



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



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par HACHEMI FRAIHA.

DOMAINE : Sciences De La Nature et de la Vie (SNV)

FILIERE : Sciences Agronomiques

OPTION : Améliorations des Plantes et Biotechnologie.

Thème

**Isolement et Caractérisation Taxonomique des
Rhizobiums à Partir de la Fève (*VISIA FABA*) et le mise
en évidence de leur pouvoir antagoniste.**

Jury de soutenance :

MARFOUAA Mériem
ZAZA Mesouda
AMEUR Djamila
RANNANE Zohra

M AA
M AA
M AA

Président
Examineur
Rapporteuse
Co- Rapporteuse

Promotion : Juin – 2016



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة عمار ثليجي - الأغواط

كلية/معهد: العلوم
قسم: علوم الزراعة

مذكرة ماستر

تقديم الطالب : هاشمي فريحة

ميدان: العلوم و علوم الحياة
شعبة: علوم الزراعة
تخصص: تحسين النباتات والبيوتكنولوجيا

موضوع البحث

عزل وتخصيص الريزوبيوم عن عقيدات الفول ودراسة قدرتها ضد النمو الفطري

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية	الصفة
مرفوعة مريم	أستاذ مساعد	رئيسا
زازة مسعودة	أستاذ مساعد	ممتحن
عامر جميلة	أستاذ مساعد	مؤطر
رنان زهرة		مساعد مؤطر

الدفعة: جوان - 2016

Hachemi Fraiha

Titre : Isolement et caractérisation taxonomique des rhizobiums à partir de la fève (*Vicia faba*) et le mise en évidence de leur pouvoir antagoniste

Résumé :

Douze souches de *Rhizobium sp.*, -isolées des nodules de *Vicia faba*, dans la région de Laghouat , sont caractérisées phénotypiquement. Elles acidifient le milieu de manière identique, ce qui laisse a pensé qu'elles sont de même espèce. Le métabolisme des glucides indique la variabilité dans la source du carbone, La majorité pouvaient se développer à pH 6 et 8, mais ne peuvent pas le faire sur YEM à pH 12, La majorité des souches pouvaient se développer à 45 et à 50° C. De même elles peuvent se développer sur le milieu à(0.5,1 ,1.5 ,2) M de (NaCl,k₂PO₄,Cacl₂,n₂so₄,et Kcl), leur résistance aux antibiotiques, a indiqué la diversité de multiresistance, Tous les champignons pathogènes examinés ont été inhibés par la majorité des *rhizobiums testés* ,L'activité antifongique de ces douze isolats était étudiée vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes (FOA ,FG) sur le milieu PDA et le milieu YMA .L'essai à révélé que tous les isolats ont des activités antifongiques intéressantes sur l'inhibition de croissance mycélienne des champignons .

Ces résultats montrent que les douze 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 précis.

Mots-clé :

Rhizobium, *Vicia faba*, CARACTERISATION, Antibiotiques, Antagonisme.

عزل وتخصيص الريزوبيوم عن عقيدات الفول ودراسة قدرتها ضد النمو الفطري

ملخص

تم اختيار 12 عزلة من بكتيريا الريزوبيوم القادرة على تكوين عقد جذرية في نبات "*vicia faba*" العينة من منطقة الأغواط، وتم تعريفها على المستوى المورفولوجي والفيزيولوجي وكذا قدرتها على التعامل الأيضي لبعض السكريات والتي أظهرت تنوعا في استعمال مصدر الكربون من طرف هذه البكتيريا، تم دراسة قابليتها للنمو على أوساط ذات حموضة عالية وأوساط قاعدية (4-12)، كما تم اختيار نموها تحت تأثير تواجد تراكيز الملح (0 إلى 2) وكيفية استجابتها لدرجات حرارة بلغت اقصاها 50 درجة مئوية كما أظهرت بعض قدراتها على مقاومة بعض المضادات الحيوية وكذا نشاطها الفعال ضد النمو الفطري. تشير هذه النتائج أن للإثني عشر عزلة صفات مورفولوجية وفيزيولوجية وبيولوجية تجمع في خصائص بيكتيريا الريزوبيوم، ولكن هذا التحديد الأول غير كافي، لإثبات ذلك نقترح تأكيد هذه النتائج من خلال تقنيات أكثر تحديدا.

الكلمات الدالة:

"*vicia faba*" الريزوبيوم، مضادات حيوية، الخصائص المورفولوجية، نشاط ضد الفطريات، مضادات حيوية.

HACHEMI Fraiha

Title

isolation and caractérisation taxonomique of rhizobium from the fève(*Vicia faba*) and their antagoniste power

Abstract

Twenty strains of *Rhizobium sp.*, -isolated from the nodules of *Vicia faba* roots , have been characterized in terms phenotypic. These strains have an acidification manner so identical that we think they are from the same species. The metabolism of carbohydrates reveals variability in the source of carbon and were able to grow at pH 8,6, but can not on YEM pH 12. Similarly they can grow on the medium containing 0 to 2 M salts, their resistance to antibiotics. The antifungal activity of the twelve isolats was examined against tow phytopathogenic fungi on PDA and YEM substrat (FAO.FG). This test have proven that twelve isolat have interesting antifungal activities on the inhibition of mycelial growth of fungi.

Theses results show that the twelve isolats of morfological, phisiological and biochemical characters are similar in the caractéristique of Rhizobium .But this is a preliminary identification and insufficente to conclude ,therefore we suggest to confirmed these results by more specific techniques.

Key-word : *Rhizobium*, *Vicia faba*, Characterisation, Antibiotics, Antagonism.

Dédicace

Je dédie mon travail à ma mère et mon père.

Mes frères et mes sœurs.

A toute ma famille, mes profs.

A toute ma promotion surtout Nassima .

Remerciements

Avant toute chose, je remercie mon Dieu de me donner la force et le courage d'aboutir à ce travail.

Je remercie mon encadreur ((Melle :Ameur-djamila)).

Non seulement pour avoir accepté de diriger ce travail, mais aussi pour son enthousiasme commutatif, sa compétence, sa patience et surtout sa disponibilité.

Je remercie tous les membres de jury d'avoir accepté de présider et d'examiner notre travail.

Je remercie toutes les enseignants du département d'agronomie.

Je remercie Zohra et Hachemi Siham.

Merci pour tous

Sommaire

Résumé	
Dédicace	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste de figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01
Chapitre I :Revue bibliographiques	
I-La fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	03
I-1 Place de la fixation biologique dans le cycle de l'azote	03
I-2- Les organismes et les systèmes fixateurs de l'azote	04
Les systèmes libres.....	05
Les systèmes associatifs.....	05
Les systèmes symbiotiques.....	05
II- La fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses	05
II-1 Le Marosymbionte: les légumineuses	06
II-1-1 La fève (<i>Vicia faba</i> L.)	06
II-1-1-1 Origines et caractéristiques de la plante.....	06
II-1-1-2 Intérêt de la fève.....	06
II-2- Le micro- symbionte: les rhizobia.....	07
II-2-1- Rhizobium.....	07
II-2-2- Taxonomie des rhizobiums.....	07
III- La nodulation.....	08
III-1- Ontogenèse d'un nodule.....	08
III-1-1- Préinfection.....	08
III-1-2- Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces.....	09
III-1-3- Attachement.....	09

SOMMAIRE

III-1-4- Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection	09
III-1-5- Développement du nodule et libération des bactéries.....	10
III-2- Différentiation des zones d'un nodule.....	11
III-3- Formes des nodules.....	12
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I- Isolement des bactéries nodulante de La fève.....	13
I-1- Collecte des nodules.....	13
II-- Purification des isolats.....	13
III. Les tests physiologiques et biochimiques.....	14
III -1 Test Gram.....	14
a)Teste KOH.....	14
b) Coloration de Gram.....	14
III .2 Galerie API 20 NE.....	15
III.3 Sensibilité des au stress salin.....	18
III.4 Sensibilité des souches isolées au pH	18
III.5 Sensibilité des souches isolées à la température.....	18
III .6 Croissance sur YMA + rouge Congo (0,0025%).....	18
III .7 Vitesse de croissance.....	18
IV. Test fixation d'azote	19
V. production de l'acide cyanhydrique	19
VI. Résistance des Rhizobium aux antibiotiques.....	19
VII. Test de l'activité d'antagonisme	20
Chapitre III :Résultats et discussion	
I- RESULTATS.....	22
I-1isolement et purification des bactéries à partir des nodules.....	22
I .2Les testes phisiologiques et biochimiques.....	23
I.2.1Test Gram.....	23
I-2-2Galerie API 20 NE.....	25
I-2-3Effet du stress salin sur la croissance des souches isolées.....	28
I-2-4Sensibilité des souches isolées au pH	31

SOMMAIRE

I-2-5 Sensibilité des souches isolées à la température.....	33
I-2-6 Croissance sur YMA + rouge Congo (0,0025%).....	34
I-2-7 La vitesse de croissance.....	34
I-3 Test fixation d'azote.....	35
I-4 Production de l'acide cyanhydrique(HCN).....	36
I-5 Résistance des Rhizobium aux antibiotiques.....	36
I-6 Teste d'antagoniste.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexs.....	

LISTE DE TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau	page
Tableau1.tableau de lecture de galerie API20 NE	17
Tableau 2. Liste des antibiotiques utilisés	20
Tableau3 . Résultat du test Gram et KOH et caractéristique morphologique des isolats	24
Tableau 4. Résultat de la galerie API 20NE	27
Tableau5 .Résultats de tolérance des isolats aux cinq sels et leur concentration.	29
Tableau6. Résultats de test de tolérance des isolats à la variation du PH	32
Tableau 7.Température de croissance testée	33
Tableau8. Résultats de caractéristique physiologique des isolats	35
Tableau9. Résultats de test de fixation d'azote	36
Tableau10 .Résultats de test d'antibiotique	37

LISTE DES FIGURES

Liste des Figures

Figure	page
Figure 1. Cycle de l'azote	04
Figure 2. Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes.	12
Figure 3. Processus de la nodulation	12
Figure 4. Test d'antagonisme	21
Figure 5. Colonies isolée à partir de la nodule	22
Figure 6. Résultat de coloration Gram	23
Figure 7. Résultat de galerie API 20 NE de la souche II	25
Figure 8. Résultat de test de stress salin	28
Figure 9. Résultat de test de PH	31
Figure 10. Résultat de test fixation d'azote	35
Figure 11. Résultat de test d'antibiotique	37
Figure 12. Le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> f sp.	39
Figure 13. Le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis <i>Fusarium graminearum</i> (FG)	39

LISTE DES ABREVIATION

Liste des abréviations

YMA :yeast Extract Manitol Agar	pH : potentiel g'hydrogène
TRP :L-tryptophane	g/l :gram par litre
PNPG : 4-nitrophényl-BD-galactopyranoside	NO3 : nitrate de potassium
GLU :D-glucose	I :taux d'ihibition
ADH : L-arginine	% :pourcentage
URE :urée	GEL :Gelatine
ESC :esculine	GLU :Glucose
PDA : potatodextrose agar	ARA :Arabinose
FOA Fusarium oxysporium f .sp.albedinis	GLU :D-glucose
RC :Rouge Congo	ARA :L-arabinose
BTB : bleu de bromothymol	MNE :D-mannose
GPA :glucose-Peptone-Agar	MAN :D-mannitol
KOH : Hydroxyde de potassium	NAG :N-acetyl-glucosamine
mm : millimeter	MAL :D-maltose
G- : Gram négative	GNT :potassium gluconate
Ul :micro mètre	CAP :acide caprique
G+ :Gram positive	ADI :acide adipique
Nacl :chlorure de sodium	MLT :acide malique
CaCl ₂ :chlorure de calcium	CIT :trisodium citrate
K ₂ SO ₄ :sulfate de potassium	PAC :acide phénylacétique
N ₂ SO ₄ :sulfate d'ammonium	API :Analytical Profil Index
KCL :chlorure de potassium	cm :Centimetre

Introduction

Introduction

L'azote bien qu'abondant dans l'atmosphère, est le facteur limitant le plus fréquent après l'eau, de la production agricole. Un problème crucial auquel doit faire face l'agriculteur en fournissant à la plante l'azote assimilable lorsqu'elle en a besoin, tout en maintenant le stock du sol (Raven et al., 2003).

Certaines plantes, comme les légumineuses, peuvent cependant puiser et fixer l'azote gazeux présent dans l'atmosphère grâce à une association symbiotique avec des bactéries appelées rhizobia. Cette symbiose se traduit par la formation au niveau des racines des légumineuses de protubérances appelées nodules ou nodosité dans lesquels ces plantes hébergent les rhizobia dans un environnement propice à l'activité fixatrice d'azote.

Au sein de ces nodules, la plante fournit les substrats énergétiques/carbonés nécessaires au rhizobia qui en retour fournissent de l'azote sous forme d'ammoniac directement utilisable dans le flux métabolique de la plante (Sadowsky et Graham, 2006).

Cette symbiose permet aux légumineuses d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol, ce qui permet d'assurer leurs besoins.

En outre, avec l'ascension des prix des engrais azotés et au vu des problèmes de pollution par les nitrates, l'importance des légumineuses à forte capacité fixatrice de l'azote devient évidente. Pour les régions où les sols sont généralement pauvres en azote, la fève et la luzerne constituent des cultures stratégiques sur le plan économique et alimentaire.

La fixation symbiotique de l'azote est devenue un élément incontournable des politiques de limitation des apports d'engrais azotés que ce soit pour des raisons économiques, écologiques ou de durabilité de l'activité agricole (Alkama et al., 2002; Jeder et al., 2003).

Il est donc avantageux de cultiver les légumineuses car d'une part, elles fournissent des aliments riches en protéines et d'autre part, ce sont des cultures à faible niveau d'intrants qui ne modifient que très peu les équilibres biologiques naturels (Sprent, 2001).

Cependant ces avantages sont subordonnés à leur capacité de contacter des symbioses fixatrices de l'azote avec des rhizobia des sols destinés à leur culture. Cette capacité ne peut s'exprimer avantagement que si la légumineuse rencontre dans le sol la souche de rhizobia qui est compatible avec elle et qui en même temps présente un pouvoir d'infectivité des racines (une

bonne compétitivité vis-à-vis des autres bactéries et une grande efficacité au plan de réduction symbiotique de l'azote atmosphérique) (Graham, 2008)

Dans ce travail, l'objectif est l'isolement, l'identification et la caractérisation des isolats obtenus à partir des nodules de *Vicia faba* en utilisant des tests morphologique, biochimique et physiologique, ainsi que la mise en évidence de leur activités antifongiques.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-La fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains micro-organismes transforment l'azote de l'air (N_2 ou diazote) en ammoniac (Huhevet et al., 1996; Chambenoit, 2002; Hopkins, 2003; Wekeford, 2004, Ricklefs et Miller, 2005; Rose et Mueller, 2006). Elle résulte de l'activité d'une enzyme qui s'appelle **la nitrégénase**(Davet, 1996; Lengenter et al., 1999; Prescott et al., 2003; Maier et al.; 2009).

I-1 Place de la fixation biologique dans le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est l'un des cycles biogéochimiques les plus complexes (Bockman et al., 1990; Ramade, 2003). Une représentation simplifiée d'après Tortora et al.(2003) est présentée sur la figure1.

Le principal réservoir d'azote est l'atmosphère; l'azote gazeux (N_2) constitue en fait quelque 78% de l'atmosphère (Robert, 1996; Morot- Gaudry, 1998; Hopkins, 2003; Raven et al., 2003; Pelmont, 2005; Richlefs et Miller, 2005). La plupart des organismes vivants (animaux, végétaux, majorité des micro-organismes) ne peuvent cependant utiliser l'azote atmosphérique pour la synthèse de leurs acides amines et des autres composés azotés; ils dépendent donc des molécules azotés plus réactives présentes dans le sol; comme l'ammonium et les nitrates. Ces molécules ne sont malheureusement pas aussi abondantes que l'azote gazeux. Il en résulte que l'azote est souvent un facteur limitant dans les écosystèmes naturels ou cultivés (Léveque, 2001; Hopkins, 2003; Raven et al., 2003; Perry et al., 2004).

Un processus essentiel de l'entre d'azote dans le cycle est **la fixation biologique de l'azote atmosphérique** (Doré et al., 2006). C'est une étape très importante du cycle de l'azote, qui fournit de l'azote utilisable pour la nutrition des plantes (Modigan et Martinko, 2007, Pedro, 2007). La fixation biologique de l'azote capable de restituer à la biosphère l'azote combiné perdu par le phénomène de dénitrification (Berner et Berner, 1996; Doré et al., 2006; Rose et Mueller, 2006).

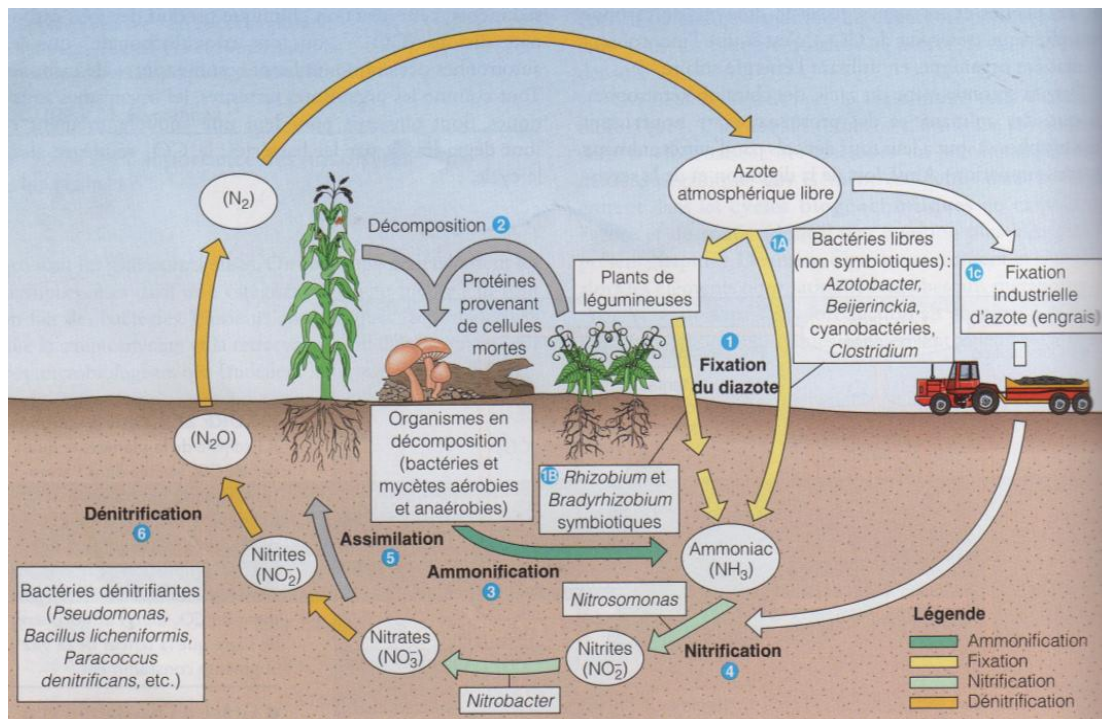


Figure 1. Cycle de l'azote (Tortora et al., 2003)

I-2- Les organismes et les systèmes fixateurs de l'azote

Les micro-organismes fixateurs d'azote ditediazotrophes remplissent une fonction écologique irremplaçable (Davet, 1996). Ce sont des procaryotes (bactéries et cyanobactéries), qui vivent soit à l'état libre dans le sol, éventuellement en association avec un végétal, soit en symbiose avec un végétal (Luttge et al., 1994, Vilain, 1997).

- **Les fixateurs libres** sont représentés essentiellement par des Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Rhodospirillum (Davet, 1996; Madigan et Martinko; 2007).
- **Les fixateurs associatifs** sont représentés essentiellement par les Azospirillum (Luttage et al., 1994, Perry et al., 2004, Pelmont, 2005).
- **Les fixateurs symbiotiques** sont représentés par :
 - Les Rhizobia, l'un des principaux groupes et le plus anciennement connu, s'associent aux légumineuses (Davet, 1996; Hopkins, 2003; Perry et al., 2004).
 - Les Frankia, bactéries filamenteuses sporulantes (actinomycètes) associées à des arbres et des arbustes comme les Casuarina, les Myrica et les Alnus (Davet, 1996; Lèveque et Mounolou, 2001; Dolery et al., 2003; Tortora et al., 2003; Perry et al., 2004).

- *Anabaena* (cyanobactérie) vit en symbiose avec *Azolla*, une fougère aquatique importante pour la culture du riz (Moret, 1996. Prescott et al., 2003; Pelmont, 2005).

La fixation de l'azote nécessite beaucoup d'énergie, pour chaque molécule de diazote, au moins 16 ATP sont nécessaires (Postgate, 1982; Streeter, 1993; Morel, 1996; Paul, 1999; Hopkins, 2003; Perry et al., 2004).

Les micro-organismes fixateurs de l'azote adoptent des systèmes fixateurs d'azote, pour assurer les besoins énergétiques de leur nitrogénase. Il existe 3 systèmes de fixation biologique de l'azote :

- **Les systèmes libres** : les micro-organismes fixateurs assurent la couverture de leurs besoins énergétiques à partir des carbohydrates du sol. En raison de la rareté de ces derniers et de la compétition des autres composantes de la microflore tellurique pour leur utilisation, le niveau de fixation de l'azote est faible (Luttge et al., 1994; Vilain, 1997; Raven et al., 2003).

- **Les systèmes associatifs** : les micro-organismes fixateurs colonisent la rhizosphère des plantes et profitent des exsudats racinaires pour assurer la couverture de leurs besoins énergétiques (Luttge et al., 1994; Vilain, 1997).

- **Les systèmes symbiotiques** : l'association entre la plante et les fixateurs est plus étroite et se traduit par la formation de dispositions anatomiques (poches, épiphylls) ou de structures plus élaborées qui sont de véritables organes (nodules, hétérocystes) dédiés à l'interaction entre les deux symbiontes. Les plus évoluées de ces interactions sont en fait des endosymbioses en ce sens que le fixateurs se retrouvent hébergé dans un organe et de surcroît à l'intérieur des cellules de l'hôte comme c'est le cas de la symbiose rhizobia- légumineuses (Luttge et al., 1994). La plante fournit les conditions et les éléments nutritifs nécessaires à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qu'intégreront les protéines végétales (Delory et al., 2003; Tortora et al., 2003).

II- La fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses

L'association symbiotique entre Rhizobia; bactérie fixatrice d'azote atmosphérique, et les légumineuses représente l'un des modèles les plus importants d'interactions entre bactéries et plantes (Madigan et Martinko, 2007). Le bon fonctionnement de la symbiose rhizobia-légumineuses nécessite une coordination entre deux partenaires : la plante hôte (légumineuse ou macro- symbionte) et la bactérie (rhizobia ou micro- symbionte).

II-1 Le Marosymbionte: les légumineuses

Les légumineuses représentent la troisième plus grande famille de plantes à fleurs (numériquement parlant) qui regroupe trois sous-familles, les Papilionacées (ou Fabacées), les Mimosacées et les Césalpiniacées (Messaili, 1995; Dommergues et al., 1999). Les deux espèces retenues pour notre étude sont : la fève et la luzerne.

II-1-1 La fève (*Vicia faba* L.)

II-1-1-1 Origines et caractéristiques de la plante

Les fèves sont des cultivars d'une même espèce, *Vicia faba* L.. D'après la grosseur de la graine, on peut distinguer les sous-espèces : *Vicia faba major* (la fève proprement dite, à gros grains), *Vicia fabaequina* (la fèverol à grains moyens) et *Vicia fabaminor* (La fèverole à petits grains) (Leguen et Duc, 1992; Le Clech, 1999).

L'homme a probablement utilisé *V. faba* dans sa nourriture dès le néolithique (Shuliz in Boussalem, 1987; Boyeldieu, 1991). Elle est essentiellement cultivée dans le bassin méditerranéen, en Amérique du sud et en Asie du sud-est, cultivée aussi en Europe occidentale et du nord (Gallais et Bannerol, 1992).

L'espèce *Vicia* appartient à la famille des légumineuses est choisie comme type de la sous-famille des papilionacées, et à la tribu des viciées (Schater et Yamanoto in Lawes et al., 1983; Boyeldieu., 1991).

La fève est une plante annuelle herbacée, à tige creuse quadrangulaire, à racines pivotantes parfois, superficielles plus généralement, portant des nodosités renfermant les bactéries spécifiques fixatrices d'azote atmosphérique : *Rhizobium léguminosarum*. Les feuilles comportent deux folioles à la base de la tige puis 3 ou 4 par la suite. Les fleurs blanches avec une tache noir sur les ailes. Elles portent aux aisselles des noeuds reproducteurs en grappes de 2 à 12 selon le type (Leguen et Duc, 1992).

Le fruit est une gousse large peut contenir un nombre assez variable de grains (4 à 9). La graine; large, aplaties, en forme de rognon, de couleur verte ou jaunâtre (Chaux et Foury, 1994).

II-1-1-2 Intérêt de la fève

L'utilité de la fève dans l'alimentation humaine et animale comme source de protéines ainsi que leur effet bénéfique sur la fertilité des sols sont largement reconnus.

L'utilisation de la fève est principalement orientée vers la consommation humaine en gousses fraîche à grande proportion et sous forme de graines secs ou au stade pâteux à faible proportion. Lors d'abondance le surplus des graines de fève incorporé dans la composition d'aliments du bétail (Maatougui, 1997). La fève peut être aussi utilisée en engrais vert dans les vergers (Maatougui, 1996). Pour sa valeur alimentaire; La fève est considérée parmi les cultures les plus riches en matières nutritives.

II-2- Le micro- symbionte: les rhizobia

II-2-1- Rhizobium

Les rhizobiums sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, Gramnégatives, aérobies et présentes soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association avec des légumineuses. Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la grande classe des eubactéries (Maidak et al., 1994).

II-2-2- Taxonomie des rhizobiums

La taxonomie a pour but de rassembler des organismes partageant des caractéristiques communes en groupes ou taxons bien délimités. Les groupes sont définis selon trois études, l'identification, la nomenclature et la classification. La première nécessite l'isolement de la bactérie, sa caractérisation par des analyses phénotypiques et moléculaires universelles et la comparaison des caractères à ceux des bactéries connues. La deuxième consiste à donner un nom spécifique à la bactérie identifiée selon le Code International de Nomenclature Bactérienne, qui comporte le nom du genre et de l'espèce. Tout genre doit être représenté par une espèce type et toute espèce doit être représentée par une souche type (Vandamme et al., 1996 ; Zakhia et al., 2006)

Les rhizobiums ont été antérieurement définis comme des micro-organismes symbiotiques capables de former des nodosités au niveau du système racinaire des légumineuses. Frank (1879) a rapporté que ces micro-organismes étaient des champignons en leur affectant le nom de *Schinzia leguminosarum*. En 1888, Hellriegel et Willfarth ont fourni une explication scientifique pour la fixation biologique de l'azote. Dans la même année, Beyjerinck (1888) a pu isoler une bactérie d'une plante légumineuse et l'a nommée *Bacillus radicola*. Par la suite, le bacille a été renommé *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Baldwin et Fred (1929) ont rapporté que la classification des différents rhizobiums devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Ainsi, Fred et al., (1932) ont pu identifier six groupes de nodulation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*.

Cette première classification a connu par la suite plusieurs critiques (Wilson, 1944).

Les observations discordantes entre la croissance de la bactérie et la gamme d'hôte ont jeté le doute sur la validité de cette classification. Toutefois, sur la base du taux de croissance, Jordan (1982) a pu classer les rhizobia en deux genres, le genre *Rhizobium* pour les souches à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente.

III- La nodulation

III-1- Ontogenèse d'un nodule

Les conditions requises avant la mise en place de la symbiose sont : une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi et Kondorosi, 2000).

Le développement du nodule est un processus complexe impliquant la différenciation de plusieurs types de cellules spécialisées comme résultat d'une série d'échanges de signaux entre la plante et les partenaires microbiens (Brewin et al., 1992). L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan et al., 2007). Les étapes sont :

III-1-1- Préinfection

L'étape préliminaire de l'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective (Savka et al., 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kapeet et al., 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado et al., 1995). Les germes sont attirés par des produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes exsudés par les racines. L'interaction est spécifique: une souche bactérienne n'attaque pas n'importe quelle plante, et inversement la plante ne se laisse pas envahir par n'importe quelle souche. L'invasion et la

formation des nodules est le résultat d'un échange de signaux chimiques selon un programme qui doit décider si la symbiose doit être menée à son terme ou non (Pelmont, 1995).

III-1-2- Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces

Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes nod chez les rhizobia. Le rhizobium, qui vit libre dans le sol, est doté sur son enveloppe externe des récepteurs spécifiques aux différents composants de l'exsudat racinaire (Waligora et al., 2008)

Le produit du gène nodD, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes Nod. La transcription des autres gènes nod a pour effet la synthèse des facteurs Nod qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevich et al., 2001).

Les types de facteurs Nod produits ainsi que leur quantité permettent une reconnaissance spécifique de chaque rhizobia par son partenaire végétal. Leur structure amphiphile permet une intégration rapide dans les membranes. Cependant, ils seraient incapables de traverser la membrane végétale, un récepteur membranaire serait donc nécessaire pour permettre leur détection par la plante (Cullimore et al., 2001).

III-1-3- Attachement

Une protéine d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, est présente à la surface des cellules des espèces de Rhizobium et Bradyrhizobium. La rhicadhésine est une protéine affine pour le calcium (Brewinet al., 1992 ; Madigan et al., 2007) et elle opère en se fixant sur des complexes calciques à la surface des poils absorbants générant ainsi une oscillation en ions Ca^{2+} . D'autres substances comme les lectines, qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Madigan et al., 2007).

D'autres facteurs physico-chimiques pourraient également jouer un rôle dans l'attachement (Hopkin, 2003).

III-1-4- Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection

Même sans attachement bactérien, la molécule de signalisation lipooligosaccharide

dérivée des rhizobiums infectants est suffisante pour causer le recourbement des poils absorbants (Brewin, 1992).

Lors de ce stade de la nodulation, la bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemme (Hopkin, 2003).

L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine. Dès la reconnaissance du Rhizobium spécifique, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologique du poil absorbant :

dépolarisations membranaires, modification de concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine (Duhouet al.,2004).

L'activation des cellules du cortex interne conduit à des divisions, anticlines puis périclines, et à l'édification progressive d'un méristème « nodulaire » qui sera à l'origine du futur nodule (Duhouet al.,2004).

Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient. C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhouet al.,2004). Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobiums dans les cellules du méristème nodulaire.

III-1-5- Développement du nodule et libération des bactéries

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkinet al.,2003). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte (Ravenet al.,2007). Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes (Hopkinet al.,2003 ; Ravenet al., 2007).

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroïdienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses.

modification métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (Hopkinet al.,2003).

L'endocytose est probablement la conséquence d'interactions physiques entre lipopolysaccharides sur la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante (Brewinet al.,1992).La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales de la racine produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité(Davet, 1996 ; Ravenet al.,2007).

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

III-2- Différentiation des zones d'un nodule

L'infection par les cordons d'infection a lieu à partir de la base du nodule, ce qui établit un gradient de différenciation et plusieurs zones ont pu être définies (Vasse et al.,1990) ;(Figure 5)

- La zone I ou zone méristématique correspond à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries.

- La zone II ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane péribactéroïdienne (MPB) et leur différenciation en bactéroïde commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.

- Dans l'interzone II-III, la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplast.

- La zone III ou zone de fixation est celle où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.

- Dans des nodules âgés, la zone IV correspond à une zone de sénescence.

Chez les espèces à nodules déterminés, le même gradient de différenciation peut être observé dans le temps, au cours du développement du nodule (Pawlowski et Bisseling, 1996).

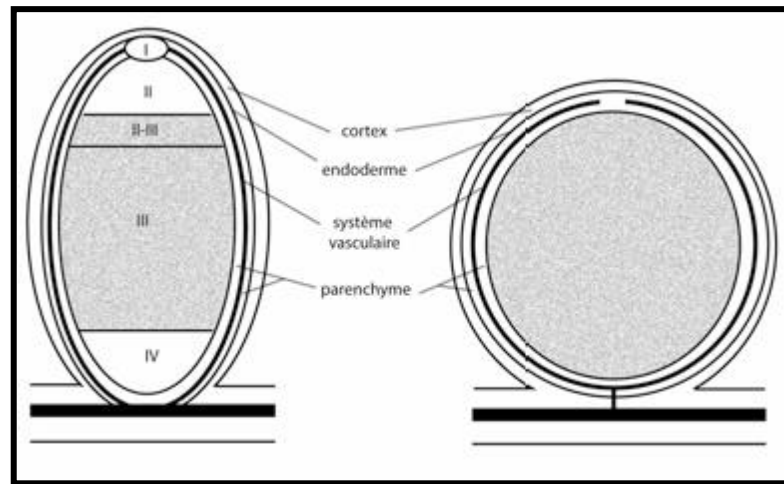


Figure 2. Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes.

A : Nodule de Légumineuse de type indéterminé.

B: Nodule de Légumineuse de type déterminé.

I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence. (Pawlowski et Bisseling, 1996).

III-3- Formes des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, avec un méristème apical, une croissance indéterminée et un système conducteur ramifié (*Vicia*, *Trifolium*), soit sphérique, avec une croissance définie et des éléments conducteurs en forme d'arc, ayant un débouché commun dans le système conducteur de la racine (*Phaseolus*, *Glycine*) (Richter, 1993).

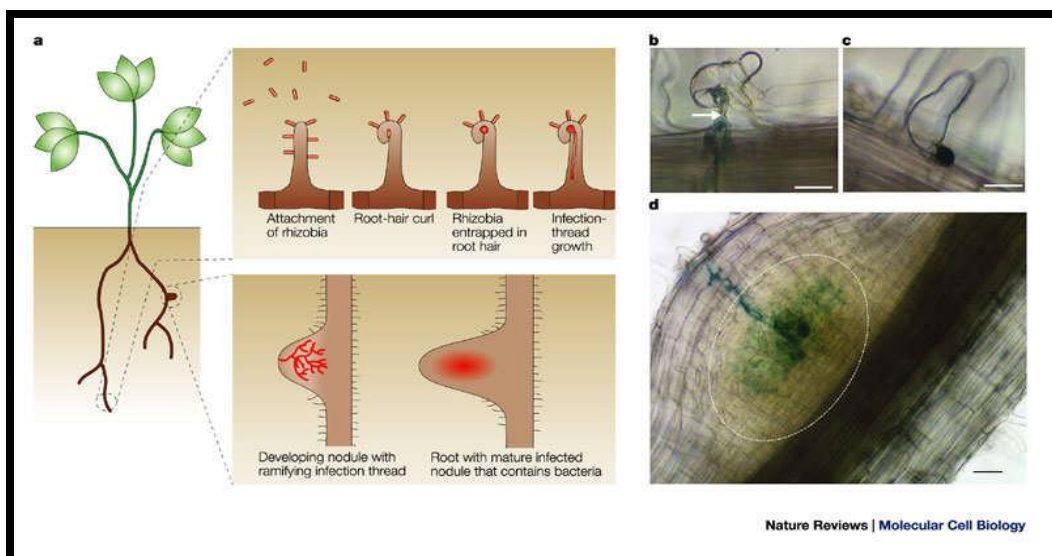


Figure 3. Processus de la nodulation (Giles et al., 2004)

CHAPITRE II

Matériel et méthode

Méthodes d'étude

I- Isolement des bacteriesnodulants La fève (*Vicia fabL.*)

Les nodules ont été obtenus à partir du genre végétal(*Vicia fabL.*) qui été cultivé dans la region de laghouat commune ouad m'si

I-1- Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réaliser durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectué au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre est sec, à cette période de l'année les nodules sont biendéveloppée et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck et al ., (1993).Une creusée d'environ 15cm au tour de la plante et 20cmde profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.

I-2- Isolement des souches à partir des nodules

La technique d'isolement des bactéries est celle décrit par Vincent(1970) et Somasegaran et Hoben (1985, 1994).

Les nodules intacts sont transféré dans une boite de pétrie et immergée dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans l'eau de javel dilué pendant 3minutes . On effectue ensuite un rinçage des nodules 3fois dans de l'eau distillée stérile et laisser secher après le 3emerinçage.

Dans une boite de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile .puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble.A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrons (Vincent, 1970). sur gélose coulé en boite (YMA), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures.

Toute cette manipulation doit être effectué sous des conditions microbiologiquement contrôlé, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen.

II-- Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur le milieu YMA des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes

III. Les tests physiologiques et biochimiques

III 1 Test Gram

a)Test KOH

En parallèle la coloration de Gram ,un test plus rapide a été effectué ,qui permet de distinguer entre Gram positif, sur une lame propre deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium(KOH 3%),sont mises en contact avec une crème bactérienne en effectuant un mouvement circulaire. La solution KOH devient visqueuse en présence de bactéries à Gram négatifs . La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s(Bourgault et Lamothe ,1988) (la formation des filés observable à l'œil nu). Pour une réaction négatif aucune viscosité n'est observée ,donc les bactéries sont des Gram positifs

b) Coloration de Gram

La coloration Gram est un critère essentiel de la classification des bactéries (Schardet al .2001).Il y a plusieurs facteurs qui vont intervenir dans cette coloration :

La différence de composition chimique de bactérie et la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool

a) Faire un frottis

Sur une lame propre ,nous avons déposé une goutte d'eau distillée stérile sur la lame, à l'aide d'une anse de platine stérile, nous avons touché une colonie bactérienne, puis nous avons frotté la pointe dans la goutte d'eau .Laisse sécher à l'air. Nous avons fait passer trois fois la lame dans la petites flamme du bec bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur

b) La coloration :

Nous avons déposé quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé et laissé agir une minute .Nous avons jeté l'excès de colorant .Puis rincé très brièvement en faisant couler d'eau distillée sur la lame au-dessus du frottis(pas directement sur le frottis)

Nous avons déposé quelques gouttes de lugol sur le frottis est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries ,et laissé agir une minute, jeté la solution de lugol, et rincé brièvement à l'eau distillée comme précédemment décrit

Nous avons décoloré en faissant couler la solution de décoloration (l'alcool) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis .Puis rincé à l'eaudistillée .

Contr-colorer en déposant la solution de fushinependant une minute ,puisrncé à l'eau distillée ,et laissé secher à l'air .L'observation a été fait sous microscop optique (G10x100x1 .25)

III .2 Galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE est un système standarisé pour l'identification des bactéries des Gram négatif non entéobactéries comme les rhisobium .Cette galerie comporte huit testes conventionnelisés à l'activité de divers enzymes (Nitrate réductase ou dénitrification ,tryptophanase ou formation de l'indole à partir du tryptophane ,fermentation du glucose,Arginine déshydrogénase ou formation de l'ammoniac à partir de l'arginine,uréase,Esculinase,gélatinase ou liquéfation de la gélatine et la B_galactosidase) et 12 tests d'assimilation de sucres (Glucose,Arabinose,Mannose,Mannitol,N-acétyl-D glucosamine, Maltose, gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Citrate et Phényl-acétate) .A ces tests 21^{ème} test s'ajote,il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase ou teste de l'oxydase . Des substrats déshydratés sont contenus dans des micro-tubes .Ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier .A la suite d'une période d'incubation de 24 et 48 heures à une température de 29C , permettant à la bactérie de réagir avec les substrars .

a) Préparation des suspentions

Ce test a été réalisé que pour 12 isolats , selon le protocole proposé par le producteur (bioMérieux), nous avons préparé la suspension bactérienne (A) a partir de culture pure âgées de 24 heures dans 5ml d'eau physiologie stérile (0,9% de NaCl) a une concentration de 10^8 bactéries /ml

Pour la préparation de la suspension (B),200ml de la suspension bactérienne (A) a été mis dans une ampoule d'AUX medium

b) Inoculation de la galerie

Ces tests doivent être incubés dans des atmosphères humides, donc nous avons versé l'eau distillée stérile dans les alvéoles. Nous avons distribué la suspension bactérienne (A), déjà préparée dans les micro-tubes, pour les huit (8) tests conventionnels (de NO_3 à PNPG), les cupules des tests GLU, ADH et URE ont été couvertes d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe et anaérobie. Les cupules et les micro-tubes des tests d'assimilation ont été remplis avec la suspension (B), en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe mais jamais concave.

Après l'incubation et l'addition des réactifs ($\text{VIT}_1 + \text{VIT}_2$). La lecture des résultats a été faite à l'aide du tableau de lecture (tableau).

TESTS	COMPOSANTE SACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTIONS /ENZYMES	RESULTAT	
				negatif	positif
NO3	Nitrate de potassium	0.136	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2/5min	
				Incolor	Rose rouge
			Réduction des nitrates en azote	ZN/5min	
				Rose	incolor
TRP	L-Typtophane	0.2	Formation d'inodole 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	URAase	Jaune	Orange Rose Rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56 0.072	HydrolyseB-glucosidase(Esculine)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	Gélatine	0.6	Hydrolyse(protéase)(gelatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-BD-galactopyranoside	0.22	B-galactosidase(para-Nitophényl-BD-galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1.56	Assimilation D-glucose	Transparance	trouble
ARA	L-arabinose	1.4	Assimilation L Arabinose	Transparance	Trouble
MNE	D-mannose	1.4	Assimilation D-mannose	Transparance	Trouble
MAN	D-mannitol	136	Assimilation D-mannitol	Transparance	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	Assimilation N-acetyl-glucosamine	Transparance	Trouble
Mal	D-maltose	1.4	Assimilation D-maltose	Transparance	Trouble
GNT	potassium	1.84	Assimilation potassium	Transparance	Trouble
CAP	Acide caprique	0.78	Assimilation Acide caprique	Transparance	Trouble
ADI	Acide adiptique	1.12	Assimilation Acide adiptique	Transparance	Trouble
MLT	Acide malique	1.56	Assimilation Acide malique	Transparance	Trouble
CIT	Trisodium citrate	2.28	Assimilation Trisodium citrate	Transparance	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	0.8	Assimilation Acide phénylacétique	Transparance	Trouble

(original 2016)

III.3 Sensibilité des souches isolées au stress salin

Cinq sels, NaCl, KCl, CaCl₂, N₂SO₄ et K₂SO₄ ont été testés pour déterminer leur effet sur la croissance des souches des rhizobia isolées sur milieu gélosé YEM. Des concentrations allant de 0 à 2% ont été testées. La méthode utilisant le milieu solide en boîtes de Pétri est adoptée dans cette étude les souches des rhizobia sont cultivées sur le milieu YEM sans sel. Ces précultures sont utilisées pour inoculer des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé YEM additionné de sel à des concentrations allant de 0 à 2% les boîtes sont retournées et subdivisées en 4 carrés et au moment de l'inoculation, chaque souche est déposée au centre du carré qui lui est réservé. Les boîtes inoculées en deux répétitions pour chaque concentration de sel, sont incubées à 30°C. Pendant 7 jours.

III.4 Sensibilité des souches isolées au pH

Les souches isolées ont été cultivées sur milieu YMA ajusté à 6 valeurs de pH (4,5; 6; 8, 9 et 12) en boîtes de Pétri incubées à 30°C selon l'étude faite par (Garham et Vance, 2003).

III.5 Sensibilité des souches isolées à la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C.

III.6 Croissance sur YMA + rouge Congo (0,0025%)

Les colonies typiques aux rhizobia absorbent faiblement le rouge Congo (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) par rapport aux contaminants ou les souches occupant le nodule sans fixation de l'azote. Le test consiste à cultiver les isolats dans le milieu YMA contenant 0,0025% de rouge Congo et à incuber dans l'obscurité à 28°C.

La majorité des souches de *Rhizobium* produisent des polysaccharides exo-cellulaires solubles dans l'eau.

III.7 Vitesse de croissance

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...). Pour cela on cultive nos isolats sur milieu YMA + bleu de bromothymol. L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les

bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

IV . Test fixation d'azote

La methode utilisant le milieu de wingoradsky sans azote solide en boite de pétrie ,les boites sont routourné et subdivisées en 4 carrés et au moment de l'inculation ,chaque souche est desposé au centre du carré qui lui est réservé .Les boite inoculées en deux répitition , sont incubées à 30°C .Après sept jours d'incubation ,la croissance des colonies est observée .

V.Production de l'acide cyanhydrique(HCN)

Nous avons ensemencés les 12 souches bactérienes testés sur le milieu de culture YMA ,un disque de papier Whatman saturé en picrate alcalin (0 ,5%acide picrique et 2%de carbonate de sodium),sont déposés dans les couvercles des boites ,ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 30 C pandan 5 jours.Le virage de la couleur du jaune vers le brun clair ou rouge brun indique respectivement une production modérée et élevée d'HCN par la bactérie productrice (Trivedi et al.,2008).Ce test est réalisé en deux répétition

VI. Résistance des isolats aux antibiotiques

Le principe est base sur l'observation de la croissance bactérienne en présence des antibiotiques par diffusion a partir des disques dans un milieu MH gélose. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice. Le diametre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité des souches.

La résistance aux antibiotique permet de caractériser et de comparer les souches entre elle .

Pour déterminer la résistance aux antibiotique, on a utilisé la technique de diffusion dans laquelle le gradient de concentration de l'antibiotique est réalisé par diffusion dans gélose à partir d'un centre .

La boite gélosée est inondé avec 3à5 ml de culture bactérienne .nous avons étalé la suspension, puis nous avons appliqué les disques à 15 mm de la périphérique de la boite en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu.

Les antibiotiques utilisés sont représentés au tableau suivant :

Tableau2. Liste des antibiotiques utilisés

Le code d'antibiotique	Le nom d'antibiotique	La dose
C	Chlormphenicol	30Mg
FI	Nitrofurention	300Mg
NA	Nalidixicacid	30Mg
E	Erythromycin	15Mg
AHC	Amoxycillin+clavalamicacid	20/10Mg
CAZ	Ceftazidim	30Mg

(Original2016)

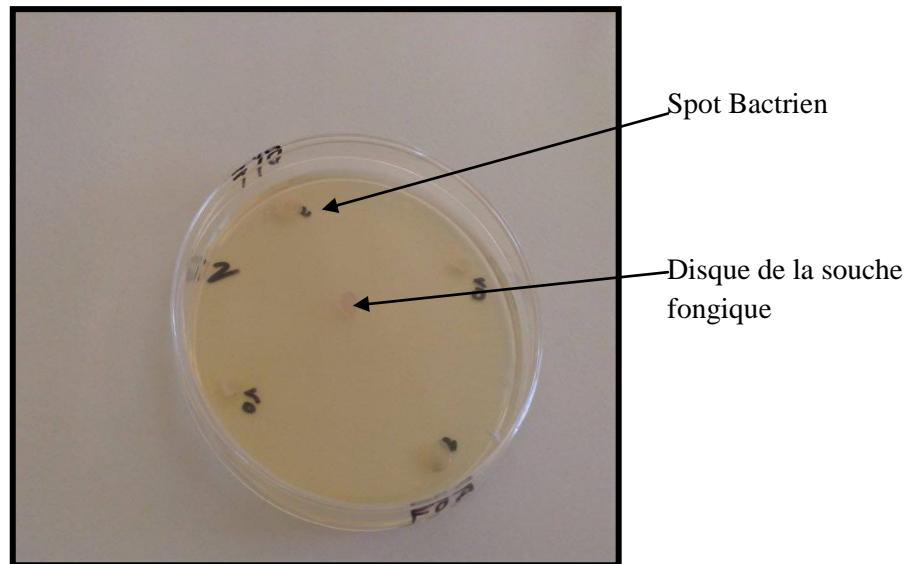
VII. Test de l'activité d'antagoniste

a) Recherche des antagonistes

Les rhizobium produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les parois cellulaires. Ces métabolites secondaires sont actifs vis-à-vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Iavicoli et al., 2003 ; Kim et al. ; 2004). Dans ce contexte nous avons testé l'activité antagoniste de 8 de nos isolats

c) Sélection des souches antagonistes

La sélection des souches bactérienne antagonistes a été réalisée selon la méthode des spots décrite par Becker et Cook (1988) , cette méthode consiste à déposer quatre spots bactérien à la périphérie de la boîte de Pétrie et les laisser en incubation à la température de 29c, après 24h, nous avons déposé un disque mycélien de 5 mm de diamètre du champignon étudié, dans le centre de la boîte Pétrie. Nous avons testé les 5 souches sur deux milieux de culture YMA et PDA avec deux répétitions pour chaque souche contre deux champignons (FOA) et (FG) (Les deux espèces de champignons ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire phytopathologie de Laghouat) pour estimer l'activité antifongique de nos isolats (figure4) , nous avons déposé un disque de chaque champignon comme des témoins sur d'autre boîte dans les mêmes condition d'incubation



Original 2016

Figure 4. Test d'antagonisme

La lecture des résultats se fait en comparaison avec la croissance mycélienne de témoin, après cinq(5) jours. Le taux d'inhibition a été calculé selon la formule de (Hmouni et al, 1996).L'activité d'antagoniste est révélée par la présence de zone d'inhibition

$$(I\% = (1 - C_n / C_0) \times 100)$$

I : taux d'inhibition

C_n : diamètre moyenne de la croissance du pathogène en présence de l'antagoniste

C₀ : diamètre moyenne de la croissance du pathogène en absence de l'antagoniste

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I- RESULTATS

Au cours de cette étude douze 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. Ainsi que la mise en évidence de leurs activités antifongiques contre deux champignons (*Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* f.s.p. *albendinis*). Les résultats obtenus sont les suivants :

I-isolement et purification des bactéries à partir des nodules :

Des colonies bactériennes qui ont des caractéristiques des *Rhizobium* sont obtenues. Après ensemencement d'une à 2 gouttes (pipette Pasteur) du broyat des nodules, sur YAM, (72 heures d'incubation à 30° C)

Vu la diversité des microorganismes observés nous avons procédé à des purifications par passages successifs sur milieux solides pour enfin purifier les souches de *Rhizobium*. Nous avons choisi les isolats du genre *Rhizobium* en se basant sur :

- Le temps d'incubation (72 heures).
- forme des colonies (colonies muqueuses, bombées, circulaires et brillantes aspect mielleux)
- La température pour une croissance optimale de la croissance est de 30°C
- Le pH Pour une croissance optimale est de 7,00
- la coloration de Gram (Gram négative).



Figure 5. Colonies isolées à partir de nodule

I.2 Les tests physiologiques et biochimiques :

En plus, l'identification a été effectuée en utilisant d'autres tests:

I.2.1 Test Gram :

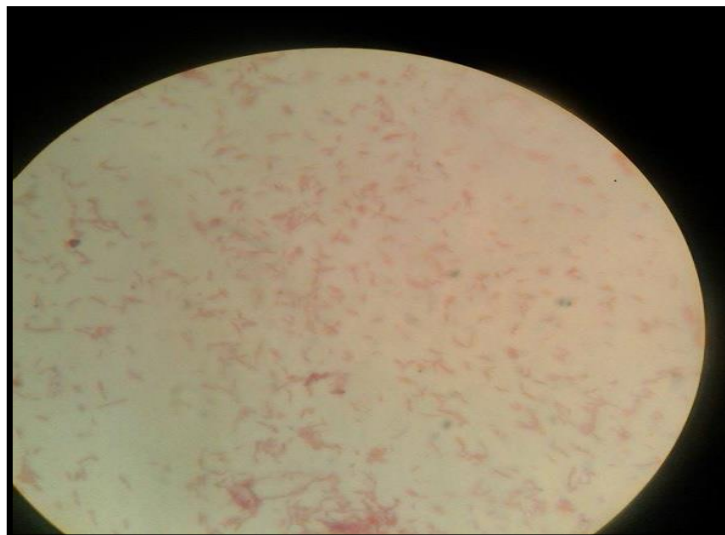
a) test KOH :

Nous avons observé une viscosité pour les (22) isolats, et nous n'avons pas observé de viscosité pour les 10 autres isolats (figure). Selon Bourgaut et Lamoth, (1988), la solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à Gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s

b) Coloration de Gram

La coloration de Gram, est une étape essentielle dans la classification des bactéries, Cette technique a été mise au point en 1888 par Hans Christian Gram. Nous avons réalisé le test de Gram pour 22 isolats.

Après la coloration de Gram, nous avons éliminé (10) isolats parce qu'ils sont des Gram positif et les autres isolats (12) sont des bacilles à Gram négatif (couleur rose) figure 6



Bactérie Gram(-) original, 2016

Figure 6. Résultat de coloration Gram

Tableau 3 . Résultat du test de Gram et KOH et caractéristique morphologique des isolats

les isolats	KOH	Coloration da Gram	Aspet et couleur des colonies
02	+	G-	Envahissante bombé de couleur jaune
T'1	+	G-	Circulaire,peuvisqueuse,de couleur jaune diametre 3mm
L12	+	G-	Cocci
L13	+	G-	Cocci
II	+	G-	Circulaire,visqueuse ,couleur jaune
T6	+	G-	E
D2	+	G-	Cocci
I	+	G-	Circulaire,visqueuse ,couleur jaune
05	+	G-	Envahissante bombé de couleur jaune
R7	+	G-	E
R8	+	G-	Circulaire,très visqueuse ,beig,diametre 4mm
06	+	G-	Envahissante bombé de couleur jaune
D	+	G-	Circulaire,très visqueuse ,beig,diametre 4mm
L14	+	G-	Cocci
C	+	G-	E
04	+	G-	Envahissante bombé de couleur jaune
B	+	G-	Circulaire,visqueuse ,couleur jaune
A	+	G-	Circulaire,très visqueuse ,beig,diametre 4mm
C1	+	G-	E
L1	+	G-	Circulaire,tr és visqueuse beigdiametre 5-6mm
K	+	G-	Cocci
H	+	G-	Cocci

Revoir l'aspect

G- :bactérie de Gram négatif .G+ :bactérie de Gram positif.- : réaction négatif,+réaction positive .

Après la coloration Gram, nous avons gardé 12 isolats qui correspondent à des bacilles à Gram négatif de , 10 isolats de couleur violet ont été éliminés ,les bactéries de Gram négatif possèdent une paroi mince qui permet la dégradation par l'alcool et recoloration par la fuschine . Ces résultats ont été confirmés par le test de KOH .

I-2-2Galerie API 20 NE

Après 24 et 48h d'incubation nous avons fait la lecture de la plaque API 20NE des 12 isolats testés (02,T'1,05,R8,06,4 ,B ,L1,A,II,I),pour une identification plus exacte et plus rapide (figure7)



Original :2016

Figure 7. Résultat de galerieAPI 20 NE de la souche II

Les résultats donnés par le tableau 4 montrent que les différents isolats ont des activités biochimique variable les une des autres. En ce qui concerne les huit tests convontionnels de TRP àGEL .

Tous les isolats sont capable de réduire le NO₃ soit en nitrite ou en azote.

Tous les isolats sont incapables 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 aérobic strict.

L'arginine qui est une source intéressante d'azote ,trois de nos isolats A ,R8 ,D déporvue d'arginine hydrolase, le reste d'isolats B,II,L1,02,05,06,T'1,sont capable d'hydrolasé cet acide aminé.

Pour le test URE ,seulement l'isolat D,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 .

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,quatre isolats(A ,T'1,R8,D) indiquant la présence de la B- galactosidase,pour les autres nous pouvons déduire l'absence de cet enzyme.

Pour les douze tests d'assimilations ,tous les isolats ont une réaction positifs d'assimilation des sucres et des acides, à l'exception de test PAC et Capl'isolat D est le seul qu'a donné une réponse positive,Pour le test cinq isolats (IL1,05,06,et 04)ont donné un résultat positif et les autres isolats ont une réponse négative.

Tableau 4. Résultat de la galerie API 20NE

Les isolats/les tests	A	B	I	L1	02	II	T'1	05	R8	06	07	D
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
ADH	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-		+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
PNG	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-		+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
CNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
CAP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
ADI	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+		-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
PAC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-

Original 2016

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 obtenus ont été capables d'utiliser le glucose, l'arabinose, le mannose, le mannitol et le maltose. Ces sources de carbone sont généralement utilisés par des bactéries du genre Rhizobium (Stowers,1985). Sadowsky et al.,(1993) 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.

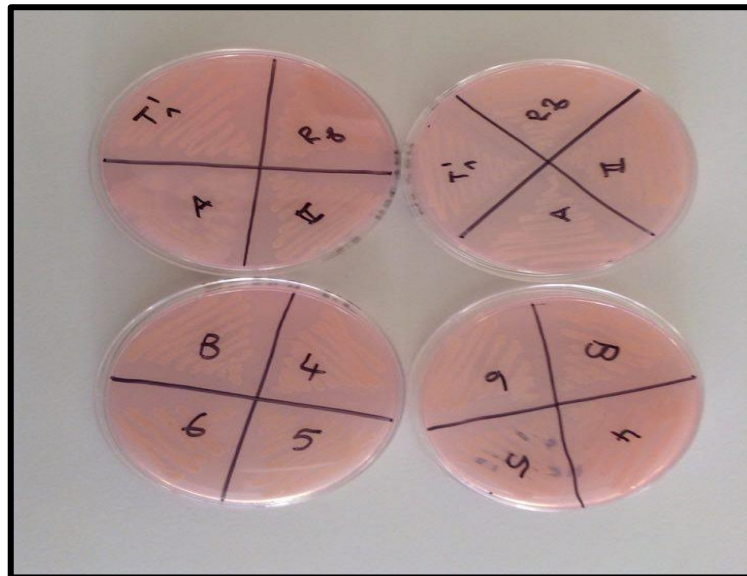
Leur capacité à métaboliser un large éventail de substrats de carbone peuvent être avantageuses pour la survie dans le sol .

I-2-3 Effet du stress salin sur la croissance des souches isolées

La croissance des rhizobiums est évalué par l'apparition de colonies dans les boîtes de Petri renfermant des concentrations croissantes de NaCl, K₂PO₄, CaCl₂, N₂SO₄, KCl à des doses de (0, 5, 1, 1,5,2) g/L.

La mise en culture des souches étudiées sur le milieu YMA gélosé enrichi en concentrations croissantes des cinq sel NaCl, K₂PO₄, CaCl₂, N₂SO₄, KCl montre que:

Toutes les souches testées peuvent croître sur le milieu contenant les différents concentrations des cinq sels .figure8



original2016

Figure8. Resultat de test de stress salin

Tableau5 .Résultats de tolérance des isolats aux cinq sels et leur concentration.

isolats	NaCl				CaCl2				K2SO4				N2SO4				KCL			
	0.5g/l	1 g/l	1.5 g/l	2g/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	2g/l
C																				
L1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T'1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ :Réaction positive(tolérance)

original,2016

La détermination de la concentration inhibitrice pour les cinq sels testés montre que les souches de *Rhizobium* issues des plantules de la fève présente une bonne tolérance à la salinité

L'inhibition de la croissance bactérienne par les sels, résulte de deux effets que peut présenter un stress salin, un effet ionique et un effet osmotique (Bohloul, 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, SO₄ 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).

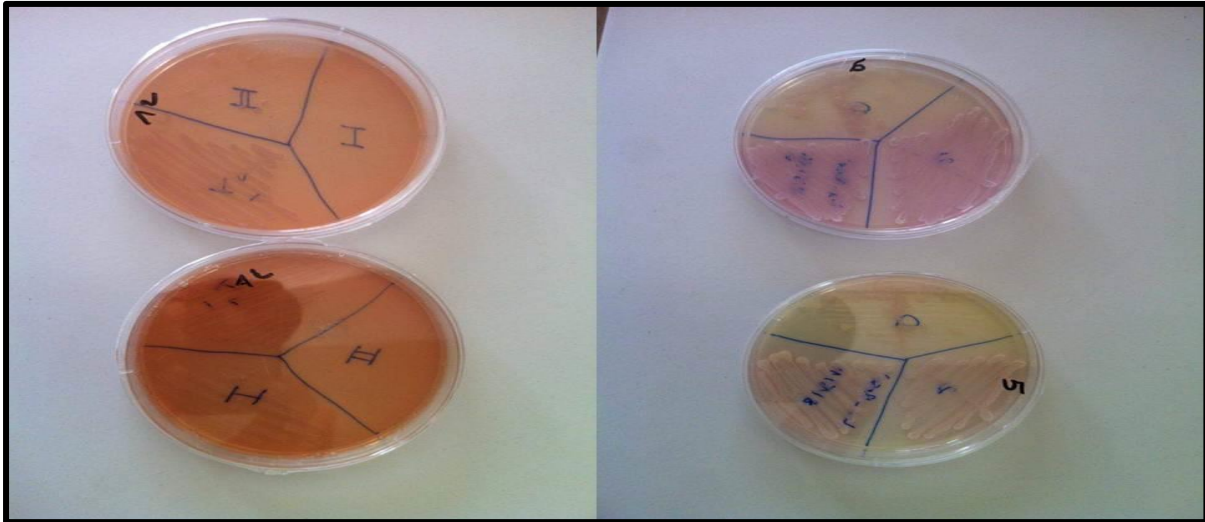
Par ailleurs, l'enrichissement du milieu et/ou le cytoplasme en ions peut provoquer un déséquilibre électrolytique induisant une perturbation de la dynamique des échanges entre la cellule et le milieu (Yancey, 1994; Natarajan et al., 1996).

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 (Natarajan et al., 1996).

La croissance et la survie d'une souche bactérienne en présence d'une osmolarité croissante du milieu extérieur, nécessitent une stratégie adaptative pour que la bactérie maintienne une pression osmotique intracellulaire supérieure à celle du milieu extracellulaire. La réponse des micro-organismes aux variations de pression osmotique (=osmorégulation) se traduit généralement par une accumulation plus ou moins importante de solutés compatibles ou molécules organiques, dont le transport à travers la membrane cytoplasmique nécessite des transporteurs spécifiques. Les principaux solutés compatibles rencontrés chez les bactéries sont certains acides aminés, les bétaines et divers glucides (Le Rudulier, 1993).

I-2-4.Sensibilité des souches isolées au pH

La mise en culture des souches choisies sur le YMA .Mglose avec les différentesvaleurs de pH (4- 6- 5-8- 9-12) montre que toutes les souches n'ont pas pousse sur le Y.E.M à **pH 12**



Original :2016

Figure9. Résultat de test de PH

Cinq souches(04,05,06 ,02,,I) sont capable de pousser entre pH 4 et pH 9 avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6 et 8(figure 9

(L1,B,II,T'1)sont incapable de croitre on pH inferieure à6

Les souches (A,R8,D) n'ont aucune croissance àpH4

Au pH 9seules les souches(R8,B,T'1)n'ont pas pu croisse

Tableau6. Résultats de test de tolérance des isolats à la variation du PH.

Isolats/ PH	4	5	6	8	9	12
A	-	+	+	+	+	-
R8	-	+	+	+	-	-
D	-	+	+	+	+	-
L1	+	-	+	+	+	-
04	+	+	+	+	+	-
05	+	+	+	+	+	-
06	+	+	+	+	+	-
02	+	+	+	+	+	-
B	-	-	+	+	-	-
II	+	-	+	+	+	-
I	+	+	+	+	+	-
T'1	-	-	+	+	-	-

Original :2016

Les isolats T'1 et B ont une croissance qu'au PH (6et8) donc ils sont neutrophiles.

Selon Graham (1964) et Jordan (1984), les rhizobia peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9. Yadav et Vyas (1971) ont même montré qu'une vingtaine de souches isolées de huit espèces différentes de légumineuses ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 .

D'après nos résultats, les souches étudiées ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'alcalinité et majoritairement tolérantes à l'acidité.

Zablotowicz et Focht (1981) ont rapporté que les souches à croissance lente qui nodulent *Vigna unguiculata* ont été plus sensibles aux pH alcalins que celles à croissance rapide.

D'autres études ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité que les bradyrhizobia (Jordan, 1984 ; van Rossum et al., 1994). Cependant, des souches de la même espèce peuvent montrer une large variation de tolérance au pH (Glenn et Dilworth, 1994). En effet, des souches tolérantes à des valeurs très basses de pH ont été retrouvées chez des espèces à croissance rapide telles que *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium tropici* (Cooper, 1982 ; Cooper et al., 1985 ; Graham, 1992 ; Graham et al., 1994 ; Gao et al.,

1994). Toutefois, certains auteurs ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la tolérance d'une souche au pH acide du milieu et le taux de sa croissance (Mohamed et al.,2000). De plus, Correa et Barneix (1997) ont montré que la tolérance au pH acide de quelques souches à croissance rapide appartenant à l'espèce *Mesorhizobium loti* ne peut pas être corrélée à leur aptitude à acidifier le milieu. Ces auteurs ont suggéré que la tolérance apparente ne peut pas être due à l'excrétion de composés qui alcalinisent le milieu mais plutôt à la présence d'autres facteurs qui protègent la cellule bactérienne de l'action de la forte concentration extracellulaire en protons.

I-2-5 Sensibilité des souches isolées à la température

Après incubation aux différentes températures des souches ensemencées sur Y.E.M

gélose, toutes les souches ont poussé à (35 ,40,45,50)° C. Aucune souche n'a poussé à 4° C.

Tableau 7. Température de croissance testée

Isolats/température	4°C	35	40	45	50
02	-	+	+	+	+
T'1	-	+	+	+	+
05	-	+	+	+	+
R8	-	+	+	+	+
06	-	+	+	+	+
D	-	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+
B	-	+	+	+	+
L1	-	+	+	+	+
A	-	+	+	+	+
II	-	+	+	+	+
I	-	+	+	+	+

Original :2016

Comme toutes les bactéries du sol les rhizobia sont des organismes qui peuvent être inhibés par l'élévation ou la diminution de la température d'incubation (Jordan, 1984). Robert, (1976) a estimé que les rhizobia à croissance lente étaient beaucoup plus tolérants aux températures élevées que les rhizobia à croissance rapide

Il a été rapporté que les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les rhizobia dans les régions très humides ou froides (Zhang et Smith, 1996). L'action similaire des hautes températures a été également rapporté (Kishinevsky et al., 1992 ; Hungria et Franco, 1993).

L'exposition aux hautes températures peut mener à la perte du plasmide symbiotique et par conséquent la perte de la capacité infective de la bactérie. Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au-dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation.

I-2-6 Croissance sur YMA + rouge Congo (0,0025%)

Les souches isolées à partir des nodules de la fève absorbent très peu le rouge

Congo sur milieu YMA. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). par contre les formes contaminantes absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984), tous nos souches n'ont pas absorbé le rouge Congo

I-2-7 La vitesse de croissance

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau 8. En fait, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu.

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

Dans notre cas, toutes les souches sont à croissance rapide. Toutefois, toutes les souches ont produit des réactions acides sur le YEM solide + BTB à l'exception de la souche T'1 n'a produit aucune modification du pH du milieu.

Tableau 8 . Résultats de caractéristique physiologique des isolats

isolats	YMA+Rougecongo(RC)	YMA+bleu de bromothymol (BTB)
A	Rose	Jaune
R8	Rose	Jaune
D	Blanchâtre	Jaune
L1	Rose	Jaune
04	Blanchâtre	Jaune
05	Blanchâtre	Jaune
06	Rose	Bleu
02	Blanchâtre	Jaune
B	Blanchâtre	Jaune
II	Blanchâtre	Jaune
I	Blanchâtre	Jaune
T'1	Rose	Bleu

I-3 Test fixation d'azote



Original :2016

Figure10. Résultat de test fixation d'azote

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau9.

Les bactéries rhisobium trouvés dans les nodules racinaires des légumineuses peuvent fixer une grande quantité d'azote à partir de l'air ,ce qui réduit lanécessité d'apporter des engrais dans des prairies ayant une légumineuse présente .La plante ne fixe pas l'azote directement , mais elle

s'associe à des bactéries *Rhizobium* qui vivent dans de petites structures appelées nodules sur les racines des légumineuses . Ces bactéries vont prendre l'azote gazeux de l'air dans le sol ,et le transformer afin qu'il puisse être utilisé par la plante.

Le test réalisé in vitro sur un milieu sans azote, les souches testées ont des réactions différentielles . Sur le milieu un taux maximal de fixation d'azote a été enregistré avec les souches (L1,04 ,06,05,etB).Une fixation moins importante avec les souches (R8,02,etII),et le taux minimal a été enregistré avec les souches (AetT'1) prouvent que ces bactéries sont toutes capables de fixer l'azote figure 10

Tableau 9 . Résultats de test de fixation d'azote

isolats	Type de croissance	Taux de fixation
A	+	Moin importante
R8	++	Important
D	++	Moin importante
L1	+++	Très importante
04	+++	Très importante
06	+++	Très importante
05	+++	Très importante
02	++	Importante
B	+++	Très importante
II	++	Importante
I	++	Importante
T'1	+	Moin importante

I-4 PRODUCTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE(HCN)

Les résultats de ce test sont des résultats négatifs aucun virage de couleur jaune vers le brun au rouge brun donc pas de production d'HCN par la bactérie productrice .

I-5 Résistance des *Rhizobium* aux antibiotiques

La résistance des souches pour 05 antibiotiques, est très remarquable, comme phénomène physiologique chez ces bactéries, et c'est peut être, ce pouvoir de résistance, qui les caractérise sur un second plan, probablement que c'est une forme d'adaptation dans des conditions de

compétitions très agressives, que ces bactéries ont développé cette capacité de résistance, la réponse de nos souches est représentée dans la figure11.

Tableau.10 Résultat de test d'antibiotique

	Na	CAZ	FI	Anc	C	E
I	1.1	0	0.73	0.80	1.4	1.15
T'1	1.11	0	0.92	0.92	1.14	0.70
R8	1.20	0	0.86	0.88	1.31	0.70
6	0.55	0	0.62	0.72	1.41	0.92
4	1.26	0	0.76	0.90	1.34	0.80
B	1.21	0	0.70	0.83	1.34	0.96
A	0.81	0.05	0.77	0.51	0.96	0
II	1.25	0	0.75	1.01	1.42	1.2
5	1.14	0	0.61	0.75	1.33	0
L1	1.04	0	0.67	0.80	1.31	1
D	0.66	0	0.78	0.27	0.75	0.30



Original :2016

Figure11. Résultat de test d'antibiotique

Tout les souches résistantes à :Chormphenicol(30Mg)
 ,Nitrofurention(300Mg)Nalidixicacid(30Mg), Amoxicillin+clavalamiacd(20/10Mg)

Pour Erythromycine(15g) : la souche AetL1 sont sensible, les autres souches sont résistante

Tout les souches sont sensible Ceftzidim(30Mg) Nos resultants indiquent la large variabilite de resistantes aux 05 antibiotiques étudiés, et suggèrent qu'il est possible de sélectionner des Rhizobiums avec de fortes competences de competitivites,

I-6 Test d'antagoniste

Les résultats des tests préliminaires, de détection d'activité antagoniste des 12 souches bactériennes identifiées comme des rhizobiums vis-à-vis de deux Fusarium montre une variabilité dans les intensité de réponse.

Nous avons utilisé deux milieux de culture différent YMA et PDA pour sélectionner les souches inhibitrices et estimé l'effet des souches antagonistes sur la croissance des deux champignons par rapport au témoin .

Nous avons calculé le taux d'inhibition pour les champignons la réponse de nos souches est représentée dans les figures(12,13)

Sur le milieu YMA ,un taux maximal d'inhibition a été enregistré avec la souche T'1 vis-à-vis de Fusarium oxysporum f sp albedinis. (FOA) qui est d'ordre de 83%.et le taux minimal d'inhibition a été enregistré avec les souches (IetL1) d'ordre de 67%et 69% .Le taux d'inhibition contre Fusarium graminearum (FG) est varié entre 59%(la souche L1 et 85%la souche T'1

Sur le milieu PDA nous avons remarqué qu'il existe toujours une activité antagoniste chez les différents souches, mais moins importantes vis-à-vis des deux champignons avec un taux d'inhibition varié entre 53à 66% par contre le Fusarium graminearum (FG) et de 67 à 72% contre Fusarium oxysporum f sp.

Pour nos souches et sur le milieu YMA, en comparant l'effet des différents souche bactériennes en remarquant que toutes les souches présentent une activité d'antagoniste différentielle entre elle et nous avons remarqué que l'activité de l'antagonisme des souche contre Fusarium oxysporum f sp albedinis. (FOA) est plus élevé par rapport Fusarium graminearum (FG).

D'après nos résultats sur le milieu PDA Les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagoniste importantes .Ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes inhibiteurs dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribué à la synthèse des antibiotiques et d'autres types de 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 produit 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).

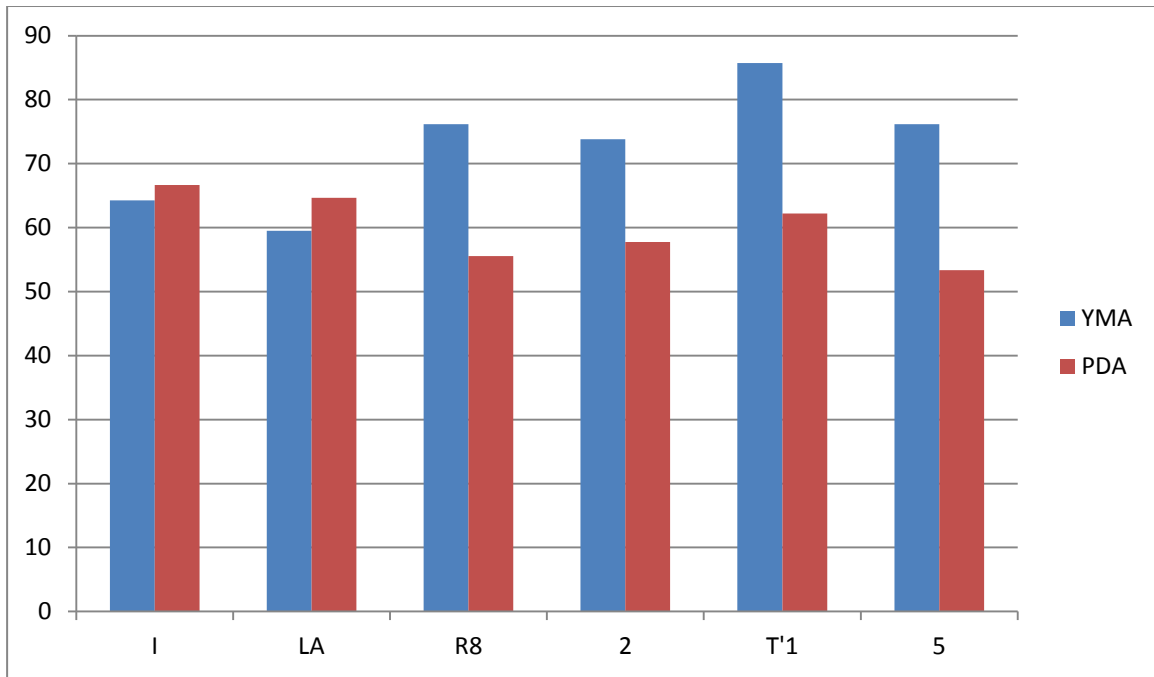


FIGURE 12. Le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f sp. (FOA)

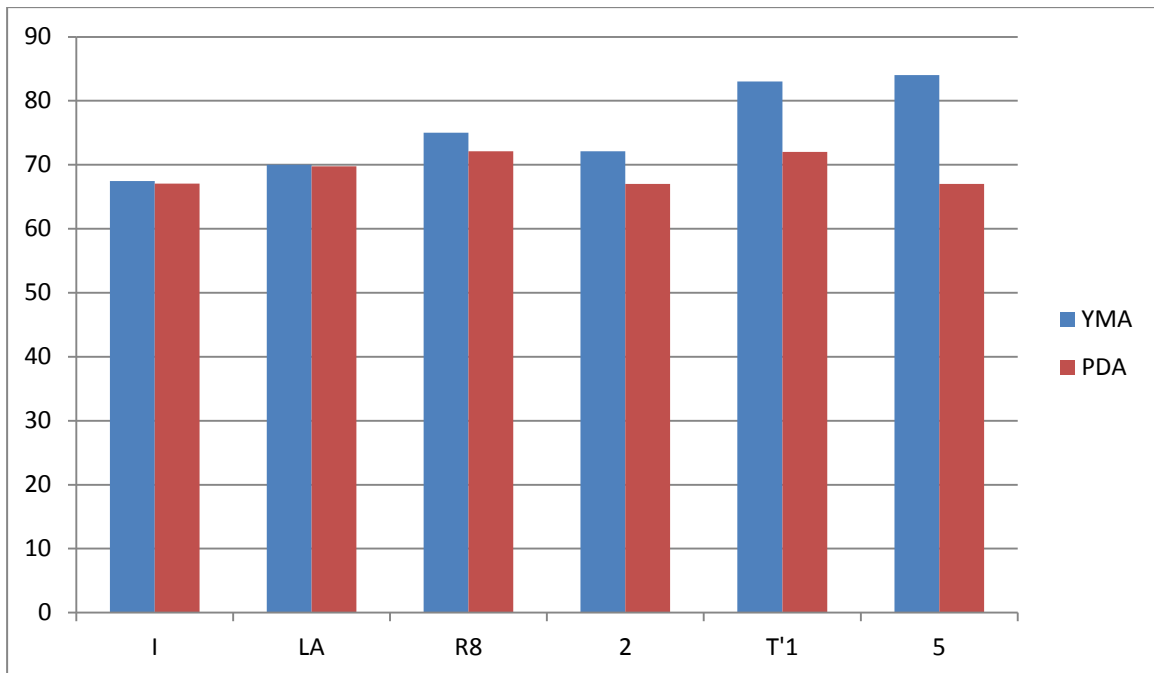


FIGURE 13. Le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis *Fusarium graminearum* (FG)

Conclusion

Conclusion:

L'atmosphère terrestre est constituée de 80% d'azote, un élément indispensable à la croissance des plantes. Sa fixation est le second plus important processus biochimique après la photosynthèse. La carence en cet élément constitue l'un des principaux facteurs limitant la production agricole

La fixation de l'azote par la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses présente un intérêt économique et agronomique considérable, en limitant l'utilisation des engrais azotés (nitrates) qui sont coûteux et polluants, et en augmentant le stock d'azote du sol pour produire un bon compte des protéines alimentaires de qualité sanitaire..

La capacité des *Rhizobium* à former des nodosités fixatrices d'azote dépend fortement de plusieurs facteurs tels que : pH, température, la salinité et les antibiotiques. Ceci nous a poussé à rechercher des souches tolérantes ces facteurs.

Certaines souches isolées répondent d'une façon remarquable à des conditions de stress. La majorité des souches peuvent croître sur le milieu contenant les différentes concentrations des sels, et tolèrent des températures allant jusqu'à 50°C, elles sont aussi capables de pousser entre pH 4 et pH 9 et elles résistent à plus de cinq antibiotiques testés, cette antibiorésistance intrinsèque est un signe de leur compétitivité envers d'autres populations microbiennes, ce caractère peut être un critère taxonomique ou au moins un marqueur écologique pour ces souches.

La recherche des souches qui inhibent la croissance des champignons phytopathogènes est une contribution pour vérifier les potentialités d'antagonisme et de compétition des souches de *Rhizobium*, comme agent de lutte biologique contre les pathogènes.

Nous avons testé 12 souches de *Rhizobium* sur 2 souches de champignons phytopathogènes. Cependant, la suppression des espèces fongiques varie selon les souches de *Rhizobium* qui présentent des degrés d'inhibition différents.

Au terme de cette étude, les souches de *Rhizobium* de la région de Laghouat vu qu'elles nodulent *Vicia faba*, peuvent être considérées comme des souches de *Rhizobium leguminosarum*, ces souches sont très compétitives, par leurs

capacités de multi-résistance aux antibiotiques et peuvent faire l'objet de souches d'inoculation, dans des zones de stress et des cultures sujettes à des infections par des champignons phytopathogènes

Références

Bibliographiques

- **Alkama N., Noureddine N.E., Haddadj A., Sadji H., Issad S., Amrani S., 2002.** La pratique de l'inoculation en agriculture et en foresterie : une biotechnologie à notre portée communication orale présentée au 2eme congrès de Biotechnologie. Tunisie.
- **Beck D.P, Materon L.A., Afandi F., 1993:** Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.
- **Berner E.F et Berner R.A, 1996.** Global environment: water, air and geochemical cycles. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 286p.
- **Bockman O.C., Kaarstad O., Lie O.H., Richard I., 1990.** Agriculture et fertilisation : les engrais- leur avenir. Ed. Norsk Hydroa, Oslo, Norvège. 258p.
- **Bohlool BB, Ladha JK, Garrity DP et George T (1982)** Biological nitrogen fixation for sustainab **Boivin, C., and Giraud, E.,(1999)**-Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward apolyphasic apprich using Nod factors and nod genes. In: Highlights of Nitrogen Fixation Research. Eds. By Martinezromero E., and Hernandez, G. Kluwer Academic Plenum Publishers: New York. Pp. 295-299.
- **Boyeldieu J., 1991.** Produire des grains oléagineux et protéagineux. Eds. TEC et DOC. Paris. 234p.
- **Brewin N J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992:** Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3 pp 239-248.
- **Chambenoit C., Laurent F., Machet J.M., Sceurer O., 2002.** Fertilisation azotée de la pomme de terre : Guide pratique. Ed. RNRA. 128p. **Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Ed. de Boeck université. Paris. 514p.
- **Chaux C et Foury C.L., 1994.** Production légumière : légumineuses potagères, légumes fruits. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. 563p.
- **Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Ratet P 1995 :** Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. Plant Physiol. 108 pp 533-542
- **Cullimore, J. V., Ranjeva R., Bono J. J., 2001 :** Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. Trends Plant Sci **6**:24- 30.
- **Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. Quae. Paris. 383p.
- **Dolery I., Pedallu C., Vanpeene. Bruhier S., 2003.** Réaménagement forestier des carriers de granulats. Ed. Quae. 319p.
- **Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999.** Les arbres fixateurs de l'azote: caractéristiques fondamentales et role dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et

tropicaux avec référence particulier aux zones subhumides et arides. Ed. CIRAD, Editions Espaces, FAO, IR. Montpellier. France. 499p.

• **Doré T., Le Bail M., Martin P., Ney B., Roger. Estrade J., 2006.** L'agronomie aujourd'hui. Ed. Quae. Paris. 367p.

• **Duhoux E., Nicole M., 2004 :** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. pp 1-20 Edition DUNOD. Paris. France.

• **Frank, B., 1879:** Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* **24** pp 377-388.

• **Fred, E. B., Baldwin I. L., McCoy E., 1932:** Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis.

• **Gallais A. et Bannerot H., 1992.** Amélioration des espèces végétales cultivées. Ed. INRA. Paris. 768p.

• **Graham, S. (2008).** Strategy instruction and the teaching of writing. In C. MacArthur, S. Graham & J. Fitzgerald (Eds.), *Handbook of writing research* (pp. 187-207). New York: The Guilford Press.

• **Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R., 1996.** Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. Paris. 1072p.

• **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, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32** pp 136-139.

• **Kape R., Parniske M., Werner D., 1991:** Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol.* **57** pp 316-319.

• **Kondorosi E., Kondorosi A., 2000:** Control of root nodule organogenesis. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK

• **Lawes D.A., Bond D.A., Poulsem M.H., 1983.** Classification, Origine, Breeding methods and objectives, the Fabae bean. Eds. Hebbethwaite, Betherworth, London. pp 23-74.

• **Le Clech B., 1999.** Production végétales grandes cultures. Ed. Synthèse Agricole. Paris. 410p.

• **Leguen J et Duc G., 1992.** La fèverole : amélioration des espèces végétales cultivées; objectifs et variétés de sélection. Ed. I.N.R.A. Paris. pp : 189-103.

• **Lengeter J.W., Drews G., Schlegel H.G., 1999.** Biology of the Prokaryotes. ED. Georg thieme Verlag. 955p.

- **Léveque C et Mounolou J.C., 2001.** Biodiversité : Dynamique biologique et conservation. Ed. Dunod. Paris. 248p.
- **Léveque C et Mounolou J.C., 2001.** Biodiversité : Dynamique biologique et conservation. Ed. Dunod. Paris. 248p.
- **Luttge G., Pienaar B.J., Braune K, Perrino P., 1994.** Collecting with Vigna in Nata and Transvaal (South Africa). Plant Genetic Ressources Newsletter. pp. 21-23.
- **Madigan M et Martinko, 2007.** Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris. 1047p.
- **Maidak, B. L., Larsen N., McCaughey M. J., Overbeek R., Olsen G. J., Foge K., Blandy J., and Woese C. R., 1994:** The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.* **22** pp 3485- 3487.
- **Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C., 2009.** Environmental microbiology. Ed. Academic Press. 598p.
- **Messaili B., 1995.** Systématique des spermaphytes. Ed. Office de publication universitaires. Alger. 91p.
- **Miklashevichs, E., Rohrig H., Schell J., Schmidt J., 2001:** Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit. Rev. Plant Sci.* **20** pp373-394.
- **Morel R., 1996.** Les sols cultivés. Ed. TEC & DOC. Paris. 389p.
- **Morot-Gaudry J.F., 1998.** Sources et cycle de l'azote. In : Morot-Gaudry J.F. (Ed): assimilation de l'azote chez les plantes aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Quae, INRA Paris. pp 21-33.
- **Paul S., 1999.** Bactériologie. Ed. INRA. Paris . 414p.
- **Pawlowski K., et Bisseling T., 1996:** rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell* **8** pp 1899-1913.
- **Pedro G., 2007.** Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux. Ed. EDP Science. 427p.
- **Pelmont J., 2005.** Biodégradations et métabolismes : les bactérie pour les technologie de l'environnement. Ed. EDP Science. 798p.
- **Perry J.J., staley J.J., Lory S., 2004.** Microbiologie : Cours et questions de révision. Ed. Dunod. Paris. 891p.
- **Postgate J.R., 1982.** The fundamentals of nitrogen fixation. Ed. Cambridge University Press. 252p.

- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2003.** Microbiologie. Ed. De Boeck université. 1137p.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2003.** Microbiologie. Ed. De Boeck université. 1137p.
- **Ramade F., 2003.** Elément d'écologie : Ecologie fondamentale. Ed. Dunod. Paris. 674p.
- **Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S., 2003.** Biologie végétale. Ed. De Boeck université. Paris. 968p.
- **Richter G., 1993 :** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.
- **Ricklefs et Miller, 2005.** Ecologie. Ed. De Boeck université. Paris. 858p.
- **Robert M., 1996.** Le sol : interface dans l'environnement ressource pour le développement .Ed. Masson. Paris. 244p.
- **Rose M.R. et Mueller L.D., 2006.** Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693p.
- **Sadowsky MJ, Graham pH.** Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrand E, editors. The Prokaryotes. Springer; New York: 2006. pp. 818–841.
- **Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002:** Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 866-874.
- **Sprent J.I.** Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey
- **Streeter J.G., 1991.** Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodule. *Adv. Bot. Res.* 18: 129-187.
- **Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., 2003.** Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc. 945p.
- **Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., and Swings J., 1996:** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 pp 407-438
- **Vasse, J., de Billy F., Camut S., Truchet G., 1990:** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172 pp 4295-306.
- **Vilain M., 1997.** La production végétale : les composantes de la production. Ed. TEC et DOC. 478p

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

• **Waligora Cecile., Tetu T., 2008 :** Légumineuses il est urgent de les réhabiliter. Edition Techniques culturales simplifiées. N° 48 Juin/Juillet/Août 2008..

• **Wekeford T., 2004.** Aux origines de la vie : Quand L'homme et le microbe s'appriivoisent. Ed. De Boeck université. Paris. 128p.

• **Wilson, J. K. 1944:** Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* 58 pp 61-69

• **Yancey , 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.

• **Zakhia F., de Lajudie P., 2006 :** La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* N° 52 p : 169-181.

ANNEXES

Annexes :

Les milieu de cultures utilisée :

1 .YMA

Mannitol	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillés	1000ml
Agar	15g
pH	6.8

2 .PDA

Pomme de terre	200g
Peptone	10g
Agar	15g
Eau distillée	1L

3 .Wingoradsky

Solution A:

KH ₂ PO ₄	50g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	25g
NaCl	25g
FeSO ₄ 6H ₂ O	1g
Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O	1g
MnSO ₄ 4H ₂ O	1g

4. RC

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

5 . BTB

Bleu de bromothymol	0.5g
Ethanol	100ml
5ml de solution/1litre YMA	

Solution B :

D glucose	0.5g
CaCO ₃	0.1g
Eau distillée	1L
pH	6.2