostrata)</i>	Robert, 1976
Bradyrhizobium	<i>japonicum (Glycine max)</i> <i>elkanii (Glycine max)</i> <i>betae (Betae vulgaris)</i> <i>Canariense (Betae vulgaris)</i> <i>iriomotense (Entada koshunensis)</i> <i>Jicamae (Pachyrhizus erosus)</i> <i>pachyrhizi(Pachyrhizus erosus)</i>	Jordan, 1984
Mesorhizobium	<i>Loti (Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus)</i> <i>huakuii (Astragalus sinicus)</i> <i>ciceri (Cicer arietinum)</i> <i>tianshanense (Glycyrrhiza pallidiflora)</i> <i>mediterraneum Cicer arietinum)</i> <i>plurifarium (Acacia, Chamaecrista)</i> <i>amorphae (Leucaena, Prosopis)</i> <i>chacoense (Amorpha fruticosa)</i> <i>sesptentrionale (Prosopis alba)</i> <i>temperatum (Astragalus adsurgens)</i> <i>albiziae (Albizia kalkora)</i> <i>caraganae (Caragana spp)</i> <i>tarimense</i> <i>gobiense</i> <i>alhagi (Alhagi sparsifolia)</i> <i>australicum (Biserrula pelecinus)</i>	bekwe et al. 1997
Rhizobium	<i>leguminosarum</i> biovar <i>viciae (Pisum, viciae, Lens, Lathyrus)</i> biovar <i>trifolii (Trifolium pratense)</i> biovar <i>phaseoli (Phaseolus vulgaris)</i> <i>Galega (Galega, Leucaena)</i> biovar <i>officinalis</i> biovar <i>orientalis</i> <i>tropici type IIA et IIB (Phaseolus, Medicago, Macroptilium)</i> <i>etli (Phaseolus vulgaris)</i> biovar <i>mimosae (Mimosa affinis)</i> <i>giardinii Phaseolus vulgaris</i> biovar <i>phaseoli</i> biovar <i>giardinii</i> <i>hainanensis (Desmodium sinuatum Centrosema, etc.)</i> <i>huautlense (Sesbania herbacea)</i> <i>mongolense (Medicago ruthenica, Phaseolus)</i> <i>yanglingense (Medicago ruthenica, Phaseolus)</i> <i>larrymoorei (Ficus benjamina)</i> <i>indigoferae (Indigofera spp)</i> <i>sullae (Hedysarum)</i> <i>loessense (Astragalus, Lespedeza)</i> <i>ccellulosilyticum (Populus alba)</i>	Young, 1996
Sinorhizobium	<i>meliloti (Medicago, Melilotus, Trigonella)</i> <i>fredii (Glycine, Vignia, Cajanus)</i> <i>saheli (Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena)</i> <i>xingianense (Glycine max)</i> <i>arboris (Acacia, Prosopis)</i> <i>kostiense (Acacia, Prosopis)</i>	Kucuk et al. 2006

Les milieux au mannitol et aux extraits de levure (YMA) sont les plus utilisés pour la culture de ces bactéries (Allen et Allen, 1950). Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* au bout de 3 à 5 jours a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH compris entre 6,0 et 7,0. Elles ont une forme circulaire, convexe de 2 à 4 mm de diamètre (Somasegaran et Hoben, 1994).

A l'état libre dans le sol, les *Rhizobium* sont difficilement identifiable ; seule la propriété d'induire la formation de nodule sur le système racinaire des légumineuses permet de les reconnaître (Labassi, 1991).

Elles sont très mobiles quand ils sont jeunes. Parmi les propriétés des ces bactéries, nous retenons :

- L'infectivité, qui est la capacité des bactéries à pénétrer dans la racine de la plante hôte, d'induire la formation d'un cordon d'infection puis d'une nodosité.
- L'efficacité, caractérise l'aptitude à fixer l'azote moléculaire.
- La spécificité d'hôte, ne permet qu'à certaines souches d'entrer en symbiose avec une légumineuse donnée (Labassi, 1991).

Les *Rhizobium* isolés jusqu'à présent appartenaient tous au groupe des *alpha-Proteobacteria* (l'un des 25 phylums bactériens et sans doute l'un des plus importants, il comporte 387 genres qui se répartissent en 5 branches phylogénétiques). Récemment des chercheurs viennent d'identifier deux souches bactériennes formant des nodules racinaires sur des légumineuses qui font partie d'un autre groupe, les beta-proteobacteries (Young, 1996)

La plupart des bactéries nodulant les légumineuses appartiennent à la classe des α -protéobactéries et se répartissent au sein de 12 genres bactériens. Les β -protéobactéries, contiennent 2 genres bactériens qui nodulent les légumineuses. Il s'agit des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Gyaneshwar et al., 2011).

III. INFECTION ET LA NODULATION

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. Le nodule de légumineuses est le résultat d'interactions fort complexes entre le partenaire bactérie (*Rhizobium*) et la racine à laquelle il s'est spécifiquement associé. (Rigaud, 1985). Dans le nodule, le *Rhizobium* augmente de dimension, change de forme pour devenir un bactéroïde (Bouaboub, 1991).

En terme général, Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection.

III.1. Morphologie des nodules

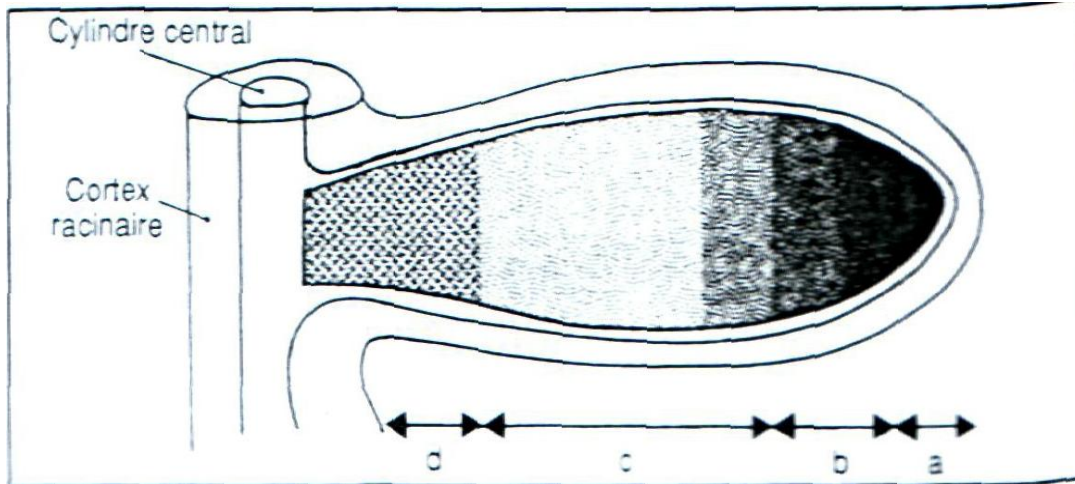
Les nodules sont le siège d'une interaction symbiotique entre d'une part, la bactérie qui fixe l'azote atmosphérique (N_2) et le fournit à la plante hôte sous une forme assimilable (NH_3) et d'autre, la plante hôte qui procure à la bactérie un micro habitat exceptionnellement favorable et les substrats carbonés provenant de la photosynthèse.

Dans tous les cas, le nodule comporte, en allant de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siège de la fixation de la N_2 (Figure 1). Dans cette zone toutes les cellules ne sont pas infectées, sauf chez certaines espèces comme *Arachis hypogaea* et *Sesbania rostrata* (Dommergues et Duhoux et Diem, 1999).

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, soit sphérique. Ils subissent une étonnante différenciation morphologique : centrale, les cellules dépourvues de symbiotes forment vers l'extérieur une sorte de tissu cortical ; des faisceaux d'éléments conducteurs sont reliés à un faisceau conducteur central de la racine. A l'exception de ces zones de différenciations particulières, lors de symbiose efficace, la plupart des cellules du nodule sont remplies de bactéroïdes (Richter, 1993 ; Trevaskis et *al.*, 2002).

Exemples de différentes formes de nodosités d'après Soltner (1978) :

Sphériques chez le soja ; bifurquées chez la luzerne ; globuleuse chez le pois ; ovoïdes chez le trèfle blanc.



Source : Soltner, 2007

a : zone méristématique; **b** : zone de cellules récemment infectées ;
c : zone de tissus bactérien actif ; **d** : zone de dégénérescence

Figure 1. Une nodosité de légumineuse.

III.1.1. Nodules déterminés

Chez lesquels le méristème nodulaire n'existe pas (par méristèmes on entend ici un ensemble de cellules en voie de division qui se perpétue tel quel et non simplement un ensemble de cellules qui se divise activement pendant un certain temps pour se différencier ultérieurement). Le type de nodule formé est déterminé par la plante hôte et non par la souche de *Rhizobium*. Les nodules déterminés existent chez les légumineuses comme le soja, l'organogenèse nodulaire débute par des divisions des cellules corticales externes de la racine (Richter, 1993).

III.1.2. Nodules indéterminés

Elles comportent un méristème nodulaire persistant, les nodules indéterminés a d'abord été décrit chez des espèces tempérées comme le pois, la luzerne ; on l'a ensuite découvert chez *Mimosa scabrella* et *Leucaena leucocephala* (Dommergues et Duhoux et Diem, 1999).

III.2. Infection

III.2.1. Les gènes de la nodulation

Les différents *Rhizobium* utilisent des mécanismes génétiques et moléculaires similaires pour reconnaître et infecter les légumineuses- hôtes : Des gènes Nod qui sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, la reconnaissance de signaux symbiotiques de la plante et la production par la bactérie de signaux ; et les facteurs Nod, provoquant de nombreuses réponses symbiotiques (Richter, 1993).

Les facteurs Nod produits par le partenaire bactérien, ont une très grande activité biologique et induisent à de très faibles concentrations la mise en route d'une partie du programme symbiotique de l'hôte. La transcription de gènes de nodulines précoces, des divisions cellulaires sont à l'origine de l'organogenèse des nodosités (Spaink, 2000). Les facteurs Nod sont essentiels pour la capacité des *rhizobia* à induire les nodules racinaires (Spaink, 2000). Ce sont des lipochitooligosaccharides spécifiques qui affectent les plantes de diverses façons et le premier effet visible est le recourbement des poiles absorbants

(Trevaskis et *al.*, 2002). La production de facteurs Nod dans la bactérie est contrôlée par le degré d'expression de nodulation du gène (Trevaskis et *al.*, 2002).

III.2.2. Echange de signaux

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* commence par l'échange de signaux moléculaires entre la plante et la bactérie, des flavonoïdes produits par la plante attirent les *Rhizobium* et déclenchent la production et l'apparition de facteurs de nodulation (Nod) chez les bactéries (Trevaskis et *al.*, 2002).

Le développement des nodosités racinaires chez les plantes légumineuses est déclenché par des signaux diffusibles : des lipochitooligosaccharides. Ces facteurs Nod sont produits par les *rhizobia* à l'approche de la rhizosphère des plantes hôtes (Begum, 2001).

III.2.3. Processus d'infection

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez et *al.*, 1991).

A. Phase de pré-infection

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine. (Richter, 1993). Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïdes qui activent les facteurs Nod déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales (Hopkins, 1999).

B. Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme dehors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux.

Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (Hopkins, 1999).

C. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules

Les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées. Les *Rhizobium* prennent la forme bactéroïde, entourés par une membrane pér bactéroidienne, après leur libération du cordon d'infection (Hopkins, 1999). La membrane pér bactéroidienne a pour rôle la stabilité du système hôte/symbiose ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (Richter, 1993).

D. Phase de dégénérescence

La dégénérescence du nodule se propage du centre à la périphérie, elle se manifeste par la lyse des bactéroïdes et la disparition de la leghémoglobine, cette phase aboutit à la libération des bactéries dans le sol (Bouaboub, 1991).

III.3. Nodulation

La nodulation est un processus d'interactions complexes entre les deux partenaires. Les mécanismes moléculaires de reconnaissance entre la plante hôte et les bactéries sont considérés comme une forme de communication entre les cellules. Un échange précis de signaux moléculaires entre la plante hôte et les *rhizobia* est essentiel pour le développement de nodules (Begum, 2001).

III.3.1. La leghémoglobine

La leghémoglobine est synthétisée par les cellules des nodosités des légumineuse et concentrée dans les vésicules de séquestration indispensables à l'activité fixatrice, d'origine végétale entourant les bactéroïdes. La leghémoglobine est une hemoprotéine qui n'a pas pu être détectée dans les organes végétaux autres que les nodules des légumineuses (Labassi, 1991).

C'est un pigment capable de complexer réversiblement l'oxygène libre pour lequel il a une forte affinité, donc joue le rôle de transporteur, sous forme combinée, de l'oxygène nécessaire aux activités respiratoires. Toutefois la présence de la leghémoglobine a pour conséquence que l'oxyde de carbone même à faible dose empoisonne définitivement la nitogénase puisqu'il forme avec la leghémoglobine la carboxyleghémoglobine stable. En général, l'absence de ce pigment responsable de la coloration rosâtre des nodosités est une caractéristique du phénotype Fix (Labassi, 1991).

Le problème majeur des nodules est de disposer d'assez d'oxygène afin d'approvisionner les bactéroïdes pour la synthèse de l'ATP sans pour cela provoquer une inactivation de la nitogénase ; il est donc demandé un flux élevé d'oxygène à une basse concentration. La propriété de lier l'oxygène, propre à la légghémoglobine, permet de réunir cette condition (Sprent, 1984).

III.3.2. La nitrogénase

La conversion biologique de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée par une enzyme, la nitrogénase, système que l'on trouve chez les bactéries fixatrices d'azote (Rees et al., 1993). Ce n'est que lorsque la symbiose est mise en place que la nitrogénase apparaît dans les bactéroïdes et la leghémoglobine dans les nodosités (Labassi, 1991).

La réaction de la fixation de N_2 est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui est constitué de deux composantes :

- La protéine molybd-ferrique ou dinitrogénase, cette protéine est le site de réduction de N_2 , c'est un tétramère de poids moléculaire de 245 KD.
- La ferro-protéine ou dinitrogénase-réductase, cette deuxième protéine fournit les électrons à la dinitrogénase c'est un homodimère de poids moléculaire de 64 KD (Dommergues et Duhoux et Diem, 1999).

L'information génétique pour la synthèse de la nitrogénase est portée par le *Rhizobium*, mais elle ne s'exprime pas chez la bactérie libre. Les gènes ne seraient activés que par certains composés synthétisés par la plante hôte et présents dans le micro environnement cellulaire des nodosités

IV. LES FACTEURS AGISSANT SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE

La fixation symbiotique peut être perturbée grâce à des facteurs d'origine externe liée au milieu soit d'origine interne liée au *Rhizobium* et plante hôte, ces facteurs peuvent influer sur la fixation d'azote atmosphérique.

IV.1. Facteurs internes

La symbiose entre plante légumineuse et *Rhizobium* implique un processus de reconnaissance spécifique dont chaque espèce de *Rhizobium* ne peut infecter qu'une gamme bien précise des espèces de légumineuses, cette gamme peut être large comme chez la souche «*Rhizobium* sp. NGR234 », et peut être très étroite comme chez la souche «*SinoRhizobium meliloti* » qui ne sont pas actives que sur les racines de la luzerne (Dommergues et Duhoux et Diem, 1999).

Seuls les facteurs Nod spécifiques induisent la courbure et la formation de l'infection (première étape lors de la formation des nodules) (Simms, 2002). Dans l'interaction *Rhizobium*-plante, on observe un haut niveau de spécificité. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire, c'est à dire un échange de signaux flavonoïdes excrétés par la racine de la plante hôte. Chez les bactéries, les gènes de la nodulation (gène *nod*) sont induits par le signal flavonoïde, et cette induction mène à la production et à l'excrétion des signaux de nodulation, les facteurs Nod. La structure de base des lipochitooligosaccharides est modifiée chez les différentes espèces de *Rhizobium*. Donc, la structure spécifique des facteurs Nod produits par chaque espèce de *Rhizobium* sert comme signal permettant la reconnaissance de la présence de la bactérie par sa plante hôte (Trevaskis et al., 2002).

IV.2. Les facteurs externes

IV.2.1. La température

D'après Sprent (1984), les extrêmes de températures affectent sérieusement la fixation d'azote et l'infection racinaire. Selon une expérience faite sur l'effet de température sur la fixation et l'assimilation de l'azote, a montré que l'activité nitrates réductase, l'activité réductrice d'acétylène ainsi que la teneur en nitrate des plantes hôtes sont sensible à l'action directe de température (Labassi, 1991).

IV.2.2. La lumière

Il existe une relation entre l'intensité lumineuse, la photosynthèse, la nodulation et la fixation. La lumière intervient indirectement sur la fixation d'azote, en effet, un point d'éclairement accroît à la fois le nombre de nodules et la fixation d'azote (Labassi, 1991).

IV.2.3. L'eau

Le déficit hydrique provoque une diminution de poids frais, du nombre des nodules et de l'ARA (Labassi, 1991). Simms (2002) démontrent que les gros nodules sont capables de résister mieux au déficit hydrique et maintenir une bonne activité nitrogénase que les petites nodules et cela due à la présence d'un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation.

IV.2.4. La salinité

La nodulation en général est inhibée si la salinité atteint 8 mmhos/cm. Ce phénomène se caractérise davantage par une diminution du nombre de nodosités que par une réduction de leur poids (Labassi, 1991).

IV.2.5. Le pH

Selon Simms (2002), l'acidité peut provoquer une mauvaise assimilation des éléments minéraux à cause de la toxicité allumique et manganique et une diminution de l'absorption de calcium et de molybdène. Le pH neutre ou légèrement alcalin semble donc être plus favorable au phénomène de la nodulation et de la fixation de l'azote. Lorsque la plante est nodulée, la fixation d'azote elle-même est peu sensible au pH, car la plante renferme un système efficace de régulation interne du pH.

IV.2.6. L'azote

L'existence de nitrates et des ions ammoniums en abondance dans le sol inhibe la fixation symbiotique (Cheloufi, 1991). Pour Labassi (1991), Lorsque le milieu nutritif est suffisamment pourvu en nitrate, les sucres sont utilisées pour la synthèse albuminoïde il n'en reste pas assez pour jouer dans les poils radicaire un rôle attractif sur le microbe. Ainsi, elles provoquent l'avortement du cordant d'infection lors les stades précoces d'initiation qui va entraîner une diminution du nombre des nodules par plante (Cheloufi, 1991). Malgré tout ça, il est conseillé d'apporter une faible dose de nitrate au début de cycle de croissance des légumineuses pour couvrir l'insuffisance de la fixation d'azote liée à la mise en place progressive des nodules.

V. LE CYCLE DE L'AZOTE DANS LE SOL

V.1. L'azote dans le sol

Depuis les travaux de Cheloufi (1991), nous savons que seulement 2% de l'azote présent dans le globe se trouvent recyclés en permanence dans la biosphère et constituent par conséquent la source essentielle du cycle biogéochimique. Le reste (98%) se trouve majoritairement dans les roches volcaniques et sédimentaires.

V.2. Les sources d'azote du sol

Contrairement au calcium, au potassium et au phosphore, l'azote que l'on trouve dans les sols sous plusieurs formes ne provient pas de la dégradation des roches mais des autres sources :

V.2.1. Une source atmosphérique N₂

Qui constitue les 4/5 de l'atmosphère, mélange à l'oxygène. C'est la source primordiale d'azote du sol

V.2.2. Une source organique

L'azote incorporé dans les matières organiques végétales ou animales. Les bactéries qui dégradent les matières organiques libèrent l'azote sous des formes assimilables par les plantes.

V.2.3. Une source synthétique

L'azote des engrais azotés synthétisés à partir de l'azote de l'air mais avec forte dépense d'énergie, celle du pétrole (Soltner, 2003).

V.3. Les formes de l'azote du sol

Dans le sol, l'azote peut exister sous trois formes principales représentant trois stades de décomposition biologique des matières organiques :

V.3.1. L'azote organique

L'azote dans les sols cultivés se trouve essentiellement sous forme organique avoisinant les 95% de l'azote total, (Cheloufi, 1991). L'azote organique est la réserve d'azote du sol. Il n'est pas directement utilisable par les plantes. La grande partie se trouve sous forme d'humus stable dosant 5% d'azote (Soltner, 2003).

V.3.2. L'azote ammoniacal

Est une forme transitoire, mais retenue par le système absorbant. Résultat de l'ammonisation, les ions NH^{4+} sont retenus par les charges négatives du complexe argilo humique.

V.3.3. L'azote nitrique

Très soluble, est la forme principale d'absorption de l'azote par les plantes. Bien que celles-ci puissent absorber les ions NH^{4+} , ce sont les ions nitriques NO^{3-} qu'elles utilisent surtout (Soltner, 2003).

V.4. Transformation de l'azote dans le sol

Le cycle de l'azote rend compte de transformation et de la simplification des composés azotés complexes fournis au sol, jusqu'au stade d'azote minéral utilisable par la plante (Figure 2) (Soltner, 2003).

V.4.1. Humification

La décomposition de la matière organique aboutie à la formation de l'humus jeune puis finalement à l'humus stable cette transformation est induite par les micro-organismes du sol (bactéries et champignons) (Soltner, 2003).

V.4.2. Minéralisation

La minéralisation de l'azote organique du sol réalisé par les micro-organismes, ce fait en deux temps :

A. L'ammonification

C'est le processus biologique le plus important qui influe sur le cycle de l'azote et sa disponible dans le sol (Duchaufour, 2001). Il faut noter aussi que pour être assimilable, l'azote organique doit subir sous l'influence des micro-organismes une série de

transformation qui font passer successivement de la forme protéique à la forme acides amines ; ceux-ci sont transformés à leur tour en azote ammoniacale puis en azote nitrique (Cheloufi, 1991).

B. La nitrification

Soltner (2003) considère que la transformation de l'azote ammoniacal en azote nitrique se fait sous l'influence des micro-organismes oxydants en deux étapes :

- La nitrosation : C'est l'oxydation de l'azote ammoniacal NH_3 en azote nitreux NO_2 par des ferments nitreux *Nitrosomonas*.

-La nitratisation : Les nitrobacters oxydent l'azote nitreux NO_2 en azote nitrique NO_3 qui est mobile dans le sol, ce phénomène de nitrification à lieu dans des conditions écologique extrêmement diverses : pH voisin de la neutralité, quantité suffisant de CO_2 humidité en dessous de la capacité de rétention et une aération modérée (Duchaufour, 2001). C'est le fait des ferments nitriques (type *Nitrobacter*, *Nitrocystis*, *Bactoderma*, *Microderma*).

V.5. Les voies de pertes d'azote dans le sol

Les quantités d'azote minéral du sol, non assimilais par les plantes peuvent être perdues par trois chemins (Chouar, 2006).

V.5.1. La dénitrification

Dans le milieu naturel il existe des bactéries qui ont la capacité de transformer les nitrates en azote moléculaire N_2 .

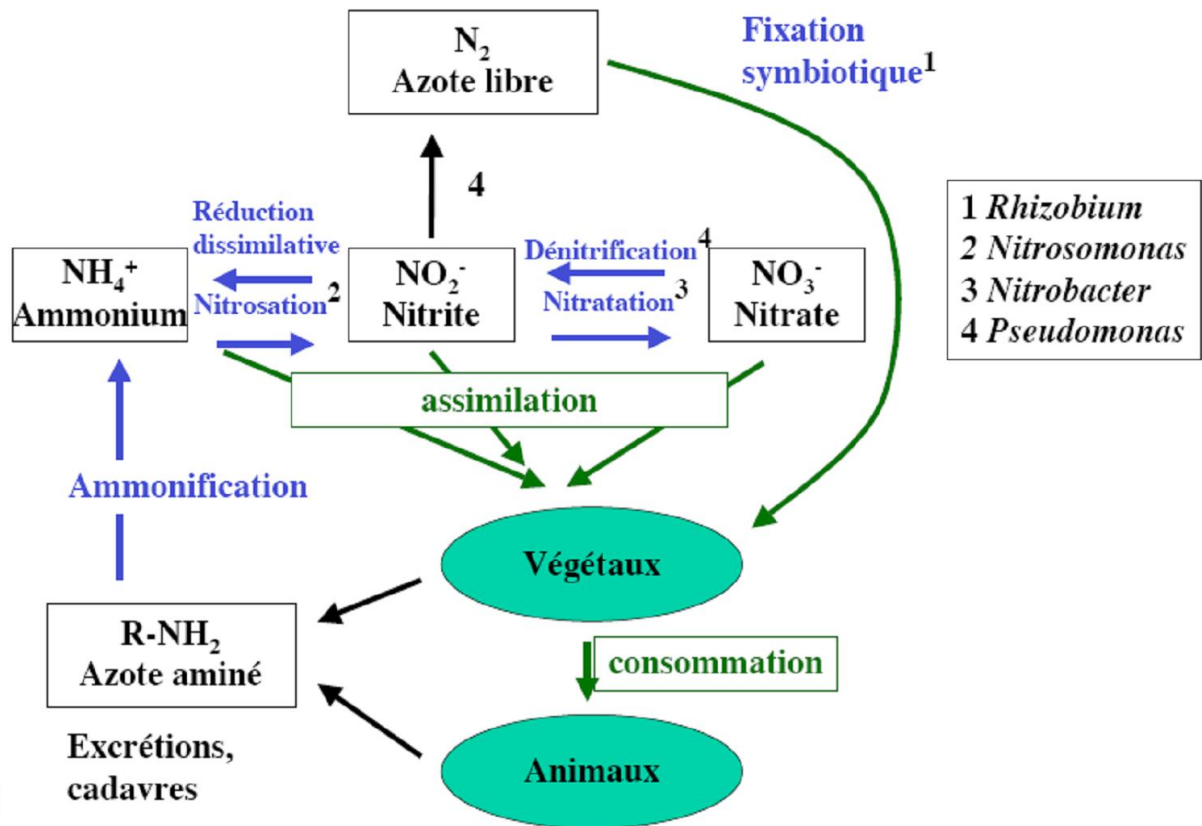
Les pertes par la dénitrification peuvent aller de quelques Kg à plusieurs dizaines de Kg/ha/an (Chouar, 2006).

V.5.2. Volatilisation de l'azote ammoniacal

Une partie d'azote ammoniacal peut être perdue directement par volatilisation d'ammoniac dans un milieu alcalin et sous l'effet d'une alternance d'humectation et de dessiccation (Chouar, 2006).

V.5.3. Lessivage

C'est l'entraînement d'azote nitrique vers la profondeur sous l'action de la percolation de l'eau. Ces pertes varient en fonction du type de climat, de la végétation, de la topographie et des propriétés physico-chimiques du sol (Rees et al., 1993) Le lessivage est de 20 Cm pour 100 mm de pluie en sol argileux (Rees et al., 1993), les pertes annuelles par lessivage, mesurées dans les stations équipées des cases lysimétriques peuvent varier de 30 à 150 kg/ha en cases nues et de 3 à 80 kg/ha en cases cultivées (Soltner, 2005).



Source : <http://microbiosol.fr/gd/Cycle-Azote.htm>

Figure 2. Schéma du cycle de l'azote.

VI. RHIZOBIUM ET LUTTE BIOLOGIQUE

VI.1. Notion de la lutte biologique

La lutte biologique a pour principe d'utiliser des agents biologiques capables d'entrer en compétition (antagonisme) avec les agents pathogènes et les ravageurs sans avoir d'activité néfaste sur la plante. Ces agents naturels sont réunis sous le concept de biopesticides (Rahman et al., 2007).

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas*; et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* et *Trichoderma* (Benizri et al., 2001).

Ces microorganismes utilisent différents mécanismes pour lutter contre les agents phytopathogènes du sol, à savoir : L'antibiose, la compétition, le parasitisme et/ou l'induction des mécanismes de la résistance chez la plante (Bouizgarne et al., 2006 ; Prévost et al., 2006 ; Lehr et al., 2008).

VI.2. Rôle de *Rhizobium* en lutte biologique

Par la présence de la microsymbiose, les légumineuses obtiennent un bénéfice nutritif, et deviennent aussi plus résistantes à certaines infections. *Rhizobium meliloti* et le *Bradyrhizobium japonicum* protègent, respectivement, la luzerne, et le soja du *Fusarium oxysporum* (Bordeleau, 1989). L'effet protecteur serait réalisé par une compétition nutritive entre le *Rhizobium* et l'agent pathogène, envers la source de carbone principalement. Bordeleau, (1989) rapporte que dans d'autres travaux *Rhizobium meliloti* a inhibé la croissance de *Macrophomina pimedina*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium solani* in vitro. Dans des études en champ, *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *B. japonicum* ont réduit la sévérité de l'infection par *M. phaeofina*, *R. solani* et *Fusarium* spp, de certaines légumineuses et non légumineuses. Ainsi des *Rhizobium* transgéniques, *R. leguminosarium biovar Viciae* et *R. leguminosarium biovar Trifolii* ont protégé les nodules du petit pois et de la féverole de l'attaque des larves de *Sitona flavescens*. Ces souches contiennent des fusions avec la séquence codante pour la protéine insecticide de *Bacillus subtilis* (Skot et al., 1994). Le *Rhizobium* est capable de persister dans le sol de manière saprophytique même en absence de sa plante hôte. Sa survie est possible grâce à l'expression de certains traits compétitifs, nécessaires pour la protection de sa niche écologique. Chez le pois et

le haricot, une amélioration de l'assimilation du fer par la racine suivie d'une augmentation de la synthèse de chlorophylle, grâce à la production de l'agrobactine par *Agrobacterium* et la production des sidérophores par les *Rhizobium* (Becker et al., 1985).

Plusieurs mécanismes ont été élucidés. Concernant les interactions entre les plantes et les *Rhizobium* bénéfiques ou entre *Rhizobium* et les pathogènes.

VI.2.1. Antagonisme entre *Rhizobium* et flore microbienne (antibiose)

Certains champignons sont phytopathogènes pour les légumineuses par exemples : *Penicillium Sp*, *Rhizopus stolonifère*, *Trichoderma* et *F. oxysporum*. L'activité antifongique des différentes souches de *Rhizobium* a été testée dans différentes interactions entre les communautés de la flore Rhizosphérique qui se peut résumer à l'antagonisme et la compétition. Antoun et al., (1978) trouvent que *Rhizobium meliloti* peut produire la Rhizobactine (un acide aminopolycarboxylique avec une substitution éthylène diamine dicarboxyle et hydro carboxyle) comme groupements chélateurs. Les *Rhizobium* utilisent des acides comme des agents pour lutter contre les phytopathogènes et les ravageurs des légumineuses (Rioux et al., 1986). La Rhizobactine est apparentée structurellement aux opines. Le *R. leguminosarum* produit l'anthralinate (Guennot et al., 1990). Alors que *B. japonicum* est capable d'utiliser l'acide citrique comme sidérophores. Le *Rhizobium* producteur de rhizobactine et *Agrobacterium radiobacter* producteur de l'agrocine avec succès pour la protéger contre la tumeur du collet. Les souches productrices d'antibiotiques ont été impliquées dans le phénotype d'inhibition de la Croissance d'agents pathogènes (Nelson et Craft, 1991).

VI.2.2. Compétition

L'inhibition du *Fusarium oxysporum* par *Agrobacterium radiobacter* est associée à un rapport de compétition élevé (Marshall et Alexander, 1960). Antoun et al., (1978) ont prouvé que l'antagonisme entre le *Fusarium oxysporum* et *Rhizobium meliloti* est lié à la concentration de glucose d'où une compétition sur le nutriment. Des bactéries ne produisant pas d'enzymes lytiques mais des substances antifongiques, inhibent la croissance mycélienne, inhibent la germination des oospores du *Phyitium sp*, en les privant de certains éléments nutritifs (Elad et Chet, 1987). Dans le même contexte, lorsque les graines sont enrobées par des *rhizobiums*, les exsudats des graines de coton perdent leur

action stimulante de la germination des sporanges de *Pythium*. L'addition d'exsudats concentrés traités avec du *E. cloacae* à des exsudats frais non traités n'a pas réduit l'activité stimulante de ces derniers, ce qui indiquait l'absence de substances stimulantes plutôt que la présence d'inhibiteurs dans ces exsudats (Nelson et Craft, 1991).

VI.2.3. Le parasitisme (Hydrolases)

Les hydrolases des Rhizobactéries extracellulaires sont associées à l'inhibition des champignons phytopathogènes. On a démontré la lyse de la paroi (chitine et les 1,3-glucanes sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons) *in vitro* par des chitinases ou des α -glucanases bactériennes (Kobayashi et al., 1974). Les gènes de synthèse de la chitinase ont été clonés chez *Bradyrhizobium*, ce qui a permis de muter le locus et d'effectuer une mutagenèse dirigée par recombinaison réciproque avec le locus sauvage. Le mutant montre une production réduite de chitinases, une diminution de l'inhibition de l'élongation du tube germinatif fongique, et une protection réduite des plants de pois contre le *Furarium oxysporum* (Jones et al., 1986).

VI.2.4. Production de Sidérophores

Des ligands de faible masse moléculaire spécifiques au fer, leur biosynthèse est régulée par la disponibilité du fer et leur fonction est de fournir cet élément à la cellule (Lankford, 1973). Il est abondant dans le sol sous forme d'oxydes de fer. C'est un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et de celle des plantes (Schwertmann et Lindsay ; 1983). L'implication des Sidérophores dans l'antagonisme entre les populations microbiennes émerge de la disponibilité limitée du fer. En réponse aux conditions limitantes en fer dans la Rhizosphère, une compétition pour cet élément s'installe entre les micro-organismes (Kloepper et al., 1980).

Kloepper et al., (1980) et Moore, (1988) avancent que les *Rhizobium* producteurs de sidérophores, uniquement en absence de fer ; imposent l'expression du phénotype d'inhibition de la croissance du micro-organisme phytopathogène visé. La synthèse de sidérophores a été utilisée comme méthode complémentaire à des techniques sérologiques pour différencier des isolats de *R. leguminosarum*. L'effet bénéfique de la production des sidérophores sur les plantes est expliqué par leur synthèse (induite lors de la croissance en

conditions limitantes en fer) par les *Rhizobium*. Le fer complexe au siderophores n'est assimilable que par les micro-organismes producteurs ou possédants des récepteurs membranaires spécifiques capables de reconnaître les siderophores (Moore, 1988). Sachant que la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance et sa densité dans la rhizosphère est diminuée si elle est privée du fer.

VI.2.5. L'induction des mécanismes de la résistance chez la plante

Devant des barrières physiques (cuticule, paroi végétale) et/ou chimiques (composés antimicrobiens). Le pathogène est incapable à infecter la plante; l'interaction est dite incompatible (Jones et al., 2006). La présence du phytopathogène peut être révélée grâce à des motifs moléculaires, après sa pénétration à travers la paroi végétale ou via une blessure (Chisholm et al., 2006). Leur perception par la plante pourra initier une réponse immunitaire, afin de limiter l'invasion (Jones et al., 2006). L'interaction entre la plante et le microorganisme sera compatible et suivie par une prolifération du pathogène, si les défenses mises en place sont inappropriées, si la plante ne réagit pas assez rapidement ou si les voies de défense sont désactivées. Désactivation qui s'effectue via la sécrétion par le pathogène de protéines d'avirulence, reconnues par des cultivars particuliers (Montesano et al., 2003). On donne le nom de Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, ou Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* : PGPR aux bactéries ayant un impact positif sur la plante, par le biais d'un effet protecteur ou via une stimulation de sa croissance (Mercado-Blanco et al., 2007).

Beaucoup de *Rhizobium* capables de stimuler l'ISR chez divers hôtes ont été isolés ; sauf que, les principes actifs responsables de l'activité biologique de ces souches n'ont été que rarement identifiés. Dépendant en partie des lipopolysaccharides (LPS) et des flagelles présents à la surface des membranes bactériennes, la mobilité et l'adhésion racinaires des *Rhizobium*, sont des éléments importants pour une colonisation effective de l'hôte (Persello-Cartieaux et al., 2003). Les quelques éliciteurs connus sont classés en trois catégories : Les composants de surface cellulaires, Les métabolites régulateurs par le fer et les antibiotiques (Ongena et al., 2007).

Chapitre II :
Matériel et méthodes

I. ISOLEMENT DES *RHIZOBIUM*

I.1. Origine des échantillons

Nos échantillons de fève (*Vicia faba*) ont été prélevés, au Printemps (mois de Mars et Avril), de trois zones arides de la wilaya de Laghouat : Laghouat ville (23°24'N, 2°46'E) ; El-Assafia (33°49'N, 2°59'E), et Bordj Senouci (33°49'N, 2°53'E). Les plantes dont nous avons choisi avaient une croissance caractéristique (stade floraison) comparativement aux plantes de même espèce du même site (Chaux et Foury, 1994). Selon son abondance et sa caractéristiques rhizogénique (nodulaires), trois échantillons (plant par site) ont été sélectionnées pour notre étude.

I.2. Présentation des caractéristiques édaphiques des régions d'échantillonnage

La Wilaya de Laghouat est située dans la zone aride, à 400 km au sud de la capitale Alger ; elle prend une altitude moyenne de 752 m. Elle fait partie du groupe des neufs (09) wilaya pastorales du pays ainsi que des wilayas du Sud, a une superficie de 25 052 Km². D'après Halitim (1998), les sols dans la zone aride d'Algérie sont généralement hydro morphes, des minéraux bruts, ou halomorphes. Ces derniers sont classés en : sols sans accumulation de sels, sols calcaires, sols gypseux, et les sols salés.

D'après FAO (2005), les sols de la région de Laghouat sont en majeure partie d'apport alluvial typique sur croute calcaire, peu évolués, à texture légère, à teneur faible en matière organique présentant ainsi des contraintes pour l'agriculture. Aussi Aubert (1980), remarque que les sols des régions posent d'une manière générale d'énormes problèmes de mise en valeur : Ils présentent souvent des croutes calcaires ou gypseuses et sont la plupart de temps salés et sujet de l'érosion et à une salinisation secondaire. Selon la DSA (2014), La région de Bordj –Senouci est appartient a la région de Laghouat.

Selon un découpage en zone homogène effectué pour la wilaya de Laghouat, la commune d'El Assafia est située dans la zone homogène des hautes plaines semi-arides à topologie agro- pastorale. La commune est située à l'extrême nord- est de la wilaya de Laghouat (BNEDER, 2005). Les sols à texture légère, recouverts dans les espaces non cultivés de végétation d'alfa et d'armoïse. Au Sud, les sols sont souvent sableux et dunaires (DSA, 2014). Selon BNEDER (2005), les sols dans la région d'el Assafia sont

dévié en 05 types, c'est l'alluvion et sable, le calcaire domites dures, le calcaire friable, mélange entre calcaire domites dure et alluvion et sable et le gré + l'alluvion et sable plus de 80% des sols dans la région de Assafia est de nature calcaire domites dure + alluvion et sable de 21407.29 ha et 2984 ha soit 11% de la superficie sont des terrains de la nature alluvion et sable, les trois autres types du sol avec des proportions faible. La majorité des terrains (Plus de 99 %) dans la commune d'El Assafia sont stables contre l'érosion.



Source : www.cetiom.fr

Figure 3.nodules des bactéries fixatrice d'azote

La récolte des nodules (Figure 3) a été effectuée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire le plant et son appareil racinaire, manuellement, en se débarrassant de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. En suite les échantillons ont été transportés au laboratoire, en respectant les conditions de conditionnement.

II. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ISOLATS

Au laboratoire, en vue d'éliminer les particules et les restes de sol, un lavage délicatement des racines avec leurs nodules à l'eau de robinet été effectué. Les nodosités d'un même plant ont été mis dans le même tube. L'isolement et la purification des isolats de *Rhizobium* à partir des nodules a été fait aseptiquement selon les procédures suivante :

II.1. Isolement des bactéries

II.1.1. Désinfections des nodules

La technique classique d'isolement des souches de *Rhizobium* décrite par Cleyet-Marel (1989) a été adoptée. Les nodules roses (la pigmentation rose révèle la présence de la léghémoglobine), récupérés à partir des racines de la fève sont désinfectés superficiellement par immersion dans l'éthanol à 95° durant 30 secondes, puis dans une solution de l'eau javel diluée (3%) pendant deux à trois minutes, ensuite elles sont rincés cinq fois à l'eau distillée stérile.

II.1.2. Technique d'isolement

Pour l'isolement des bactéries fixatrices d'azote dans les nodules (*Rhizobium*) nous avons utilisé le milieu nutritif agar YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (Annexe 1) (Vincent, 1970). En utilisant deux méthodes décrites par Somasegaran et Hoben (1994) et Vincent (1970).

A. Ecrasement des nodosités

Cinq à huit nodosités sont écrasées dans quelques gouttes d'eau distillé stérile afin d'obtenir une suspension laiteuse, à l'aide d'une pipette Pasteur pleine en suspension nodulaire, nous avons étalé sur le milieu YMA dans des boites de Pétri, avec trois répétitions.

B. Fragment de nodules

La deuxième technique consiste à couper les nodules en deux ou trois morceau, puis à les déposer dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA. La deuxième technique a l'avantage par rapport à la première de permettre une purification beaucoup plus rapide. L'incubation a été effectuée pendant 24 à 48 heures, à une température de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

II.1.3. Validité de la désinfection superficielle

En vue de prouver expérimentalement que les isolats retenus sont des bactéries issues des nodules, la méthode décrite par Vincent (1970) est utilisée. Cette méthode consiste à suivre le même protocole de désinfection précédemment utilisé pour l'isolement à partir des nodules (Cf. II.1.1.). Le nodule était ensuite déposé sur le même milieu d'isolement (YMA) et les boîtes ont été incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 8 jours. L'absence de croissance indique que les isolats étaient à l'intérieur des nodules et non pas à l'extérieur.

II.2. Purification et conservations des isolats

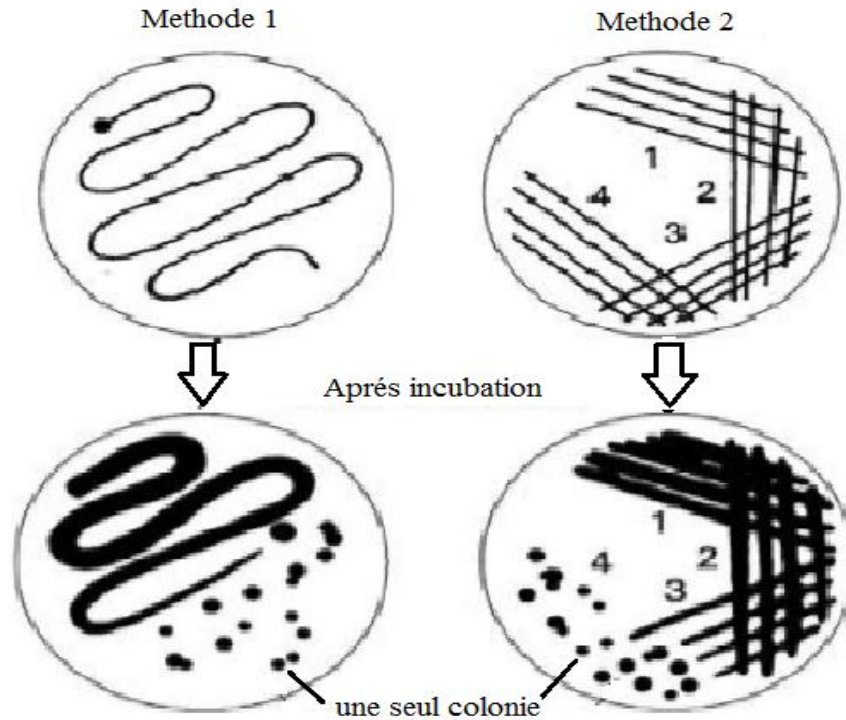
II.2.1. Méthode de purification

Après l'incubation, La sélection des colonies de *Rhizobium* a été basée principalement sur des caractères morphologiques.

Après le choix des colonies ciblées par les caractères précédant, nous sommes passés à la purification qui consiste à ensemencer répétitivement les bactéries sur milieu YMA (Figure 4), (Boudmagh, 2007; Chabbi, 2009). Nous avons obtenus des isolats purs après la 5^{ème} purification.

II.2.2. Conservation des isolats

Après l'obtention de culture pure, nous avons repiqués ces isolats dans des tubes contenant un milieu YMA additionné de glycérol (25%), après une croissance à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ces tubes ont été conservés à $4 \pm 2^\circ\text{C}$, afin de les utiliser ultérieurement (Vincent, 1970).



Source : Auteur, 2015

Figure 4 Méthodes de purification des *Rhizobium* selon Somasegaran et Hoben, 1985

III. IDENTIFICATION DES ISOLATS

L'objectif de cette étape est de distinguer les *Rhizobium* des d'autres micro-organismes par la caractérisation morphologique des colonies, Ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques : réactions de croissance en utilisant une gamme de milieux, la résistance à la température, et la tolérance au pH et sels, la recherche de l'oxydase et voie d'utilisation du glucose et les galeries api sont des caractéristiques généralement stables utiles dans l'identification de souches ou isolats selon (El Idrissi et al., 1996).

III.1. Identification morphologique des isolats

L'identification préliminaire des espèces de *Rhizobium*, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques des colonies, lorsqu'elles sont cultivées sur le milieu de levure mannitol standard (Somasegaran et Hoben, 1985).

III.2. Tests de Gram

III.2.1 Test KOH

C'est un test rapide, qui permet de distinguer les Gram positif des Gram négatifs, sur une lame propre deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 3%, sont mises en contact avec une crème bactérienne en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse (la formation de fil observable à l'œil nu) en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30 secondes (Souslov, 1981). Pour une réaction négative aucune viscosité n'est observée, donc les bactéries sont des Grams positifs, nous avons retenu que les isolats à Gram négatifs.

III.2.2. Coloration de Gram

D'après Somasegaran et Hoben (1985), cette coloration permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Son avantage est de classer les bactéries en deux groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram -, et distingue la forme des cellules bactériennes. Le principe selon Souslov (1981) est le suivant.

A. Préparation du frottis

A l'aide d'une anse de platine, nous avons déposé une colonie bactérienne avec une goutte d'eau distillée sur une lame propre, puis nous l'avons bien étalé et fixé à la chaleur par des passages sur la veilleuse d'un bec bunsen.

B. La coloration

Dans cette étape, nous avons utilisé une triple de coloration où nous avons commencé par le violet de gentiane, nous avons laissé agir pendant 30 secondes à une minute, puis nous avons rincé à l'eau distillée. En deuxième étape, nous avons traité notre lames avec le lugol (solution d'iode iodo-ioduré) pendant une durée double que le violet de gentiane, puis nous avons rincé avec de l'eau distillée. Après ces opérations nous avons lancé une décoloration rapide à l'alcool, c'est l'étape la plus importante de la coloration nous avons

versé goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, jusqu'à l'obtention d'un filet clair, Pour stopper la décoloration, nous avons rincé abondamment avec de l'eau distillée. En suite nous avons recoloré par la fuchsine pendant 30 secondes à une minute, en fin nous avons lavé doucement à l'eau distillée.

Après le séchage des lames, la lecture des résultats est effectuée par une observation au microscope optique à l'objectif $\times 100$ (grossissement 1000), avec une goutte de l'huile à immersion.

III.3. Identification biochimique des isolats

III.3.1. réaction aux milieux de culture

Les isolats de *Rhizobium* ont été étudiés dans ce sens en faisant appelle à la méthode décrite par Vincent (1970) ; Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994). Le principe de la méthode consiste à cultiver les isolats dans différents milieux de cultures avec deux répétitions et à les incuber pendant 24 à 48 heures à $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Les milieux de cultures en questions sont :

- Milieu YMA + Rouge Congo (RC) (Annexe 1);
- Milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) (Annexe 1);
- Milieu Glucose-Peptide-Agar (GPA) (Annexe 1);
- Milieu YMA + Pourpre de Bromocresol (BCP) (Annexe 1).

Ces indicateurs et ces milieux sont utilisés comme des tests présomptif de pureté des cultures (Somasegaran et Hoben, 1985).

1) sur milieu YMA + Rouge Congo (RC) : les *Rhizobium* absorbent peu ou pas le rouge Congo quand elles sont incubé dans l'obscurité. Elles restent ainsi rose à blanchâtre, une caractéristique observée chez le *Rhizobium*. Cependant, il ya des exceptions par exemple : certaines souches de *R. meliloti* absorbent fortement le rouge Congo (Somasegaran et Hoben, 1985).

2) Sur milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) : pour la mise en évidence de la vitesse de croissance. Une couleur bleue indique une réaction alcaline sur BTB devrait être obtenue avec une croissance lente *Bradyrhizobium sp.* Une couleur jaune (acide)

réaction est habituellement produite par le *Rhizobium sp* croissance rapide (Somasegaran et Hoben, 1985).

3) Sur milieu Glucose-Peptide-Agar (GPA) : la présence de croissance a été observée après 48 heures d'après Vincent (1970).

4) sur milieu YMA+Pourpre de Bromocresol (BCP) : les *Rhizobium* n'acidifient pas ce milieu. Elles n'entraînent aucun virage de couleur du milieu après 24h d'incubation (Jordan, 198).

IV. CARACTERISATION DES ISOLATS

IV.1. Tests de la tolérance des sels

En vue d'étudier l'effet de la salinité sur la croissance des isolats, la méthode décrite par Vincent (1970) et Jebara et *al.*, (2001) a été utilisée. Les isolats sont cultivés sur le milieu YMA additionnée aux différents types de sels (CaCl_2 , NaCl , K_2SO_4 , KCl et N_2SO_4), chaque type de sel à différentes concentration (0.5, 1, 1.5 et 2 g/l), en plus un témoin sur le milieu YMA à une concentration normale (0.1 g/l NaCl), avec deux répétitions l'incubation est faite à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 8 jours.

IV.2. Tests de la tolérance au pH

Tous les isolats ont été testés pour leur faculté de tolérer différentes valeurs du pH avec deux répétitions selon l'étude faite par (Graham et Vance, 2003). Les valeurs de pH testées sont : 5, 6, 7, 8, 9 et 12 ; L'effet du pH sur la croissance des isolats sur le milieu YMA a été évalué après 3 à 8 jours d'incubation à $30 \pm 2^\circ\text{C}$, le pH optimal (6,8 à 7,2) est utilisé comme témoin. Les isolats qui ont pu croître à un pH donné, sont considérés tolérants, autrement ils sont sensibles.

IV.3. Résistance aux températures

La température optimale pour la croissance des *Rhizobium* se situe entre 25°C et 31°C , (Evers, 2003). Dans le but d'étudier les températures maximales et minimale pour la croissance de chaque isolat, une culture de ces différents isolats a été réalisée avec deux

répétitions sur milieu YMA et incubée à différentes températures : 4°C, 35°C, 40°C, 45°C et 50°C. La lecture de croissance des isolats est faite après 3 à 8 jours d'incubation. L'absence de croissance à une température donnée, l'isolat est considéré comme sensible à cette température (Graham et Vance, 2003).

IV.4. Test Oxydase

L'oxydation de N-diméthyle paraphénylène diamine par la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase intracellulaire et l'oxygène moléculaire donne une couleur bleu violète, ce qui indique que les bactéries sont des oxydases positifs (+) (Confida, 2011).

La recherche de l'oxydase peut se faire selon plusieurs méthodes. L'une des plus couramment utilisée consiste à placer un disque d'oxydase sur une lame porte-objet, à l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile, puis à déposer une colonies pures fraîchement sur le disque. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur bleu violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes (Goodfellow et Minnikin, 1985).

IV.5. La galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE est un système standardisé des testes biochimiques classiques destinés à l'identification des bacilles Gram-négatif non fastidieuses, non-entériques, ce système regroupe 21 tests biochimiques, 8 tests classiques et 12 essais d'assimilation et une base de données. Des substrats déshydratés sont contenus dans des microtube. ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier, à la suite d'une période d'incubation (24 et 48 heures à 30°C), permettant à la bactérie de réagir avec les substrats, La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Tableau 2). Pour l'application de cette galerie, nous avons suivi le protocole API 20 NE recommandé par le laboratoire Français de Bio Mérieux, (2011) (Figure 6).

A. Préparation de la galerie

Nous avons réuni le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et nous avons réparti environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer un atmosphère humide. Nous avons placé la galerie dans la boîte d'incubation.

B. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune âgée de 18 à 24 heures et à l'aide d'une anse, nous avons prélevé 1 à 4 colonies de morphologie identique sur milieu gélosé et mis dans un tube contenant 2 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%), en suite nous l'avons soigneusement homogénéisé, et utilisé immédiatement. Pour préparer la deuxième suspension, nous avons ouvert une ampoule du milieu d'API AUX moyen et à l'aide d'une micropipette nous avons ajouté environ de 200 µl de la suspension saline, nous l'avons bien homogénéisé avec la pipette, en évitant la formation de bulles d'air.

C. Inoculation de la galerie

Dans Les testes de NO₃ à PNPG, nous avons introduire la suspension bactérienne dans les tubes (et non pas les cupules) de la galerie à l'aide de pipette, en évitant la formation de bulles d'aires, en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, et en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant. Dans les cupules de testes GLU, ADH, URE, immédiatement, nous avons ajouté de l'huile minérale (paraffine) jusqu'à la formation d'un ménisque convexe.

Pour inoculé les 12 tubes d'essais d'assimilation, à partir de la deuxième suspension, nous avons rempli les tubes et cupules de test GLU à PAC, en prenant soin de laisser un plat ou légèrement convexe, mais pas concave, ni ménisque. À la fin nous avons fermé la boîte d'incubation et l'incubée à 29° C ± 2° C pendant 24 et 48 heures (± 2 heures).

V. ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Pour étudier l'activité d'antifongique des isolats de *Rhizobium* vis à vis de trois champignons qui sont : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA) ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) ; *Fusarium pseudograminearum* (FP). Les trois espèces de champignons utilisés ont été isolées et identifiées respectivement par de laboratoire d'Agronomie et de Biologie au niveau de l'université de Laghouat.

La méthode des spots, décrite par Rocher (2004), à été utilisée (Figure 5). Le principe de la méthode consiste à déposée 4 spots bactériennes (deux isolats dans le même boîte) à 1

cm de la périphérie de la boîte de Pétri (90 mm de diamètre) sur le milieu de culture PDA (Annexe 1). La culture était ensuite incubée à 28 ± 2 °C. Après 24 heures, nous avons déposé un disque de 5 mm de diamètre du champignon mycélien étudié, dans le centre de la boîte de Pétri, nous avons réalisé en deux répétitions.

La boîte est ensuite incubée à nouveau à 28 °C. Une culture témoin de l'agent pathogène est effectuée en absence des bactéries, dans les mêmes conditions.

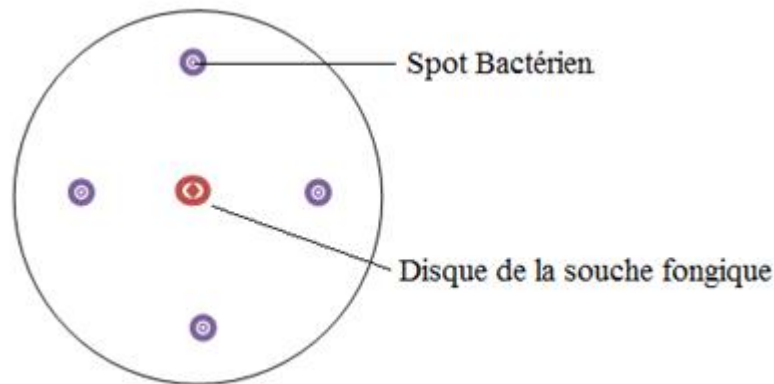
L'évaluation de l'activité antifongique des isolats testés en taux d'inhibition a été calculée selon Harir, (2010). La lecture des résultats a été faite en comparaison avec la croissance du témoin, l'activité antifongique est révélée par la présence de zone d'inhibition.

$$(I \%) = (1 - C_n / C_o) \times 100$$

I: taux d'inhibition;

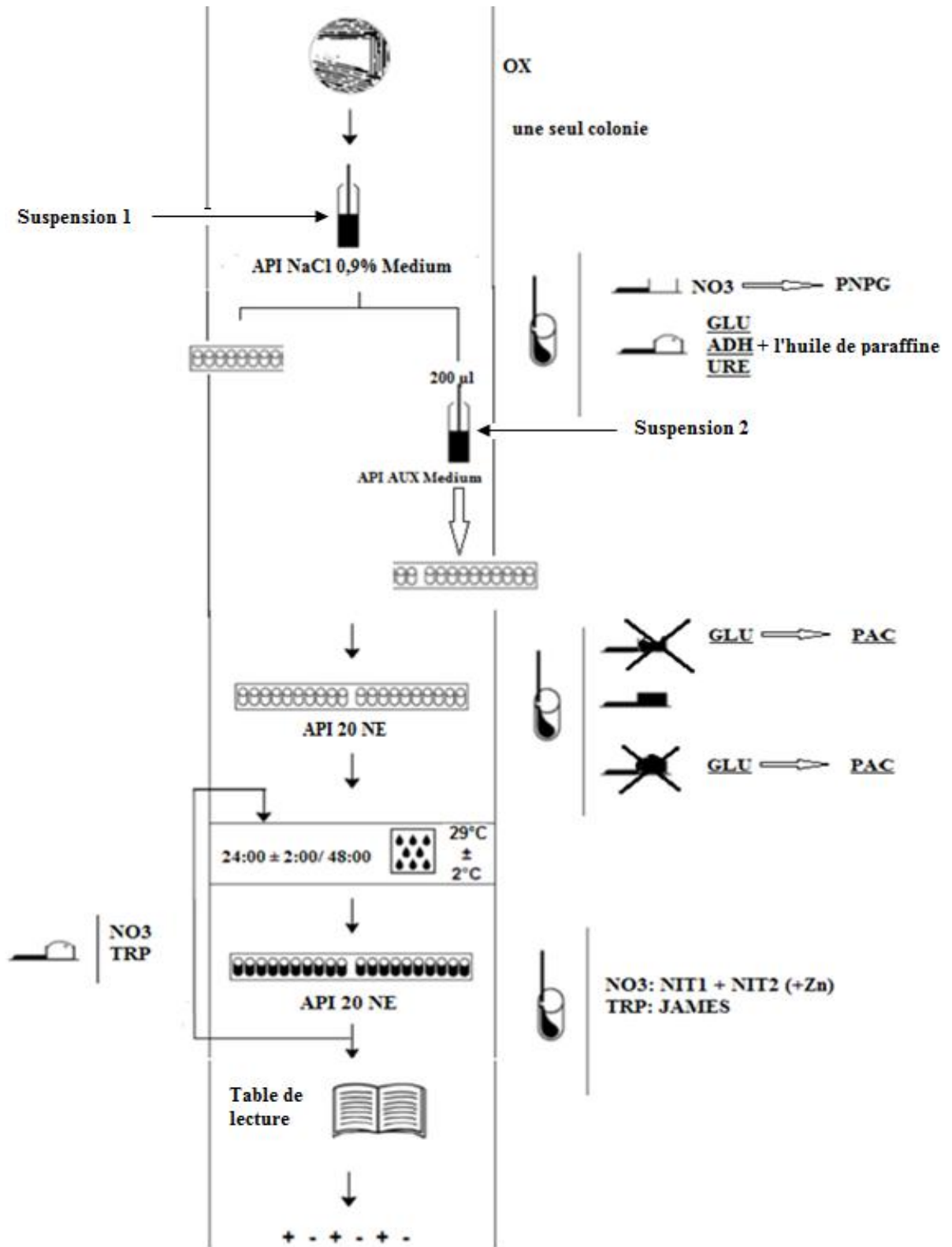
C_n : diamètre moyen de la croissance de pathogène en présence d'antagoniste;

C_o : diamètre moyen de la croissance de pathogène en absence d'antagoniste.



(Source: auteur, 2015)

Figure 5. Technique du test antifongique *in vitro*.



(Source : Auteur, 2015)

Figure 6. Protocole de la galerie API 20 NE

Tableau 2. Table de lecture de la galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYME S	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
N0₃	nitrate de potassium	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 min	
				Incolore	Rose rouge
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat	
				vert pâle jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange rose rouge
URE	urée	0,76	UREase	Jaune	orange rose rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1,28	Assimilation N-acétyle-glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0,78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1,12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1,56	Assimilation acide malique	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

Source : Bio Mérieux, 2011

VI. ANALYSE STATISTIQUE

Une analyse de variance (*ANOVA*) a été réalisée en considérant l'essai aléatoire ($\alpha=5\%$). La mise en évidence de différences significative concerne l'effet de chaque facteur contrôlé (F_1 : le champ, F_2 : les isolats bactériennes) et de leurs interactions ($F_1 \times F_2$).

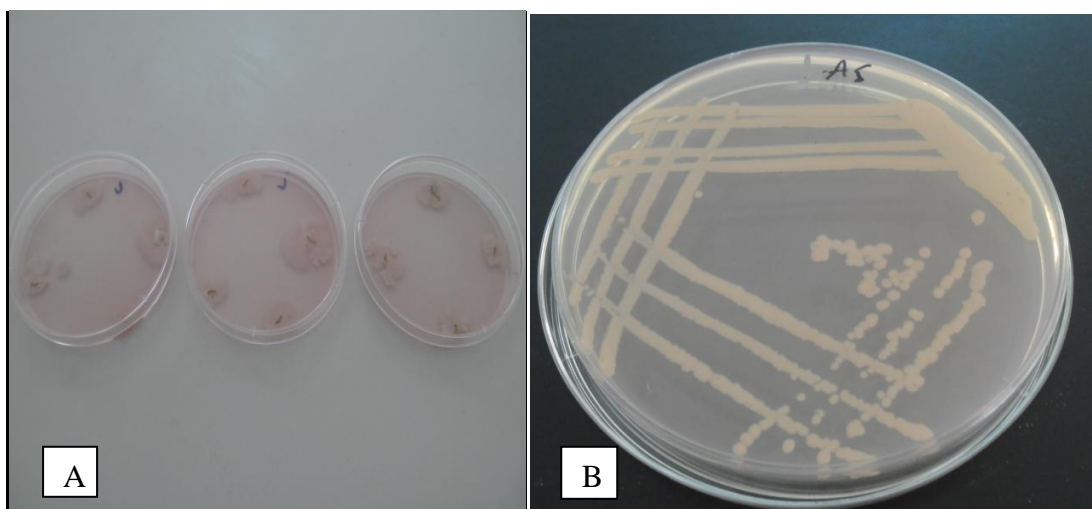
Chapitre III :
Résultats et discussion

I. RESULTATS

Au cours de cette étude vingt-quatre isolats ont été isolés et purifiés à partir des nodules de la fève. L'identification préliminaire de genre *Rhizobium* est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques et l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (la coloration de Gram, la recherche de l'oxydase, test d'anaérobiose,...etc.). Ainsi que la mise en évidence de leurs activités antifongiques contre trois champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *Fusarium pseudograminearum*). Les résultats obtenus sont les suivants:

I.1. Isolement et purification des bactéries

A partir de trois échantillons de plante *Vicia faba*, recueillies de trois sites d'étude ; nous avons retenu un total de 24 isolats, qui ont des caractéristiques de *Rhizobium*. La sélection a été basée sur les caractéristiques morphologiques typiques de la colonie (Figure 7).



Source : Auteur, 2015

A : Isolement par coupure de nodules

B : Culture pure.

Figure 7. Bactéries isolées à partir de la nodule

I.1.1. Validité de la désinfection superficielle

Dans le but de s'assurer de la réussite de la désinfection superficielle, la méthode décrite par Vincent (1970) nous a permis de confirmer expérimentalement que les isolats retenus sont des bactéries rhizobiales issues de nodules, et cela du à l'absence de croissance des cultures bioactives (Figure 8).



Source : Auteur, 2015

Figure 8. Validité de la désinfection superficielle

I.2. Identification des isolats

I.2.1. Identification morphologique des isolats

Après la purification, les 24 isolats ont marqué une forme circulaire de contour lisse avec un diamètre de 2 à 5 mm, leurs couleurs sont variables selon l'isolat (Tableau 3), nous avons regroupé les isolats en cinq groupes selon leurs couleurs :

1) Les colonies de : FG1, FG3, FN5, FN6, FG2, FG10, FA2, FA5, FA6, FA11, FN2 et FN4, sont caractérisées par une couleur beige translucide ou brillante et une texture variée entre gomme et douce.

2) Les isolats FG4, FG5 et FA1, ont une couleur blanc-opaque brillante et une texture gomme.

3) Les deux isolats FA3 et FA7 sont de couleur blanc laiteux terne et texture douce.

4) Les isolats FG6, FA4, FG8 et FN1 sont de couleur blanc terne et texture respectivement, deux collantes et deux douces.

5) Les trois isolats FA8, FA10 et FA9 : couleur beige terne et texture respectivement, deux doux et une gomme.

Tableau 3. Résultats de caractéristiques morphologiques des isolats

Isolats	Caractères morphologiques			
	Forme	Couleur	Texture	Diamètre (mm)
FG1	Circulaire, lisse	Beige	Gomme	2 à 4
FG2	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FG3	Circulaire, lisse	Beige	Gomme	2 à 4
FG4	Circulaire, lisse	Blanc-opaque	Gomme	2 à 4
FG5	Circulaire, lisse	Blanc-opaque	Gomme	2 à 4
FG6	Circulaire, lisse	Blanc	Collante	2 à 4
FG8	Circulaire, lisse	Blanc	Doux	2 à 4
FG10	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FA1	Circulaire, lisse	Blanc-opaque	Gomme	2 à 4
FA2	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FA3	Circulaire, lisse	Blanc-laiteux	Doux	2 à 4
FA4	Circulaire, lisse	Blanc	Collante	2 à 4
FA5	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FA6	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FA7	Circulaire, lisse	Blanc-laiteux	Doux	2 à 4
FA8	Circulaire, lisse	Crème	Doux	2 à 4
FA9	Circulaire, lisse	Crème	Gomme	2 à 4
FA10	Circulaire, lisse	Crème	Doux	2 à 4
FA11	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FN1	Circulaire, lisse	Blanc	Doux	3 à 5
FN2	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FN4	Circulaire, lisse	Beige	Doux	2 à 4
FN5	Circulaire, lisse	Beige	Gomme	3 à 5
FN6	Circulaire, lisse	Beige	Gomme	2 à 4

Source : Auteur, 2015

I.2.2. Test de Gram

Suite à La purification, un test de KOH a été effectué et suivi d'une coloration de Gram (Tableau 4), les 24 isolats ont montré un résultat positif de KOH, par la présence d'un filament visqueux formé entre la pipette et la lame, donc, tous les isolats sont des bactéries Gram négatives. Pour la confirmation de ce résultat, une coloration de Gram a été effectuée et les résultats de ce test confirment que les 24 isolats sont des Gram négatives, mais qu'il y a que 6 isolats ont une forme de bacille.

Tableau 4. Résultats de test KOH et Gram

Isolats	Test KOH	coloration Gram	Forme
FG1	+	G-	Cocci
FG2	+	G-	Cocci
FG3	+	G-	Bacille
FG4	+	G-	Cocci
FG5	+	G-	Cocci
FG6	+	G-	Cocci
FG8	+	G-	Cocci
FG10	+	G-	Cocci
FA1	+	G-	Bacille
FA2	+	G-	Cocci
FA3	+	G-	Bacille
FA4	+	G-	Cocci
FA5	+	G-	Cocci
FA6	+	G-	Cocci
FA7	+	G-	Cocci
FA8	+	G-	Cocci
FA9	+	G-	Cocci
FA10	+	G-	Cocci
FA11	+	G-	Bacille
FN1	+	G-	Cocci
FN2	+	G-	Cocci
FN4	+	G-	Cocci
FN5	+	G-	Bacille
FN6	+	G-	Bacille

"G-": bactérie a Gram négatif " + " : Réaction positive. " - " : Réaction négative.

Source : Auteur, 2015

I.2.3. Identification biochimique des isolats

Après une incubation des isolats à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48 heures, nous avons remarqué une croissance bactérienne sur les quatre milieux (YMA+RC, YMA+BTB, YMA+BCP, GPA) (Figure 9),

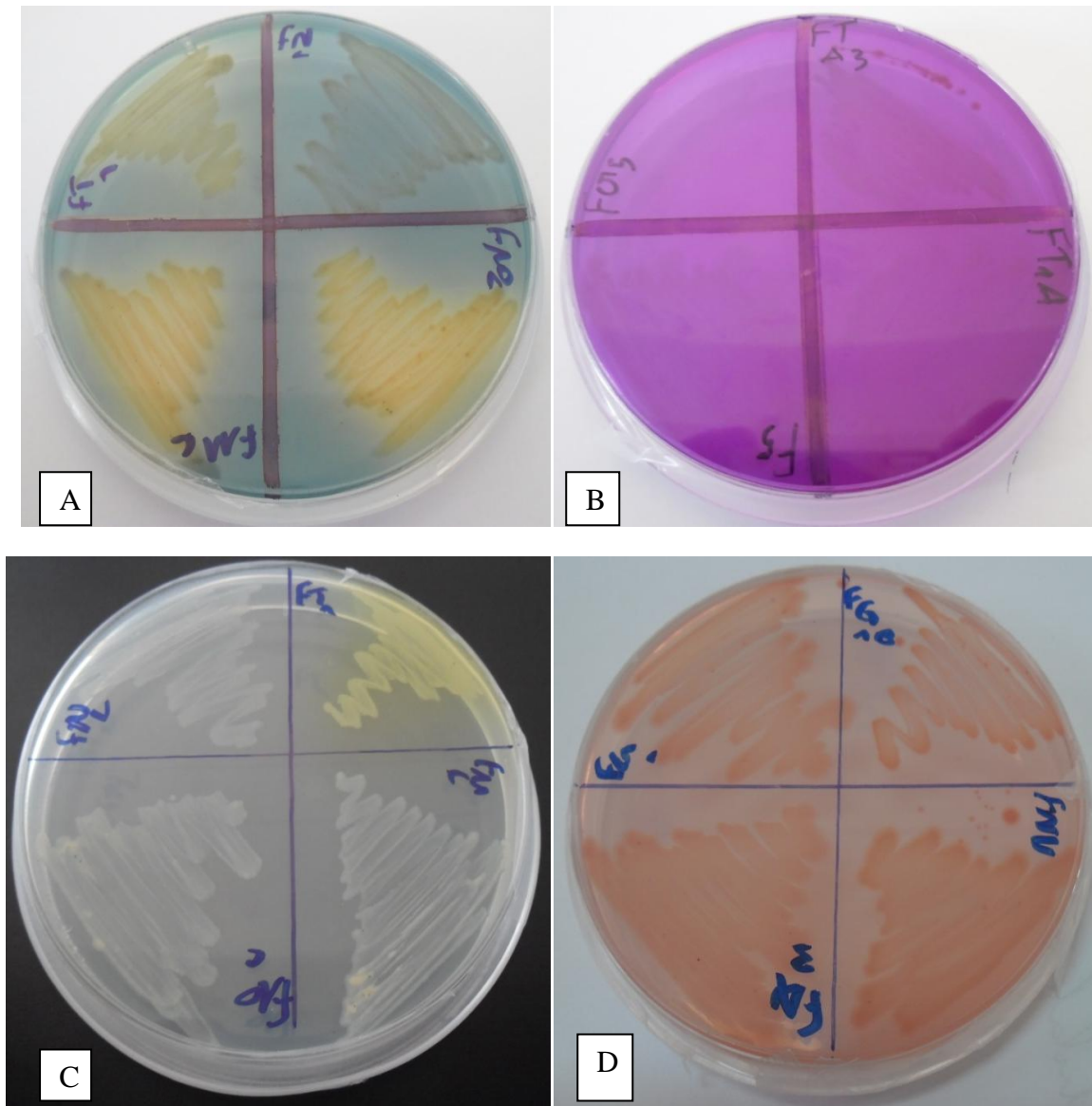
Sur milieu le YMA+RC, à l'exception de quatre isolats FG1, FA1, FA4 et FA9, qui ont marqué une couleur blanchâtre des colonies, tous les autres isolats ont marqué une couleur rose. Sur le milieu YMA+BTB ; les isolats FG2, FG6, FG8, FG10, FA6, FA7 et FA9, ont montré une couleur bleu, et le reste des isolats ont montré une couleur jaune. Sur le milieu YMA+BCP, tous les isolats n'ont entraîné aucun virage du couleur. Sur le milieu YMA+GPA, la présence de la croissance a été observé chez la majorité des isolats de trois (FG5, FG10 et FA8) (Tableau 5).

Tableau 5. Résultats de caractéristiques physiologiques des isolats

Isolats	YMA+Rouge Congo (RC)	YMA+Bleu de Bromothymol (BTB)	YMA + Pourpre de Bromocresol (BCP)	Glucose-Peptide- Agar (GPA)
FG1	Blanchâtre	Jaune	-	+
FG2	Rose	Bleu	-	+
FG3	Rose	Jaune	-	+
FG4	Rose	Jaune	-	+
FG5	Rose	Jaune	-	-
FG6	Rose	Bleu	-	+
FG8	Rose	Bleu	-	+
FG10	Rose	Bleu	-	-
FA1	Blanchâtre	Jaune	-	+
FA2	Rose	Jaune	-	+
FA3	Rose	Jaune	-	+
FA4	Blanchâtre	Jaune	-	+
FA5	Rose	Jaune	-	+
FA6	Rose	Bleu	-	+
FA7	Rose	Bleu	-	+
FA8	Rose	Jaune	-	-
FA9	Blanchâtre	Bleu	-	+
FA10	Rose	Jaune	-	+
FA11	Rose	Jaune	-	+
FN1	Rose	Jaune	-	+
FN2	Rose	Jaune	-	+
FN4	Rose	Jaune	-	+
FN5	Rose	Jaune	-	+
FN6	Rose	Jaune	-	+

Sur BCP virage du couleur : "+" Réaction positive. "-" Réaction négative
 Sur GPA : "+" Croissance. "-" pas de croissance

Source : Auteur, 2015



Source : Auteur, 2015

- A : YMA+Bleu de Bromothymol (BTB)
- B : YMA + Pourpre de Bromocresol (BCP)
- C: Glucose-Peptide-Agar (GPA)
- D: YMA+Rouge Congo (RC)

Figure 9. Résultats de la croissance de certains isolats sur quatre milieux de culture

I.3. Caractérisation des isolats

I.3.1. Test de la tolérance aux sels

Tous les isolats ont été testés pour déterminer leur seuil de tolérance vis-à-vis de cinq sels, à quatre doses. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Pour le NaCl, il ressort qu'à l'exception des isolats FN4 et FA6, qui ont montré une sensibilité au NaCl allant de 1g/l, tous les autres ont présenté une bonne tolérance au NaCl (croissance nettement visible).

D'après les résultats de CaCl₂ nous avons noté clairement que les isolats FG8, FG1 et FG4 sont totalement incapables de se développer en présence de CaCl₂. Les isolats FN1, FG3 et FN6 sont considérés sensibles à une dose allant de 1g/l, alors que 15 isolats tolèrent jusqu'à une concentration de 2g/l.

Pour les isolats testés au K₂SO₄, douze sont avérés tolérants à toutes les concentrations, en ce qui concerne les douze qui restent, l'isolat FG5 et FA4 semble plus sensible au K₂SO₄, les isolats FG1, FA1, FG4 et FA7 ont enregistré une sensibilité allant de 1g/l, la FG8 a montré une sensibilité à 1,5 g/l, Le reste (FA2, FN1, FG2, FG6, et FA5) ont une sensibilité à 2g/l

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que la majorité des isolats tolèrent d'une façon ordinaire les doses de N₂SO₄, à l'exception de quelques isolats à certaines doses, l'isolat FG1 est sensible à 1g/l ; et les isolats FA2, FG2, FA4, FN2 et FG5 sont sensibles à 2g/l.

Les 24 isolats semblent tolérants à la concentration de 0.5 et 1 g/l de KCl, mais à 1.5g/l quatre isolats (FG4, FN1, FG2 et FA7) ont marqué une sensibilité, alors que à 2g/l il n'y a que huit qui sont tolérants.

Tableau 6. Résultats de tolérances des isolats aux cinq sels et leurs concentrations.

isolats	NaCl				CaCL2				K2SO4				N2SO4				KCl			
	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
FG1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+/-	-
FG2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
FG3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
FG4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-
FG5	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+/-
FG6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
FG8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
FG10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
FA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-/+	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
FA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
FA3	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FA4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+
FA5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
FA6	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
FA7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-
FA8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
FA9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
FA10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-
FA11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
FN1	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-
FN2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
FN4	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FN5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
FN6	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

“+” : Réaction positive : tolérance. “-” : Réaction négative : pas de tolérance. “+/-” : Réaction variable

Source : Auteur, 2015

I.3.2. Tests de tolérance au pH

Après trois jours d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, la réponse des isolats à la variation du pH est regroupée dans le tableau 7. Les résultats montrent que la plupart des isolats sont capable de survivre à des valeurs de pH inférieur et supérieure à 7 comme a rapporté Jordan (1984) pour le genre *Rhizobium*. Les isolats FG8, FA5 et FA2 ont une croissance qu'au pH neutre (7) donc ils sont neutrophiles. Pour les isolats FG5 et FN1, ils ont une bonne croissance au milieu alcalin (8, 9 et 12) et une absence totale de croissance au milieu acide (5 et 6) ce qui indique qu'ils sont alcalophiles. Constatant aussi que l'isolat FA4 marque une bonne croissance à des pH de 5 à 9.

Tableau 7. Résultats de test de tolérance des isolats à la variation du pH.

Isolats	pH					
	5	6	7	8	9	12
FG1	+	+	+	+	+	-
FG2	+	+	+	+	+	+
FG3	+	+	+	+	+	+
FG4	-	+	+	+	+	+
FG5	-	-	+	+	+	+
FG6	+	+	+	+	+	+
FG8	-	-	+	-	-	-
FG10	+	+	+	+	+	+
FA1	+	+	+	+	+	+
FA2	-	-	+	+	-	-
FA3	+	+	+	+	+	+
FA4	+	+	+	+	+	-
FA5	-	-	+	-	-	-
FA6	+	+	+	+	+	+
FA7	+	+	+	+	+	+
FA8	+	+	+	+	+	+
FA9	+	+	+	+	+	+
FA10	+	+	+	+	+	+
FA11	+	+	+	+	+	+
FN1	-	-	+	+	+	+
FN2	+	+	+	+	+	+
FN4	+	+	+	+	+	+
FN5	+	+	+	+	+	+
FN6	+	+	+	+	+	+

"+" : Réaction positive : tolérance.

"-" : Réaction négative : pas de tolérance.

Source : Auteur, 2015

I.3.3. Résistance aux différentes températures

Comme toutes les bactéries du sol, les *Rhizobium* sont des organismes qui peuvent être inhibés par l'élévation ou la diminution de la température (Jordan, 1984).

D'après les résultats du tableau 8, il ressort clairement que tous les isolats ont une bonne croissance à 35°C et à 40°C à l'exception de FG1, FG2, FG10, FA9, FN2 et FA8. A la température de 4°C, 19 isolats présentent une croissance visible, sont considéré comme étant des psychrophiles. En faisant une comparaison avec les isolats développés à 4°C et ceux à 35°C et à 40°C, nous avons remarqué que les isolats FA1, FA2, FA6, FN2 et FG5, ont de nature mésophile. Les isolats FA1, FA10, FA11, FA5, FG6, FN6 et FG5, sont caractérisés par une résistance remarquable à 45°C, mais à 50°C il n'y a que l'isolat FA5 qui a enregistré une résistance.

Tableau 8. Résultats du test de la résistance des isolats à la variation de température.

Isolats	Températures				
	4°C	35 °C	40°C	45 °C	50 °C
FG1	+	+	-	-	-
FG2	+	+	-	-	-
FG3	+	+	+	+/-	-
FG4	+	+	+	-	-
FG5	-	+	+	+	-
FG6	+	+	+	+	-
FG8	+	+	+	-/+	-
FG10	+	+	-	-	-
FA1	-	+	+	+	-
FA2	-	+	+	+/-	-
FA3	+	+	+	-	-
FA4	+	+	+	-	-
FA5	+	+	+	+	+
FA6	-	+	+	-	-
FA7	+	+	+	-	-
FA8	+	+	-	-	-
FA9	+	+	-	-	-
FA10	+	+	+	+	-
FA11	+	+	+	+	-
FN1	+	+	+	-	-
FN2	-	+	-	-	-
FN4	+	+	+	-	-
FN5	+	+	+	-	-
FN6	+	+	+	+	-

“+” : Réaction positive : Résistance.

“-” : Réaction négative : pas de résistance.

Source : Auteur, 2015

I.3.4. La galerie API 20 NE

D'après les résultats du test d'oxydase, nous avons trouvé que 12 isolats ont donné une réaction positive par l'apparition d'une coloration bleu violète en contact avec les disques d'oxydase, ce qui signifie que ils sont des oxydases positifs, et le reste (12 isolats) ont été éliminé, car ils ont été considérés comme des oxydases négatifs.

En vue de caractérisé et identifié nos isolats obtenues après test oxydase, les douze isolats ont été testés pour leur faculté de dégrader et d'assimiler des sucres simples, acides aminés, de dégrader les nitrates (NO_3) en nitrite ou azote, de fermenté le glucose en absence de oxygène ...etc.

les résultats donnés par le tableau 9 montrent que les différentes isolats ont des activités biochimiques variable les unes des autres. En ce qui concerne les huit tests conventionnels et qu'à l'exception de TRP et GEL, aucun isolats n'a présenté une activité similaire à un autre.

Les isolats FG1, FG4, FN1 et FN6, sont incapables de réduire le NO_3 , par contre, le reste ont capable de réduire le NO_3 soit en nitrite, ou en azote.

Tous les isolats sont incapable de synthétisé l'indole acide aminé tryptophane.

L'un des tests les plus important GLU, tous les isolats sont incapable de fermenté le glucose en absence de l'oxygène, c'est-à-dire sont des aerobis strict, à l'exception de deux isolats FA2 et FA5 ont donné un resultat positif ce qui concerne la fermentation de glucose, ce qui indique que ces isolats sont des anaerobie.

L'arginine qui est une source intéressante d'azote, six de nos isolats FG1, FG3, FN1, FN6, FG3 et FA3 sont capable d'hydrolasé cet acide aminé, le reste d'isolats FA11, FG4, FA1, FA5, FG5 et FN5 sont dépourvue d'arginine hydrolase.

Dans le test URE, seulement deux isolats FA2 et FN1, caractérisé par la présence d'enzyme UREase catalyseur des réactions d'hydrolyse d'urée.

Les résultats de test ESC, montrent que tous les isolats ont l'enzyme B-glucosidase qui hydrolyse l'esculine en glucose et esculetine, par contre l'isolats FN1 et FN6 sont dépourvue de cet enzyme.

Le test GEL montre que tous les isolats présentent l'enzyme protéase, qui joue le rôle d'hydrolyseur des liaisons peptidiques de la gélatine.

Le test PNPG est utilisé souvent dans la caractérisation ou l'identification des micro-organismes, deux isolats indiquant la présence de la β -galactosidase, pour les autres nous pouvons déduire l'absence de cet enzyme.

Pour les douze tests d'assimilations, la majorité des isolats ont une réaction positive d'assimilation des sucres et des acides, à l'exception de deux tests (ADI et PAC); pour le premier (ADI : Assimilation d'acide adipique) tous les isolats n'ont pas pu l'assimiler, alors que le deuxième (PAC : Assimilation d'acide phénylacétique), quatre isolats ont donné une réponse positive, et les autres isolats ont une réponse négative.

Tableau 9. Résultats des tests de galerie API20 NE

Tests	Isolats											
	FG1	FG3	FG4	FG5	FA1	FA2	FA3	FA5	FA11	FN1	FN5	FN6
NO3	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
ADH	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
URE	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNPG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MAN	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CAP	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ADI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAC	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

"+" : Réaction positive. "-": Réaction négative.

Source : Auteur, 2015

I.4. Activités anti fongiques

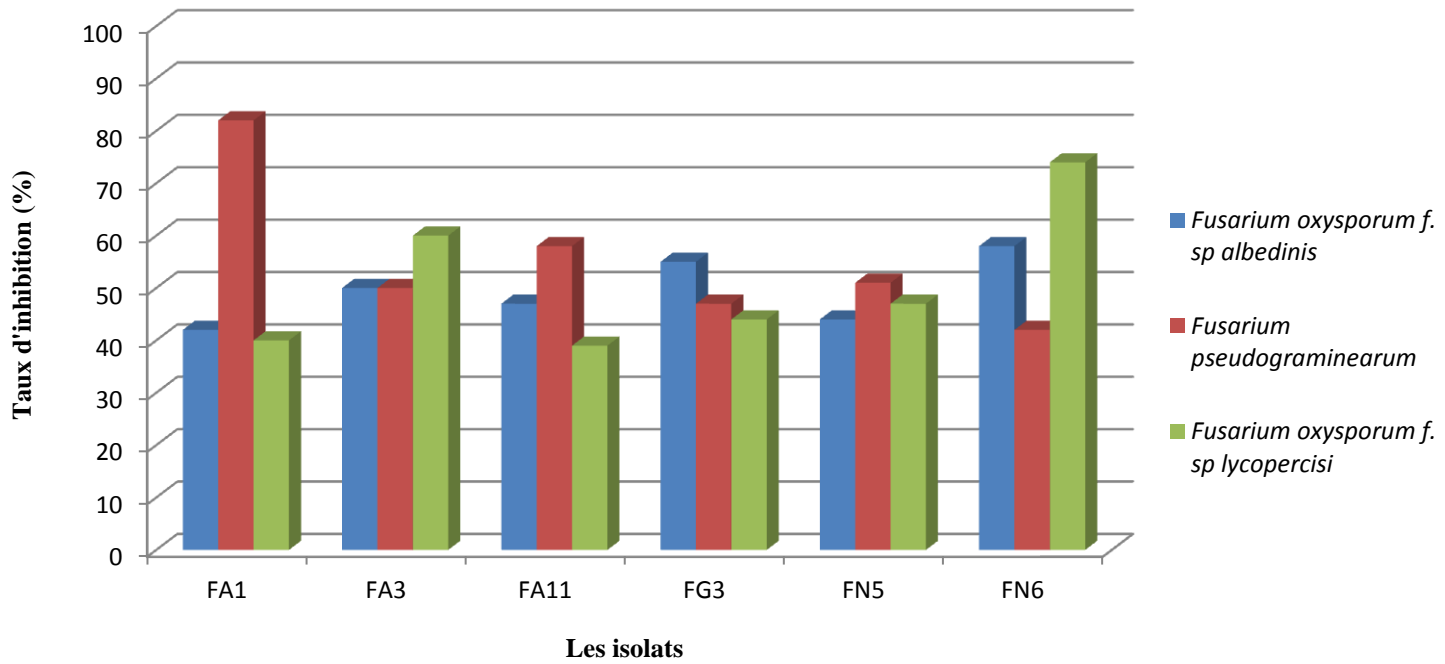
La figure 10 montre clairement que tous les isolats ont présenté, une activité antifongique vis-à-vis des trois champignons testé avec des taux d'inhibitions allant de 39% à 82%. Certains isolats comme le cas d'isolats FA1 et FN6, ont enregistré un taux d'inhibition de 70 à 80 %, les autres isolats ont une réponse antagoniste moyenne

Pour le *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*, nous constatons que le maximum taux d'inhibition était observé par l'isolats FN6 et FA5 avec 58%. En revanche, l'isolat FG5 a enregistré un taux d'inhibition avec 39%.

En ce qui concerne l'activité antifongique des isolats vis-à-vis le *Fusarium pseudograminearum*, nous remarquons que l'isolat FA1 a pu atteindre un taux de 82%. Nous remarquons aussi que, l'isolat FA2 et FA11 ont atteint respectivement 60 et 58%, les autres isolats ont enregistré un taux de 30% à 40%.

Concernant le *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopercisi*, une variabilité est observée, avec un taux d'inhibition de 74%, enregistré par FN6, des taux importants sont aussi enregistrés par les isolats FG5 et FA3.

Les résultats des analyses statistiques (*ANOVA*) ont montré qu'il n ya aucune différence significative, ce que nous permet de dire que malgré toute cette variabilité des résultats, nos isolats ont la même activité antifongique vis-à-vis des trois champignons quelque soit le taux d'inhibition enregistré.



Source : Auteur, 2015

Figure 10. Résultats de taux d'inhibition des isolats de *Rhizobium* sur la croissance mycélienne de : *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* ; *Fusarium pseudograminearum*; *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

II. DISCUSSION

L'objectif principal de la présente étude, est l'isolement, l'identification, et la caractérisation des isolats obtenues à partir des nodules de trois échantillons de *Vicia faba*, collectés de trois régions différentes de la wilaya de Laghouat.

Nous avons retenus pour notre travail vingt quatre isolats, le choix de ces isolats a été effectué selon leurs caractéristiques morphologiques. Dans un premier temps, les vingt quatre isolats ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique et physiologique avant de passer à une caractérisation pourtant sur l'assimilation et l'hydrolyse des sucres et des acides, Les isolats ayant montré des résultats intéressants et des caractéristiques prometteuses ont été retenues pour l'étude des activités antifongiques vis-à-vis de trois champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *Fusarium pseudograminearum*).

Après le test d'oxydase, qui nous a permis de garder douze (12) isolats qui ont une activité positive, 10 isolats ont donné des résultats négatifs en condition d'anaérobiose (pas de fermentation de glucose).

Le test de Gram nous a permis de garder six (06) isolats qui correspondent à des bacilles à Gram négatif correspondant au *Rhizobium*, ces dernières possèdent une paroi épaisse à deux couches de peptidoglycane qui empêche la dégradation du violet de gentiane par l'alcool, donc les germes gardent la couleur violet. Par contre les bactéries de Gram négatif possèdent une paroi mince permettant la dégradation par l'alcool et la recoloration par la fuschine. Ces résultats confirmant les isolats obtenus par le test KOH.

L'ensemble des tests précédents montre que les 06 isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) ont des caractéristiques rhizobiales, en raison que les *Rhizobium* sont des bactéries du sol de formes bâtonnets, à Gram négatif aérobies. Elles sont non sporulantes chimiohétérotrophes, d'une largeur variant entre 0,5 et 0,9 μ et une longueur comprise entre 1,2 et 3 μ (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Le milieu de YMA à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, des colonies sont rondes variant de plat à dôme d'une surface lisse marge, et une taille varie entre 2 à 5 mm, ont été observées pour les six isolats. Cela semble compatible avec les données bibliographiques de Somasegaran et Hoben (1985). Tous les isolats ont enregistré une croissance rapide de 48 à 72 heures au maximum. Le taux de croissance varie en fonction de la température d'incubation (optimum $25-30^\circ\text{C}$). Donc ça confirme que nous sommes en présence du genre *Rhizobium*

à croissance rapide. La fève est classée parmi les espèces noduleuses par les isolats de rhizobias à croissance rapide (Hirsch, 1992).

Nous avons aussi trouvé la plupart des caractères de couleur et texture qui stipulent en partie de la caractérisation de *Rhizobium* décrite par Somasegaran et Hoben (1985), Colonies peuvent être blanc-opaque ou ils peuvent être laiteux de liquide translucide. La croissance de la colonie opaque et raffermie généralement avec peu de gomme, alors que les colonies moins denses sont souvent collantes et douces. Les colonies peuvent être brillantes ou ternes, uniformément colonies opaques ou translucides, mais beaucoup se développent plus sombre centres de marques en forme de nervures avec l'âge.

L'ensemble des isolats testés produisent au bout de 48 heures des colonies ayant absorbé peu ou pas le rouge Congo restant rose à blanchâtre une caractéristique observée chez le *Rhizobium* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Les *Rhizobium* vont absorber le colorant rouge si les boîtes sont exposées à la lumière pendant l'incubation ou exposé à la lumière pendant une heure ou plus après la croissance (Somasegaran et Hoben, 1985).

Pour la mise en évidence de la vitesse de croissance, Les d'isolats testés ont montré une croissance en 48 heures et transformé le milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) à la couleur jaune, réaction est habituellement produite par le *Rhizobium* à croissance rapide (Somasegaran et Hoben, 1985). La croissance sur milieu YMA + GPA, a été observée chez les isolats après 48 heures d'après. Ces résultats répondent aux caractères des bactéries nodulantes, les légumineuses de la famille des *Rhizobiaceae* (Vincent, 1970). Après 24 heures d'incubation des isolats sur milieu YMA + BCP, tous les isolats ont développé une croissance sans acidifiant ou entraînant un virage de couleur. Les caractères culturels sont des tests fondamentaux dans la taxonomie du *Rhizobium*, mais insuffisants pour conclure (Zhang et al., 1991).

Les isolats ont montré ainsi une large tolérance vis-à-vis pH testés. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Jordan (1984) ; Glenn et Dilworth (1994) et Correa et Barneix (1997), indiquant que les rhizobias présentent des réponses variées face aux variations du pH et que différents souches de la même espèce peuvent varier grandement dans leur tolérance au pH. Graham et al., (1994) ont montré aussi que les souches à croissance rapide peuvent tolérer des valeurs très basses de pH. En effet, *R. leguminosarum*, *R. gallicum*, *R. giardinii* et *R. tropici* peuvent croître à pH 4 (Garrity et al., 2005).

Certains isolats peuvent se montrer plus sensibles au pH faible que leur hôte, ce qui affecte l'établissement de la symbiose, limitant la survie et la persistance des *Rhizobium* (Zahran, 1999). La performance de certaines symbioses sous conditions d'acidité est

meilleure lorsque les souches ont été isolées de rhizobiales sols acides (Zahran, 1999). Dans notre essai les six isolats croître à un pH de 5 qui est inférieur au pH toléré par l'association fève-*Rhizobium*. En plus la capacité des isolats à utiliser une large gamme de substrats de carbone est également liée à la survie de ces isolats dans des environnements acides. Les *Rhizobium* sont capables de métaboliser différentes sources de carbone, de sorte que leurs produits améliorent le pH de l'environnement (Glenn et Dilwarth, 1994). Dans les conditions acides du catabolisme, les acides organiques et des acides aminés conduisent à une alcalinisation (Ibekew et al., 1997) et cette action tampon peut aider dans l'adaptation de la légumineuse dans les sols acides. Cette fonction peut rendre ces isolats plus compétents en sol acide.

La résistance des isolats aux différents degrés de température a été variable. Les isolats ont montré une large résistance à 4°C, à l'exception de FA1, l'ensemble pu croître à 35°C et à 45°C, ces résultats concordent avec celles de Graham (1992), rapportant que les *Rhizobium* peuvent se développer à des températures comprises entre 10°C et 37°C. D'autres études ont démontré que certaines *Rhizobium* sont capables de croître à différentes températures jusqu'à 41 à 45°C dans les cultures artificielles (Giddens et al., 1982). La tolérance à 40°C est peut être due à la température des sites d'isolements situés en zones chaudes. Cependant plusieurs auteurs ont signalé qu'il n'existe aucune corrélation entre ces deux paramètres (Zahran et al., 1994 ; Mohammed et al., 2000).

Robert (1976) dans ces études a estimé que les *Rhizobium* à croissance lente étaient beaucoup plus tolérants aux températures élevées que les *Rhizobium* à croissance rapide. Cependant, la survie des températures très élevées ne signifie pas l'efficacité de la fixation de l'azote. Les isolats obtenus à partir de *Rhizobium* des environnements chauds et secs qui ont une croissance à 45 °C ont perdu leur efficacité. Exemple du biovars phaseoli de *Rhizobium* a montré que certaines souches ont pu noduler le *vicia faba* à haute température (35 °C et 40 °C), mais les nodules formés étaient inefficaces et les plantes n'ont pas accumulé de l'azote (Zahran, 1999). Bien que des températures efficaces pour la fixation de l'azote pour les fèves ont été autour de 30 °C. Malgré le fait que les températures élevées du sol se traduisent généralement par la formation de nodules inefficaces, plusieurs souches de *Rhizobium* ont été rapportées pour être tolérantes à la chaleur et pour former d'efficace symbiose avec leurs hôtes (les légumineuses) (Graham, 1992).

La présente étude a indiqué, que les six isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) étaient capables de tolérer d'une façon générale les concentrations de cinq sels utilisés (NaCl,

K_2SO_4 , N_2SO_4 , KCl, $CaCl_2$). Les travaux de Nour *et al.*, (1994) et (1995), Jarvis *et al.*, (1997) ont montré que les *Rhizobium* nodulant la fève (*vicia faba*) peuvent tolérer des concentrations en NaCl de 1 à 2g/l. Tout fois Kucuk *et al.*, (2006) ont rapporté que certains isolats Rhizobiennes ont été cultivés en présence de 4,5% de NaCl. Même chose est observée pour la souche *R. meliloti* (Kassem *et al.*, 1985). Il est souvent dit que les sols salins sélectionnent naturellement des souches plus tolérantes à la salinité (Berraho *et al.*, 2003).

Il semble que la sensibilité des souches de *Rhizobium* à la salinité dépendrait de la nature chimique de sel. Le Potassium (K) accompagné de chlore (CL), entraîne une forte toxicité dès la concentration de 1,5g/l. Par contre, le calcium (Ca) à une concentration de 1 à 2g/l est indépendant de l'ion d'accompagnement, exerce une faible inhibition sur la croissance; alors que l'effet toxique de chlorure (Cl), et de sulfate (SO_4), ne se manifeste qu'en présence du potassium (K). Toutefois, à des concentrations plus élevées, les potassiums sont plus néfastes que les sulfates de sodium et de chlorure de calcium (Elsheikh et Wood, 1989) Contrairement à ça. Amara et Miller (1986) ; Brhade et Le Rudulier, (1995) ont montré que les chlorures et sulfates n'avaient pas le même effet inhibiteur sur la croissance de *R. meliloti*. *R. phaseoli* et *R. leguminosarum* *bv. Viciae*, nos résultats concordent plutôt avec ces derniers.

L'inhibition de la croissance bactérienne par les sels, résulte de deux effets qui peut présenter un stress salin, un effet ionique et un effet osmotique (Bohlool, 1982 ; Botsford, 1984). Dans le cas de l'effet ionique, l'influence des sels sur la croissance est due aux effets que peuvent représenter les ions Na, Ca, K, CL, SO_4 fortement représentés dans le milieu, sur le métabolisme des bactéries, ces ions à certains seuils inhibent de nombreuses fonctions métaboliques par interaction de ces ions avec les macromolécules notamment les protéines et les acides nucléiques dont la structure peut être affectée par l'excès d'ions (Yancey, 1994).

Par ailleurs, l'enrichissement du milieu et/ou le cytoplasme en ions peut provoquer un déséquilibre électrolytique induisant une perturbation de la dynamique des échanges entre la cellule et le milieu (Yancey, 1994).

Cette sélectivité de la membrane plasmique qui permet aux cellules de défier en permanence les lois physiques de la diffusion est cependant à l'origine de la deuxième manifestation de la salinité, l'effet osmotique. Du fait de la relative imperméabilité de la cellule aux ions, leur présence dans le milieu se traduit par augmentation de l'osmolarité de ce dernier par apport au cytoplasme. Cette augmentation de l'osmolarité du milieu génère

un déséquilibre osmotique entre le compartiment cellulaire et l'extérieur. Ce déséquilibre provoque une sortie d'eau et une perte de turgescence de la cellule. Il s'en suit une réduction du volume cytoplasmique qui peut atteindre un niveau qui n'est plus compatible avec la division cellulaire (Le Rudulier, 1993).

Pour plus de caractérisation de ces isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6), ces derniers montrent une variabilité remarquable, en ce qui concerne la présence des enzymes hydrolasés catalytiques et à l'exception du test TRP qui enregistré un résultat négatif pour les six isolats. Seuls trois isolats obtenu dans cette étude étaient en mesure d'utiliser l'arginine, qui est conforme avec d'autres travaux indiquent que l'arginine et le tryptophane sont rarement utilisés par les *Rhizobium* (Jordan, 1984).

Concernant le teste d'assimilation nous avons trouvé que nos 06 isolat pouvant assimiler les sucres simples et les acides, à l'exception de deux acides, l'ADI (acide adipique) et le PAC (acide phénylacétique) où seulement l'isolat FA3 est capables de l'assimilé.

Il a été établi que *Rhizobium* est capable à utiliser une grande variété de sources de carbone pour la croissance et avoir plusieurs voies disponibles pour le catabolisme du carbone (Stowers, 1985). L'utilisation de différentes sources de carbone est un outil efficace pour caractériser les isolats (Mirza et al., 2007; Erum et Bono, 2008). Les isolats (FG3, FA1, FA3 et FA11) obtenus à partir des nodules ont été capables d'utiliser le glucose (GLU), l'arabinose (ARA), le mannose (MNE), le mannitol (MAN) et le maltose (MAL), comme source de carbone, en exception, les deux isolats (FN6 et FN5) ont incapable d'utilisé respectivement le MNE et le MAN. Ces sources de carbone sont généralement utilisés par des bactéries du genre *Rhizobium* (Stowers, 1985). Sadowsky et al., (1983) et Anand et Dogra, (1991) ont également observé que les souches rhizobiales à croissance rapide assimilent une plus grande variété des acides que les souches à croissance lente. Leur capacité à métaboliser un large éventail de substrats de carbone peuvent être avantageuses pour la survie dans le sol.

D'après les résultats de l'activité antifongique sur le milieu PDA, les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes importantes jusqu'à 82%. Ceci peut s'expliquer par l'implication de différents mécanismes d'action. Des chercheurs ont indiqué que la composition en nutriments a un effet sur la production des antibiotiques (Harir, 2010).

Ces isolats possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs, dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribué à la synthèse des antibiotiques et d'autres types des métabolites à effet d'antibiose (Erum, et Bano, 2008). Le principal mécanisme mise en cause dans l'effet d'antagonisme des souches de *Rhizobium* sp. est celui de la chélation du fer ferrique par des siderophores produite sous l'influence de l'environnement et les conditions de culture *in vitro*. Les *Rhizobium* Produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant la paroi cellulaire. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Erum, et Bano, 2008).

A l'issus de ces résultats, nous pouvons dire que les isolats étudiés de nodules ont contribués dans la protection des légumineuses contre plusieurs maladies par conséquence, une meilleure protection des racelles contre divers champignons telluriques peut induire la promotion de leur croissance.

*Conclusion et
perspectives*

CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif, d'une part, d'isoler, identifier différents isolats issus des nodules de trois échantillons de *Vicia faba*, et d'autre part, la mise en évidence de leurs activités antifongiques contre trois champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *Fusarium pseudograminearum*).

Notre première préoccupation a été d'obtenir des isolats purs et répondent aux caractéristiques de *Rhizobium*. L'isolement et la purification, ont permis de sélectionner 24 isolats bactériens selon les caractères morphologiques. L'utilisation des tests physiologiques et biochimiques classiques (coloration de gram, test anaérobie, recherche de l'oxydase.....etc.), ont permis de sélectionner 06 isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) apportant des caractéristiques *Rhizobiales*, malgré que les caractères physiologiques et biochimiques sont des tests fondamentaux dans la taxonomie du *Rhizobium*, mais cette identification reste préliminaire et insuffisante pour conclure.

Des tests de tolérance aux sels, pH et la résistance aux températures sélection que ces 06 isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) ont subi. Ont montré que nos 06 isolats étaient capables de tolérer d'une façon générale les concentrations de cinq sels (NaCl, K₂SO₄, N₂SO₄, KCl, CaCl₂), à l'exception de l'isolat FG3 qui a enregistré une faible tolérance au CaCl₂. Ils montrent aussi que les différents pH (5, 6, 7, 8, 9 et 12), n'avaient aucune influence sur la croissance des 06 isolats. Concernant la température, la résistance a été variable, l'ensemble d'isolats ont pu croître à 35°C et à 45°C, et aussi à 4°C à l'exception de FA1, la température 45°C a été inhibitrice pour les isolats FA3 et FN5, mais la température 50°C a été inhibitrice pour l'ensemble des isolats.

Les six isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6) ont été testés pour leur faculté de dégrader des sucres simples, acides aminés, de dégrader les nitrates (NO₃) ...etc.

Ils montrent une variabilité remarquable en ce qui concerne la présence des enzymes hydrolasés catalytiques, et une activité d'assimilation similaire des sucres simples et des acides, à l'exception de deux sucres, l'ADI (acide adipique) et le PAC (acide phénylacétique) où seulement l'isolat FA3 est capable de l'assimiler.

Les six isolats ont été testés *in vitro*, pour leur activité antifongique vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *Fusarium pseudograminearum*) sur milieu PDA. Les différents isolats ont une activité variable sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes selon l'isolat et le champignon testé. Les résultats de ces tests montrent que les isolats ont une activité antifongique plus importante.

Ces résultats doivent être pris en considération dans les futurs travaux sur la lutte biologique, ainsi dans la promotion de la croissance des plantes cultivées d'un point de vue fixation d'azote atmosphérique.

La présence des isolats cultivés dans des conditions de laboratoire stressées dans nos essais indique leur importance dans la contribution biologique de fixer l'azote pour les écosystèmes stressants. Cela montre la possibilité de dépistage des isolats tolérants du sol où ils sont naturellement sélectionnés. La présence d'isolats d'une bonne association et croissance des légumineuses devient plus intéressante puisque l'isolat sélectionné est tolérant. Grâce à une sélection rigoureuse et une caractérisation précise.

Il est fortement souhaitable de mieux comprendre les interactions entre les nodosités fixatrices d'azote et leur environnement rhizosphérique. Nous suggérons de continuer l'étude des six isolats (FG3, FA1, FA3, FA11, FN5 et FN6), pour plus de précision et de confirmer l'identification de l'espèce par des techniques plus précises, notamment la taxonomie moléculaire, test d'inoculation et de nodulation des légumineuses, l'utilisation des souches de référence. En outre, tester l'aptitude de ces isolats à produire des composés antifongiques, et d'étudier leur potentiel protecteur vis-à-vis d'autres agents phytopathogènes *in vivo*, et sur la promotion de la croissance de la plantule et la faculté de production de phytohormones notamment l'AIA et l'AG3, ainsi que la fixation de l'azote atmosphérique.

*Références
bibliographiques*

- **ALLEN O.N. & ALLEN E.K., 1950.** Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacterial. Rev.*, **14**, 273-330.
- **AMARA D.S ET MILLER R.H., 1986.** Effect of moisture and salt stress on selected *rhizobium phaseoli* strains. *MIRCEN J.* 2: 273-282.
- **ANAND, R.C. AND DOGRA, R.C. (1991).** Physiological and biochemical characteristics of fast and slow growing *Rhizobium* sp., from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Appl. Bacteriol.* 70:197-202.
- **ANEJA, K. R. 2003.** Experiments in Microbiology Plant Pathology and Biotechnology, 4th edition, New Age International Publishers, New Delhi, India.
- **ANTOUN.H., BORDELEAUL.L. M., GAGNON.C. ET R. A. LACHANCE. 1978. :** Effet du dextrose et de l'extrait de levure sur l'interaction entre deux especes de *Rhizobium* et quelques champignons. *Phytoprotection* 5 9, 558-562.
- **AUBERT, G. 1980.** Méthodes d'analyse des sols. Ed. centre nationale de Documentation Pédologique. P 188.
- **AZIZI S, OULED AMRANE S, 2005 :** caractérisation phénotypique des souches de rhizobium associées à quelques légumineuses de la région d'El Goléa, mémoire de D E U A, 40p.
- **BECKER. J. O., HEDGES. R. W. AND E. MESSENS. 1985.** Inhibitory effects of Pseudobactine on the up take of iron by higher plants. *App. Environ. Mbiol.* pp. 49, 1090-1093.
- **BEGUM, A.A., LEIBOVITCH, S., MIGNER, P., ZHANG, F., 2001.** Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52 : 1537-1543.
- **BENIZRI, E. BAUDOIN, E. ET GUCKERT, A. 2001.** *Root colonization by inoculated plantgrowth rhizobacteria.* *Biocontrol Science and Technology.* 11: 557-574 p.
- **BERRAHO E.B. MAATALLAH J., FILALI-MALTOUF A., 2003.** Diversité des souches de rhizobium ciceri isolées des régions aride du Maroc: Infectivité, efficience et tolérance à la salinité. In: Drevon J.J et Sifi B. (Eds): Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranées. INRA. Paris. les Colloques n°100. pp 149-162.

- **BHATTACHARJEE, R-B. SINGH, A. ET MUKHOPADHYAY, S-N. 2008.** *Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges.* Applied Microbiology and Biotechnology.80: 199-209 p.
- **BNEDER, 2005.** Élaboration d'un schéma d'aménagement et de développement durable de la région hauts plateaux centre (HPC) à l'horizon 2025. Rapport de mission 1 : État des lieux et analyse des tendances. 551p.
- **BOHLOOL B, EL SWAIFY S.A., SINGLETON P.W., 1982.** Effect of salinity on rhizobium growth and survival. Environ. Microbiol. 44: 884-890.
- **BORDELEAU, L. M. 1989.** Potentiel du *Rhizobium* comme agent de lutte biologique. Phymprotecron. Pp. 70, 31-41.
- **BOTSFORD J.I., 1984.** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. Arch. Microbiol. 137: 124-127.
- **BOUABOUB K, 1991 :** L'influence des nitrates sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche, Mémoire d'ingénieur, INA Alger, p 55.
- **BOUDMAGH, A. 2007.** *Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives.* Thèse de doctorat : Université de Mentouri Constantine. 144 p.
- **BOUIZGARNE, B. EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. MADIONA, K. BILIGUI, B. MONESTIEZ, M. PENNARUN A-M. AMIAR, Z. RONA, J-P. OUHDOUCH, Y. EL HADRAMI, I. BOUTEAU, F. 2006.** *A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm Orobanche ramosa.* 550-556 p.
- **BRHADA F., LE RUDULIER D., 1995.** Osmorégulation chez les bactéries et chez *Rhizobium* en particulier: rote de la glycine bétaine dans l'osmorégulation chez *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*. In: Drevon J.J. (Ed): Facteurs limitant la fixation d'azote dans la Bassin Méditerranéen. INRA. Paris. pp 127-137.
- **CARDON, Z-J. ET GAGE, D-J. 2006.** *Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective.* Annual Review of Ecology. Evolution and Systematics, 37: 459-488 p.
- **CHABBI, R. 2009.** *Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien.* Thèse de magster : Université de Mentouri Constantine. 126 p.
- **CHAUX, C.L., FOURY, C-L. 1994.** *Cultures légumières et maraichères.* Tome III : légumineuses potagères, légumes fruit. Paris : Tec & Doc Lavoisier. 563p.

- **CHELOUFI H, 1991** : Etude du devenir de fertilisants azotés minéraux dans quatre types de sols cultivés lorrains : conséquences agronomiques et écologiques, Thèse Doctorat INPL, ENSAIA, NANCY (France) ,143p.
- **CHISHOLM S.T., COAKER G., DAY B. AND STASKAWICZ B.J. 2006.** Hostmicrobe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell. Pp.124: 803-814.
- **CHOUAR W, 2006** : Effet du cumul de pluie hivernale sur la réponse du cultivar WAHA à la fertilisation azotée. Mémoire de Magister, Batna, P 66.
- **CLEYET-MAREL, J.C. 1989.** Protocole de prélèvement et de conservation de nodosités récoltés sur les racines de Légumineuses. In : fichier technique de fixation symbiotique de l'azote, II RHIZ 1C. Rome: FAO.
- **CONFIDA, 2011.** *Disque d'identification Oxydase.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <https://www.google.dz/url?sa=t&ret=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=>
- **CORREA, O.S. AND BARNEIX, A.J. 1997.** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World J. Microbiol. Biotech. 13:153-157.
- **D.S.A, 2014.** Direction des services agricoles (Laghouat) statistique agricoles.
- **DJIGAL. D, 2003.** Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhizienne) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3ème cycle de biologie végétal, 166p.
- **DOMMARGUES Y, DUHOUX E, DIEM H, 1999** : Les arbres fixateurs de l'azote, ed, CRAD, édition espace34, FAO, IRD, P 499.
- **DUCHAUFOR. PH, 2001.** Introduction à la science du sol. 6ème édition de l'abrégé de pédologie. Dunod. Ed. Masson. Paris. 314p.
- **EL IDRISSE, M.M., AJAN, N., BELABED, A., DESSAUX, Y. AND FILALI-MALTOUF, A. 1996.** Characterization of Rhizobia isolated from Carob tree (*Ceratonia siliqua*). J.Appl. Bacteriol. 80: 165-173
- **ELAD Y. AND CHET I. 1987.** Possible role of competition for nutrients in biocontrol of pythium damping-off by bacteria. Phytopathology, 77: 190-195.
- **ELHASSAN, G-A. ABDELGANI, M-E. OSMAN, A-G. MOHAMED, S-S. ET ABDELGADIR, B-S. 2010.** *Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan.* Journal of Nutrition, 9: 926-934 p.

- **ELSHEIKH E.A.E ET WOOD., 1989.** Reponse of Chick pea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ion effects of salts. *Soil Biol. Biochem.* 7 : 889-895.
- **ERUM, S. AND BANO, A. 2008.** Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of Northern areas of Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.* 10:536-540.
- **EVERS G.W. 2003.** Nitrogen fixation process. Site web: www.legume nitrogen fixation and transfer.com.
- **F.A.O, 2005.** Annuaire statistique de la FAO.
- **FRANK, B., 1889.** Uber die pilzsymbiose der leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7 : 332-346.
- **GAGE D.J., 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol.Rev.*, **68** (2), 280-300.
- **GARRITY, G. JONES, D. KRIEG, N.R. LUDWIG, W.; RAINEY, F.A. SCHLEIFER AND K-H WHITMAN. 2005.** *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria :The Alpha.*1183p.
- **GIANINAZZI, S. GOLLOTTE, A. BINET, M-N. VAN TUINEN, D. REDECKER, D. ET WIPF, D. 2010.** *Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services.* Mycorrhiza.
- **GIDDENS, J.E., DUNIGAN E.P. AND WEAVER R.W. 1982.** Legume inoculation in the Southeastern U.S.A. Southern Cooperative Series Bulletin 283. The University of Georgia College of Agriculture Experiment Stations.
- **GLENN, A. R., AND M. J. DILWORTH. 1994.** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:1-10.
- **GOBAT. J, ARANGO. M, MATHEY.W, 2003.** Le sol vivant, base de pédologie, biologie des sols ,568p.
- **GOODFELLOW, M., MINNIKIN, D-E. 1985.** *chemical methods in bacterial systematics.* Academic Press. London. P. 173-199.
- **GRAHAM P.H. 1992.** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* vol 38 : pp475-484.
- **GRAHAM P.H., 1991.** What are Rhizobia?. The College of Agricultural Food and Environment Science.

- **GRAHAM P.H., VANCE C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use, *plant physiol.* 131 : 872-877.
- **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. *Canadian. Journal of Microbiology.* 40. 198-207.
- **GYANESHWAR, P., HIRSCH, A.M., MOULIN, L., CHEN, W.M., ELLIOTT, G.N., BONTEMPS, C., DE LOS SANTOS, P.E., GROSS, E., DOS REIS, F.B.J., SPRENT, J.I., YOUNG, J.P.W., JAMES, E.K., 2011.** Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *The American Phytopathological Society* 24 : 1276-1288.
- **HALITIM, A. 1998.** Les sols des régions arides d'Algérie. Alger : OPU. 384p.
- **HARIR, M. 2010.** *Effet antagoniste enter les souches d'actinomycètes et Verticillium dahliae kleb agent de la verticilliose de l'olivier.* Thèse de Magister: l'Université d'Oran. 272 p.
- **HAUKKA K., LINDSTROM K. & YOUNG P.W., 1998.** Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol.Rev.*, **64** (2), 419-426.
- **HIRSCH A.M. 1992.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211- 237.
- **HOPKINS W.G., 1999.** Introduction to plant physiology, second edition. John Wiley andsons, Inc.
- **IBEKWE, A.M., ANGLE, J.S., CHANEY, R.C. AND VAN BERKUM, P. 1997.** Differentiation of clover *Rhizobium* isolated from biosolids-amended soils with varying pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:1679-1684.
- **JARVIS B.D.W., VANBERKIM P., CHER X ., NOUR S.M. ; FERNANDEZ M.P. ; CLEYET- MAREL J.C., CILLIS M. 1997.** transfer of *Rhizobium loti* , *Rhizobium huakuri*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneums* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov.*Int.j.Syst .bacteriol.* 49, 895-898.

- **JEBARA M., DREVON J.J., AOUANI M.E. 2001.** Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native Rhizobia from Tunisian soils , *Agronomie* 21: 601-605.
- **JONES J.D.G. AND DANGL J.L. 2006.** The plant immune system. *Nature*.pp. 444, 323-329.
- **JONES. J. D. G., GRADY. K. L., SUSLOW. T. V. AND J. R. BEDBROOK. 1986.** Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO. J.* PP. 5; 467-473.
- **JORDAN D.C., 1984.** Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N. R. et Holt J. G. eds., Baltimore, pp. 234-245.
- **JORDAN, D.C., 1982.** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* 136-139.
- **KASSEM, M., CAPELLANO, A. AND GOUNOT, A.M. 1985.** Effects du chlorure de sodium sur la croissance in vitro. Pinfectivite et Pefficience de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEJ.* 1:63-73.
- **KENT, A-D. ET TRIPLETT, E-W. 2002.** *Microbial communities and their interactions in soil land rhizosphere ecosystems*. *Annual Review of Microbiology*, 56: 211-236 p.
- **KLOEPPER. J. W., LEONG. J., TEINTZE. M. AND M. N. SCHROTH. 1980.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting Rhizobacteria *Nature* (London).pp. 286; 885-886.
- **KOBAYASHI. Y., TANAKA. H. AND O. GASAWARA. 1974.** Purification and properties of Fla, a p-glucanase which is highly lytic toward cell walls of *Piriculonaoryzae* E. *Agric.Biol. Chem.*pp. 3 8; 973-978.
- **KUCUK, C., KIVANC, M AND KINAC,I E. 2006.** Characterization of *Rhizobium* Sp. Isolated from Bean. *Turk. J. Biol.* 30: 127-132.
- **LABASSI M, 1991** : L'effet de la fertilisation phosphate sur la capacité de fixation de l'azote et sur le rendement d'une variété de pois chiche, Mémoire d'Ingénieur INA Alger, p 59.
- **LABORATOIRE DE BIOMERIEUX S.A. RCS LYON, MARCY-L'ETOILE / FRANCE. 2011** www.biomerieux.com

- **LANKFORD. C.E. 1973.** Bacterial assimilation of iron. C. d. Rev. Microbiol. pp. 2: 273-331.
- **LE REDULIER, D. 1993.** L'osmorégulation chez les bactéries : Aspects physiologiques et génétiques. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.* vol 8. 167- 169.
- **LEHR, N-A. SCHREY, S-D. HAMPP, R. TARKKA M-T. 2008.** *Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce.* New Phytol. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x.
- **LEMANCEAU, P. OFFRE, P., MOUGEL, C. GAMALERO, E. DESSAUX, Y. MOENNE-LOCCOZ, Y. ET BERTA, G. 2006.** *Microbial ecology of the rhizosphere. Dans "Microbiological methods for assessing soil quality".* Ed : Bloem, J. Hopkins, D.W. et Benedetti, A. CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis. p. 228-230 p.
- **MARSHALL. K. C. AND M. ALEXANDER. 1960.** Competition between soil bacteria and *Fusarium*, Plant et Soil. pp. 12; 143-153.
- **MERCADO-BLANCO J. AND BAKKER P.A.H.M. 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp.* exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 367-389.
- **MIRZA, B.S., MIRZA, M.S., BANO, A. AND MALIK, K.A. 2007.** Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and Phytohormone producing *Enterobacter* strains. *Aus. J. Exp. Agric.* 47(8):1008-1015.
- **MOHAMED S., SMOUNI H. A., NEYRA M., KHARCHAF D., AND FILALIMATOUF A.2000.** Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia spp.* grown in Libya. *Plant & Soil.* 224, 171-183.
- **MONTESANO M., BRADER G. AND PALVA E.T. 2003.** Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* pp.4: 73-79.
- **MOORE.L.W. 1988.** Use of a *grobaflerizun radiobaccter* in agriculture ecosystems. *Microbiol. Sci.* PP. 5: 92-95.
- **MOREL, 1989.** Les sols cultivés. Tech et Doc .Lavoisier, paris, 272p.
- **NELSON, E. B. AND C. M. CRAFT. 1991.** Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot. *Plant Dis.* 75:510–514.

- **NOUR S. M, FENANDEZ M. P. NORMAND P. ET CLEYET-MAREL J . C . ,** 1994. *Rizobium ciceri* sp. Nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. Nov. *Int. J. Syst Bacteriol* 45 : 640-648.
- **O' HARA, G., YATES, R. AND HOWIESEN, J. 2002.** Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. In: D. Herridge (Ed.), *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*.
- **ONGENA M. 2007.** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ.Microbiol.* pp.9:1084-1090.
- **PERSELLO-CARTIEAUX F., NUSSAUME L. AND ROBAGLIA C. 2003.** Tales from the nderground: molecular plant rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* pp. 26: 189-199.
- **PREVOST. K., COUTURE, G., SHIPLEY, B., BRZEZINSKI, R., BEAULIEU, C. 2006.** *Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities.* *Biocontrol.* 51 : 533-546.
- **RAHMAN, M-S., ANO, T. ET SHODA, M. 2007.** *Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of Bacillus subtilis 168.* *J. Biotechnol.* 127(3), p. 503-507.
- **REES D.S., KIM J., GEORGIADIS M., CHAN M.K., KIMO H., KOMIYA H., WOO D., CHIRINO A.J., SCHLESSMAN J. HSU B.T. 1993.** Structure and fonctions of the nitrogenase proteins P.83-89 in R. Palacios et al (Ed), *new horizons in nitrogen fixations.* Kluver Academic Publishers . The Netherlands.
- **RICHTER GERHARD. 1993.** *Métabolisme des végétaux , physiologie et biochimie* .Ed .press polytechniques et universitaires Romandes.526p.
- **RIGAUD JEAN ET GADAL PIERRE, 1985 :** *Nutrition azotée des légumineuses,* Ed, INRA Paris, P 556. <http://www.cetiom.fr>
- **RIOUX. C. R., JORDAN. D. C. AND RAITRAY J. B. M. 1986.** Iron requirement of *Rhizobium leguminosarum* and secretion of anthracitic acid during growth on an iondeficient medium. *Arch. Biochem. Biophys.*pp. 248; 175- 182.
- **ROBERT F.M., 1976.** Characterization of rhizobia associated with horsbean (*Vicia faba* L. Var. Major) in Morocco. These. Master of science. University of Minnesota. USA. 151p.

- **ROCHER, F. 2004.** *Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phléomienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réaction de défense.* Thèse de doctorat : université de poitiers (France).163p.
- **SADOWSKY, M.J., KEYSER, H.H. AND BOHLOOL, B.B. 1983.** Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia that nodulate soyabean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:716-722.
- **SANCHEZ F., PADILLA J.E., HECTOR P. AND LARA M. 1991.** Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 507-528.
- **SCHWERTMANN. U. AND LINDSAY W. L. 1983.** Iron oxides. *Dm Minerals in soi1 environnements.* J. B Dixon and S. B. Weed, eds. Soil Science society of Amena, Madison, WI. Pp.379-438.
- **SIMMS E.L., TAYLOR D.L., 2002.** Partener choice in nitrogen-fixation mutualisms of legume and Rhizobia . *Integ.And Comp.Biol.*, 42:369-380.
- **SKOT L., TIMMS, E. AND. MYTTON R. 1994.** The effect of toxin-producing *Rhizobium* Strains, on larvae of *Sitoniaflavescens* on legume mots and nodules. *P h t & Soil I 6 3*, 141-150.
- **SOLTNER D, 2003 :** Les bases de la production végétale, le sol et son amélioration, TOME I, 23ème Ed, p 464.
- **SOLTNER D, 2005 :** Les bases de la production végétale, Tome 1, le sol et son amélioration 24 Ed, P 472.
- **SOLTNER D, 2007 :** Les base de la production végétale, biologie végétale et amélioration des plantes, TOME III, 5ème Ed, p 373.
- **SOLTNER, D. 1978.** *Phytotechnie Générale. Les bases de la production vegetale.* Tome 1, Le Sol. 7ème édition. Collection sciences et techniques agricoles. Angers.
- **SOLTNER. D, 2005.** Les bases de la production végétale. Le sol et son amélioration. Tome I, 24emè édition; collection Sciences et techniques agricoles.
- **SOMASEGARAN P., HOBEN H.J. 1994.** Handbook for Rhizobia :Methods in legume- Rhizobia technology .P.450.Springer-Verlag.new York.
- **SOMASEGARAN P., HOBEN H.J., 1985:** Methods in legumes-rhizobium technology. pp1-331.Niftal. University of Hawaii.

- **SOUSLOV, T.F. 1981.** Rapid method for Gram differentiation of bacteria from plant material without staining. *Phytopathology*. 8. 907.
- **SPAINK H.P., 2000.** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54 : 257-88.
- **SPRENT J.I., 1984.** Nitrogen fixation in: *Advanced plant physiology*. Ed Malcolm B Wilkins.
- **STOWERS, M.D. 1985.** Carbon Metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:89-108.
- **TREVASKIS B., COLEBATCH G., DESBROSSES G., WANDREY M., WIENKOOP S., SAALBACH G., UDVARDI M., 2002.** Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. *Comp Funct Genom* : 3: 151-157.
- **VINCENT JM 1970** A manual for the practical study of root-nodule bacteria, IBP handbook, N° 75, Blackwells, Oxford.
- **YANCEY P.H., 1994.** Compatible and contracting solutes. In: Strange. K (Ed): *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Press. Boca Raton. USA. pp 81-109.
- **YOUNG J.P.W. 1996** .Phylogeny and taxonomy of Rhizobia .*Plant and soil*, 186:45-52.
- **ZAHARAN, H.H. 1999.** *Rhizobium* - legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an acid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-9.
- **ZHANG K.O., HARPO R., KARISTO M., LINDSTROM K. 1991.** diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminosarum trees. *Int.J.Syst.Bacteriol*, 41:104-113.

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisés :

1. YMA

Mannitol	10.0g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Agar	15g

2. PDA

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1L

3. GPA

Glucose	5 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distiller	1litre

4. BTB

Blue de Bromthymol	0.5 g
Ethanol	100 ml

5 ml de solution/ 1liter YMA

5. CR

Rouge de Congo	0.25g
Ethanol	100 ml
10 ml de solution/ 1litre YMA	

6. BCP

Pourpre de Bromocresol	1g
Ethanol	100 ml
10 ml de solution / 1 litre GPA	