



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمه لخضر الوددي

Université Echahid Hamma Lakhdar – El Oued

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculte des Sciences de La Nature et de La Vie

قسم الفلاحة

Département Agronomie



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences  
Agronomie

Spécialiter : production végétale

### THEME

**Isolement et caractérisation des bactéries endophytes à  
partir de nodules d' Deux espèces de la famille des Fabacée**

Présenté par :

✚ HANI Imane

✚ MILOUDI Houda

Devant le jury :

Président	Dr. Kraimia maroua	MAB	El-Oued University
Examinatreur	Dr. Mehda smail	MCA	El-Oued University
Promotrice	Dr. Bouafiane Mabrouka	M.C. B	El-Oued University

Année Universitaire : 2023-2024

# الشكر والتقدير

الحمد لله الذي علم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، الحمد لله المنان، الملك القدوس السلام، مدبر الليالي والأيام، مصرف الشهور والأعوام، قدر الأمور فأجراها على أحسن نظام، ما شاء الله كان وما لم يشأ لم يكن، الحمد لله على ما أنعم به علينا من فضله الخير الكثير والعلم الوفير وأعاننا على إنجاز هذا العمل الذي نحتسبه عبادة من العبادات جعلها الله خالصة لوجهه الكريم (من لا يشكر الناس لا وبعد حمد الله تعالى وشكره على اتمامنا لهذه المذكرة، ولقول النبي ﷺ يشكر الله)، نتقدم بخالص الشكر وعظيم الامتنان للأستاذة الفاضلة د. "بوعفیان مبروكة" على ما قدمته لنا من علم نافع وعطاء متميز وارشادات مستمرة، وعلى ما بذلته من جهد متواصل ونصح وتوجيه من بداية مرحلة البحث حتى إتمام هذه المذكرة، ومهما كتبتنا من عبارات وجمل فإن كلمات الشكر تظل عاجزة عن إيفاءها حقها، فجهزها الله عنا خير الجزاء وجعل ذلك في ميزان حسناتها. كما نتقدم بأسمى عبارات الشكر والتقدير إلى والدينا العزيزين اللذين غرسا فينا حب العلم من الصغر، وقدما لنا كل غالي ونفيس، وكان لهما الفضل بعد الله فيما وصلنا إليه الآن فلا نملك إلا الدعاء لهم بطول العمر وحسن العمل للأحباء منهم، والرحمة والمغفرة لمن توفي منهم. ونشكر اللجنة المناقشة لقبولهم مناقشتنا وتوجيهنا.....ويسرنا أن نتقدم بالشكر الجزيل ولكل من مد لنا يد العون، أو أسدى لنا معروفاً، أو قدم لنا نصيحة، أو كانت له إسهامه صغيرة أو كبيرة في إنجاز هذا العمل فله منا خالص الشكر والتقدير.

# الإهداء

أهدي هذا العمل المتواضع

إلى من شجعني على المثابرة طوال عمري، إلى الرجل الأبرز في حياتي

(والدي العزيز)

إلى من بها أعلو، وعليها أرتكز، إلى القلب المعطاء

(والدتي الحبيبة)

إلى من بذلوا جهدًا في مساعدتي وكانوا خير سندٍ

(إخوتي وأخواتي)

إلى أسرتي إلى أصدقائي وزملائي

إيمان

# الإهداء

أهدي هذا العمل المتواضع

إلى خالدة الذكر التي وافتها المنية قبل أربعة أشهر،

(أمي الحبيبة).

إلى من كان خير مثال لرب الأسرة،

والذي لم يتهاون يوم في توفير سبيل الخير والسعادة لي.

(أبي الموقر).

إلى من أعتمد عليهم في كل كبيرة وصغيرة.

(إخوتي وأخواتي الكرام).

إلى أصدقائي ومعارفي الذين أجّلهم وأحترمهم

هدى

---

## Résumé

L'azote N est un élément important pour la croissance des plantes. Cet élément est disponible dans l'atmosphère en grande quantité sous forme de gaz (N<sub>2</sub>) , car il ne peut être utilisé directement par aucun organisme vivant, à l'exception des bactéries fixatrices d'azote (rhizobiums). ce processus se produit par symbiose avec les légumineuses. Ce travail porte sur l'isolement et la purification des bactéries des nodules racinaires de deux plantes dans deux régions écologiquement différentes, *Vicia ervilia* et *Retama reatam*, où 6 souches de plantes saharienne ont été isolées de la Wilaya d'El Oued et 4 souches de plantes d'une région semi-humide de Skikda. Province. Afin d'étudier la capacité de souches bactériennes isolées à améliorer la croissance des cultures du désert, 10 souches fixatrices d'azote ont été isolées et testées comme vaccin sur des graines de luzerne *Medicago sativa*. Il a été constaté un taux de survie élevé dans les graines de luzerne inoculées avec des bactéries. isolé des plantes du saharienne, ainsi que la présence de davantage de racines ramifiées. Le nombre de feuilles présentes dans la plante. Les bactéries endophytes isolées de légumineuses à croissance spontanée représentent un catalyseur alternatif pour la fertilisation azotée à long terme du sol.

**Mots-clés :** nodules, bactéries symbiotiques, azote, *Vicia ervilia*, *Retama reatam*

---

**Abstract:**

Nitrogen **N** is an important element for plant growth. This element is available in the atmosphere in large quantities as a gas (N<sub>2</sub>), because it cannot be used directly by any living organism, except nitrogen-fixing bacteria (rhizobia). this process occurs by symbiosis with legumes. This work focuses on the isolation and purification of bacteria from the root nodules of two plants in two ecologically different regions, *Vicia ervilia* and *Retama reatam*, where 6 strains of Saharan plants were isolated from the Wilaya of El Oued , and 4 strains of plants from a semi-humid region of Skikda. To study the ability of isolated bacterial strains to improve the growth of desert crops, 10 nitrogen-fixing strains were isolated and tested as a vaccine on alfalfa seeds *Medicago sativa*. A high survival rate was found in alfalfa seeds inoculated with bacteria. isolated from Saharan plants, as well as the presence of more branched roots. and The number of leaves present in the plant. Endophytic bacteria isolated from spontaneously growing legumes represent an alternative catalyst for long-term nitrogen fertilization of soil.

**Key words:** nodules, symbiotic bacteria, nitrogen, *Vicia ervilia*, *Retama reatam*

يعتبر النيتروجين N عنصرا مهما لنمو النبات ، يتوفر هذا العنصر في الجو بكميات كبيرة على شكل غاز حيث لا يمكن إستعماله مباشرة من طرف اي كائن حي ما عدا البكتيريا المثبتة لنيتروجين (ريزومبيا) ، و تكون هذه العملية بحدوث تكافل مع البقوليات . يركز هذا العمل على عزل وتنقية البكتيريا من العقيدات الجذرية للنباتين في منطقتين مختلفتين ببنييا *Retama reatam* , *Vicia ervilia* وتعرف على العزلات المتواجدة بها حيث تم عزل 6 سلالات لنباتات الصحراوي من ولاية الوادي و 4 سلالات لنبات من منطقة شبه رطبة من ولاية سكيكدة . و من أجل دراسة قدرة السلالات البكتيرية المعزولة في تحسين نمو المحاصيل الصحراوية ، تم عزل 10 سلالات مثبتة للنيتروجين واختبارها كلفاح على بذور البرسيم الحجازي *Medicago sativa* ولوحظ وجود معدل بقاء كبير في بذور البرسيم الحجازي الملقحة بالبكتيريا المعزولة من نبات الصحراء وكذلك وجود جذور فرعيه اكثر بها ، و في عدد الاوراق تمثل البكتيريا الداخلية المعزولة من نبات البقوليات الذي ينمو تلقائيا محفزا بديلا للتخصيب النيتروجيني طويل المدى للتربة

**الكلمات المفتاحية:** العقيدات ، البكتيريا التكافلية ، النيتروجين ، *Retama reatam* , *Vicia ervilia*

---

**Liste des Figures**

<b>Figure 01 : famille des fabaceae (Simpson, 2019).</b> .....	<b>5</b>
<b>Figure 02 : la forme de nodule racinaire</b> .....	<b>9</b>
<b>Figure 03 : processus de nodulation (Kamboj <i>et al</i>, 2008).</b> .....	<b>14</b>
<b>Figure 04 :situation géographique de la région de d'El Oued ( Cartographie ,2018) .....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 05 : représentation photographique de l'espèce <i>Retama reatam.</i> (BELGOT <i>et al</i> ,2021).</b> .....	<b>22</b>
<b>Figure 06 : Photo des différentes parties de la plante <i>Vicia ervilia</i></b> .....	<b>23</b>
<b>Figure 07 : nodules et fractions des racines conservés.</b> .....	<b>24</b>
<b>Figure 08 : trempage des nodules et fractions des racines.</b> .....	<b>25</b>
<b>Figure 09 : préparation des nodules (stérilisation et écrasement).</b> .....	<b>26</b>
<b>Figure 10 : isolement des bactéries.</b> .....	<b>26</b>
<b>Figure 11 : observé les colonies bactériennes sur les milieux de cultures YAM et YAM+RC un la loupe.</b> .....	<b>27</b>
<b>Figure 12 : microscope optique utilisé pour l'observation des souches.</b> .....	<b>28</b>
<b>Figure 13 : préparation des graines pour la germination.</b> .....	<b>29</b>
<b>Figure 14 : méthode préparation d'inoculum bactérien.</b> .....	<b>29</b>
<b>Figure 15 : Le processus d'inoculation des graines dans une suspension bactérienne et de transport des plants inoculés jusqu'au site de plantation.</b> .....	<b>30</b>
<b>Figure 16 : Une photo montrant la mesure et la longueur tiges et racines.</b> .....	<b>31</b>
<b>Figure 17 : Une photo de la mesure du poids frais et sec de la plante expérimentale.</b> .....	<b>31</b>
<b>Figure 18 : Schéma présentatif de la méthodologie du travail</b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 19 : photos des colonies bactériennes isoler sur YMA.</b> .....	<b>35</b>
<b>Figure 20 : photos des colonies bactériennes isolés sur milieu de culture YMA+RC.</b> .....	<b>36</b>
<b>Figure 21 : coloration de Gram des souches isolées (100x)</b> .....	<b>38</b>
<b>Figure 22 :Photo de différents plants en phase de croissance inoculation à différentes souches bactériennes isolées de deux plantes étudiées</b> .....	<b>40</b>
<b>Figure 23 : photo montrant le nombre de feuilles ende plants inoculés avec différentes souches bactériennes.</b> .....	<b>41</b>
<b>Figure 24 : Image d'un graphique à barres montrant la hauteur de la tige de différents plants inoculés avec des bactéries.</b> .....	<b>42</b>
<b>Figure 25 : photo montrant des graphiques à barres de la longueur des racines de plantes inoculés avec différentes souches bactériennes.</b> .....	<b>43</b>

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 01 : estimation des quantités d'azote fixe Par différentes Fabacées cultivées (valeurs extrêmes entre parenthèses) (Tahkoubit. A.2018) .....</b>	<b>6</b>
<b>Tableau 02 : valeur nutritionnelle de quelques fabacées en g pour 100g de MS (Ait Saada <i>et al</i>, 2016). .....</b>	<b>7</b>
<b>Tableau 03 : données climatiques de la wilaya d'El-oued des années (2019-2023) (Station météorologique en Guemar 2024) .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 04 : description morphologique des colonies sur YMA.....</b>	<b>34</b>
<b>Tableau 05 : description morphologique des colonies sur YMA+RC. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau 06 : résultats de coloration de Gram des souches isolées. ....</b>	<b>37</b>
<b>Tableau 07 : description phénotypique des souches isolées. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tableau 08: taux de survie des graines germés inoculés.....</b>	<b>39</b>

## Liste des abréviations

**YMB:** Yaset Manitol Broth

**YMA:** Yaset Manitol Agar

**RC :** Rouge congo.

**T :** Température moyenne annuelle (°C)

**P :** Précipitation moyenne annuelle (mm)

**H :** Humidité moyenne annuelle (%)

**V :** Vitesse moyenne annuelle du vent (m/s).

---

---

## Sommaire

الشكر والتقدير.....	
Résumé.....	
Abstract:.....	
ملخص.....	
Liste des Figures .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des abréviations .....	
Sommaire.....	
Introduction générale.....	1

### Etude bibliographique

1- Les légumineuses « famille des Fabaceae ».....	4
1-1-Généralités .....	4
1-2-Classification des légumineuses .....	5
1-3- L'importance des légumineuses .....	5
2- Fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	7
2-1- Fixation libre.....	8
2-2- Fixation symbiotique .....	8
2-3- Nodulation.....	10
2-3-2- Processus de nodulation.....	11
2-3-3-Régulation du nombre des nodules.....	14
3- Facteurs influençant la symbiose Rhizobium- légumineuses .....	14
3-1- Stress thermique.....	15
3-2- Stress hydrique.....	15
3-3- Effet du pH.....	15
3-4- Stress salin .....	16
3-5- Autres facteurs .....	16
4- Intérêt des bactéries nodulants en agriculture .....	17

### Partie pratique

1-Présentation de la zone d'étude (El Oued).....	19
1-1-Situation géographique .....	19
1-2- Caractérisation climatique .....	20
1-3- Caractérisation pédologique.....	21
2- Méthodologie du travail .....	21

## Sommaire

---

2-1- Echantillonnage des plantes .....	21
2-2-Prélèvement et conservation des nodules .....	23
2-3-Réhydratation des nodules conservés .....	24
2-4-Isolement des souches bactériennes fixatrices d'azote .....	25
2-5-Préparation des milieux de culture.....	26
2-6-Isolement des bactéries .....	26
2-7-Purification des bactéries .....	27
3- Caractérisation macroscopique .....	27
4-Caractérisation microscopique .....	27
4-1-Coloration de gram .....	27
4-2-Forme des souches .....	28
5- Conservation des souches.....	28
6- Test de Inoculation des souches isolées .....	28
6-1-Préparation des graines .....	28
6-2- Préparation d'inoculum bactérien .....	29
6-3-Inoculation des graines .....	30
6-4-Paramètres étudiés .....	30
1-Résultats de l'isolement des bactéries des nodules racinaires.....	33
1-1-Observations macroscopiques.....	33
2- Résultats des observations microscopiques.....	36
2-1- Coloration de Gram.....	36
2-2-Forme des souches .....	38
3- Résultats de l'inoculation par les souches fixatrices d'azote .....	39
3-1-Taux de survie.....	39
3-2-Paramètres biométriques .....	40
4- Discussion .....	45
<b>Conclusion .....</b>	<b>47</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>49</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>58</b>

# *Introduction générale*



A l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote disponible est l'un des facteurs limitant majeurs de la croissance des plantes. Néanmoins, bien que l'atmosphère soit composée de 78% de di-azote, les plantes ne peuvent pas l'utiliser pour subvenir à leurs besoins. L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes appelés diazotrophes (**Guerroudj , 2009**).

Les légumineuses constituent une famille végétale importante (**fabaceae**), car leurs plantes se distinguent par leur grande capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce aux bactéries procaryotes. Il symbiote avec eux à l'intérieur de leurs racines pour travailler à convertir l'azote atmosphérique en azote organique que les plantes peuvent absorber et dont elles peuvent bénéficier. Il contribue également à améliorer et à fertiliser les sols et à assurer leur durabilité, et est également considéré comme ayant une grande importance nutritionnelle et économique (**Mahnane , 2009 et Sylvie , 2011**).

La symbiose *Rhizobium*-Légumineuse fournit chaque année à l'échelle de la planète une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable (**Sobihi , 2008**).

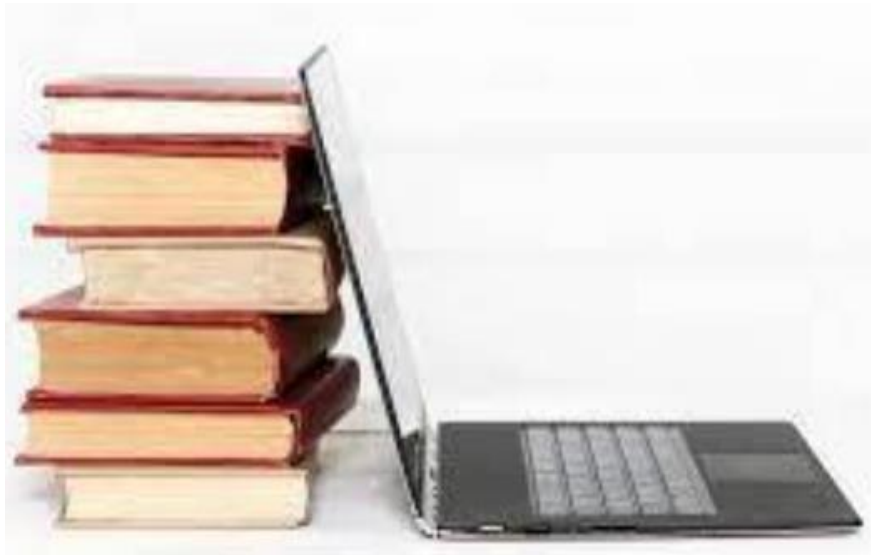
La survie des *Rhizobia* dans le sol, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs du milieu tels que le déficit hydrique, les températures extrêmes, l'acidité et le stress salin (**Wery , 1985**).

Les plantes des régions sahariennes sont connues comme étant parmi les plantes les plus importantes qui ont la capacité de s'adapter aux conditions de sécheresse et à d'autres facteurs dans des environnements saharienne difficiles. En effet, leurs plantes ont une capacité unique à modifier leur morphologie en réduisant la superficie feuilles et travaillent à fermer leurs stomates afin de réduire la perte d'eau en peu de temps.

Les espèces appartiennent à la famille des fabacées tolèrent davantage les conditions climatiques difficiles, par exemple elles résistent les conditions météorologiques variables telles que périodes de sécheresse et d'inondations qui endommagent d'autres cultures (**FAO , 2016**).

L'objectif de notre travail est d'extraire des souches bactériennes des nodules racinaires d'une fabacée spontanées sahariennes et d'une autre plante récoltée d'une région subhumide. Notre travail est subdivisé en trois parties : une synthèse bibliographique, méthodologie du travail et les principaux résultats.

# *Etude bibliographique*



## 1- Les légumineuses « famille des *Fabaceae* »

### 1-1-Généralités

Les légumineuses (**Fabaceae**) sont connues comme plantes à fleurs et appartiennent au groupe des angiospermes. Ce sont des dicotylédones (**Sprent , 1995**) et existent sous différents types, mais elles ont en commun le fait que les fruits sont sous forme de gousses (**Caratini , 1984**).

Les légumineuses occupent la troisième plus grande famille d'angiospermes en termes de nombre d'espèces, avec environ 727 genres et 20 000 espèces, après les Orchidacées et les Asteraceae (**Cronk et al , 2006**), Elle fait partie des plantes qui participent à la fixation de l'azote en symbiose avec des bactéries symbiotiques (**Ravan et al , 2000**).

Il se caractérise par un groupe diversifié d'arbres nains et d'herbes, chacun ayant une localisation différente, car les arbres se trouvent dans les zones chaudes et sèches, tandis que les espèces herbacées se trouvent dans les zones tempérées et humides (**Guignard et Dupont , 2005**).

La formation de nodules est un phénomène très répandu chez les légumineuses, dont environ 20% ont été étudiés. Ils se répartissent en trois familles au sein de la famille, selon la forme florale de la plante, des espèces de la sous-famille des Papilionacés 97% et de la sous-famille des Mimosoideae 90% et de la sous-famille des Caesalpinioideae 30% (**de Faria et al , 1989**).



---

**Figure 01** : famille des fabaceae (<https://rattibha.com/thread/1512707975529615365>).

## **1-2-Classification des légumineuses**

La famille des Fabacée est classée en trois sous-familles selon la forme des fleurs , deux sont monophylétiques (Papilionoideae, Mimosoideae) et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae) (**Guignard et Dupont , 2005**)

### **1-2-1-Les Caesalpinoideae**

Il existe neuf genres au sein de cette sous- famille (**Herridge et al , 2016**). Elle se distingue par leurs fleurs irrégulières possédant 05 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement. Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux (**Judd et al , 2001**).

### **1-2-2- Les Mimosoideae**

La sous famille des mimosoideae comprend le deuxième (*Acacia*), le cinquième (*Mimosa*) et le neuvième (*Inga*) des plus grands genres des fabacées (**Herridge et al , 2016**). Ils ont des fleurs régulières et petites, leurs étamines sont les parties les plus visibles de la fleur groupée souvent sous forme de pompons. Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux (**Judd et al , 2001**).

### **1-2-3-Les Papilionideae**

Cette sous-famille contient plus des deux tiers des espèces des fabaceae et comprend presque toutes les légumineuses d'importance économique. Dans cette sous-famille 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (**Sprent , 1995**).

Elle est cosmopolite et compte 12000 espèces réparties en 429 genres (**Young et al , 2003**). La forme de la corolle est similaire à celle d'un papillon, et cela est dû au nom donné à cette sous-famille (**Guignard et Dupont , 2005**). Leur fleur est irrégulière composée de 05 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène. La majeure partie des espèces sont herbacées (**Judd et al , 2001**).

## **1-3- L'importance des légumineuses**

### **1-3-1-Importance agronomique**

Selon **Sylivi (2011)** et **Mahnane (2009)**, les légumineuses se caractérisent par leur grande capacité à fixer l'azote atmosphérique et à le convertir en azote organique au moyen de bactéries symbiotiques, et pour cette raison, elles sont considérées comme une famille végétale importante avec leur capacité à améliorer le sol car ils sont l'un des éléments nécessaires qui participent à l'agriculture socialiste et à la rotation agricole. Ils ont une grande

importance économique, en plus du fait que leurs graines contiennent un pourcentage élevé de protéines. C'est l'un des plus divers et les plus répandus espèce car elle a une valeur nutritionnelle pour les humains et une ressource fourragère pour les animaux, elle est considérée comme une alternative économique à la viande, présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo) (**Saoudi , 2008**).

D'autre part, l'homme a exploité la partie aérienne des légumineuses fourragères en raison de sa richesse en protéines et l'a affectée à l'alimentation animale (**Duc et al , 2010**).

**Tableau 01** : estimation des quantités d'azote fixe Par différentes Fabacées cultivées (valeurs extrêmes entre parenthèses) (**Tahkoubit. A , 2018**)

Espèces	N fixe kg/ha
<b>Luzerne</b>	200 (56-463)
<b>Trèfle</b>	183 (45-673)
<b>Lupin</b>	176 (145-208)
<b>Fève</b>	210 (45-552)
<b>Pois</b>	65 (52-77)
<b>Lentille</b>	105 (88-114)
<b>Soja</b>	75 (1-168)

### 1-3-2-Importance alimentaire

Les légumineuses se caractérisent par leur richesse en protéines et en graisses, en particulier leurs fruits (graines). Sous cet aspect, elles ont été divisées en deux groupes, où le premier groupe contient des graines riches en glucides, en particulier en amidon (50 à 40 % des graines sèches). Il comprend un grand nombre de légumineuses, notamment les pois, les haricots, les pois chiches et les lentilles...etc. Le deuxième groupe contient des graines riches en graisses et un faible pourcentage d'amidon par exemple le lupin et le soja contient 10% et 20% de la matière grasse du produit sec. (**Rémond et walrand , 2017**)

**Tableau 02** : valeur nutritionnelle de quelques fabacées en g pour 100g de MS (**Ait Saada et al , 2016**).

Espèce	Matières				
	Protéines	Lipides	Glucides	Fibres	Minéraux
Haricot	26,2 - 43,6	1- 1.9	60 -65	4 - 5	3,0 - 4,9
Niébé	25,0 - 26,3	1.62 – 1,7	68 - 69	4 - 7,4	3,9 - 4,2
Soja	37,6	18,3	6,3	22,0	4,69
Pois chiche	19,4 - 20	5 – 5,6	54,9 - 58	-	4

## 2- Fixation biologique de l'azote atmosphérique

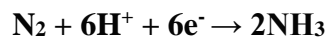
La présence d'azote dans l'atmosphère n'est pas adaptée aux plantes, même si l'atmosphère contient 78 % d'azote, car son utilisation à partir de cette source est limitée uniquement à certains procaryotes appelés diazotrophes (bactéries, actinomycètes...). (**Guerroudj , 2009**)

Il existe des systèmes reliant les plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries. Cette association aboutit à la fixation de l'azote atmosphérique par le partenaire symbiotique, qui fournit une grande partie de l'azote nécessaire à la croissance des plantes, que la plante peut absorber. En échange, l'usine partenaire fournit de l'énergie et des produits de photosynthèse (**Sobihi, 2008**). Certaines bactéries fixatrices d'azote n'ont pas besoin d'hôte et vivent librement, alors que d'autres espèces en ont besoin. Ils effectuent ce processus uniquement lorsqu'ils sont attachés à la plante hôte (**Madigan et al , 2007**).

## 2-1- Fixation libre

La plupart de ces bactéries sont libres. La conversion de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucides disponibles dans le sol, et elles sont capables de le convertir en grande quantité en laboratoire. Cette espèce se trouve principalement dans les pelouses et une concentration élevée dans la zone racinaire (**Tortora et al , 2003**). Elle appartient au groupe des bactéries aérobies et anaérobies, des cyanobactéries ainsi que des représentants des bactéries photosynthétiques (**Richter , 1993**).

Azotobacter et les diazotrophes utilisent l'azote moléculaire en le réduisant en  $\text{NH}_3$  grâce à l'enzyme nitrogénase (**Sobhi , 2008**) selon la réaction suivante :

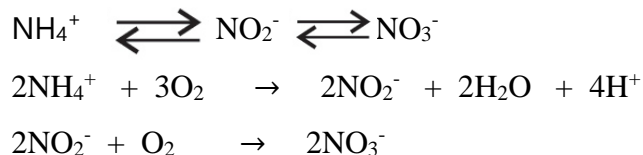


## 2-2- Fixation symbiotique

La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique se fait grâce aux certains groupes des bactéries qui vie en mode symbiotique avec les racines des plantes. On rencontre essentiellement les *rhizobia*, *Frankia* et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (**Pelmont , 1995**).

Les bactéries symbiotiques apportent chaque année 120 millions de tonnes d'azote dans les cycles biologiques, soit plus que les apports des bactéries libres (**Davent , 1996 : Dénarié , 2000**). Cette symbiose est la plus importante d'un point de vue écologique et agricole car les *rhizobiums* jouent un rôle majeur dans la symbiose avec les légumineuses et dans la croissance des plantes agricoles (**Tortora et al , 2003**).

Pour fixer l'azote, les principales molécules sont impliquées, notamment la nitrogénase, qui est une enzyme bactérienne complexe responsable de la conversion de l'azote  $\text{N}_2$  en ammonium  $\text{NH}_4$  assimilable par les plantes (**Mahboub , 2018**) selon les réactions suivantes :



### 2-2-1- Symbiose Rhizobium-légumineuses

La symbiose mutualiste entre la plante et la bactérie Rhizobium est le résultat d'une interaction spécialisée et significative entre les deux. Après des processus complexes de reconnaissance entre les organismes, la bactérie stimule la formation d'une structure spéciale appelée nodule à l'intérieur de la plante, où elle-même se différencie en bactéroïde capable de

---

fixer l'azote atmosphérique. La formation et la fonction de cette symbiose sont sous le contrôle génétique à la fois de la plante et de la bactérie *Rhizobium* (Campa *et al* , 1998).

Les associations de rhizobium et de légumineuses se distinguent par leur spécificité d'hôte, qui est l'une de leurs caractéristiques principales. Par exemple, un type spécifique de rhizobium en général est incapable d'établir des relations de symbiose efficaces qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même, les espèces de légumineuses ne peuvent former une nodulation qu'après la présence d'un nombre spécifique de types de rhizobium (Tilak *et al* , 2005).



**Figure 02** : la forme de nodule racinaire (<https://www.quora.com/Why>)

### 2-2-2- Les rhizobiums

Les bactéries fixatrices d'azote, appelées rhizobium, jouent un rôle important dans cette relation symbiotique avec les légumineuses. Le terme *Rhizobium* est dérivé du premier genre bactérien découvert et a été décrit au 19<sup>ème</sup> siècle comme une bactérie à Gram négatif, aérobie ou micro-aérobie, vivant en liberté ou avec en association un hôte approprié (légumineuses) possédant une forme de bâtonnets réguliers de 0.5 à 0.9 $\mu$ m de largeur sur 1.2 à 3 $\mu$ m de longueur (Jordan , 1984), Ce sont des bactéries mobiles grâce à un seul flagelle polaire ou par 2 à 6 flagelles péritriches (Wener , 1992).

Les *Rhizobia* sont des bactéries du sol, ce sont des fixateurs symbiotiques d'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses (Graham , 1991 ; Haukka *et al* , 1998 ; Gage , 2004). Les *Rhizobia* se transforment à l'intérieur des cellules du cortex racinaire en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry *et al* , 2004).

---

Les *Rhizobia* sont composés de groupes paraphylétiques où l'on trouve aussi bien des  $\beta$ -Protéobactéries appartenant entre autres aux genres Burkholderia (Moulin *et al* , 2001), Ralstonia (Chen *et al* , 2001) et Methylotheobacter (Sy *et al* , 2001) et des  $\alpha$ - Proteobactéries appartenant aux genres Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Allorhizobium, Sinorhizobium et Rhizobium (Wang et Martinez-Romero , 2000).

Il existe des bactéries régulières et des bactérie irréguliers, La température idéale pour la croissance des bactéries se situe entre 25 et 30°C, Le pH optimal pour la croissance se situe entre 6 et 7 et plus précisément 6.8 mais certaines souches tolèrent un environnement acide (pH = 4) comme le *Rhizobium japonicum* (Somasegaran et Hoben , 1994).

### 2-3- Nodulation

Pour que cette symbiose se produise, il existe des signaux partiels entre la plante hôte et les bactéries symbiotiques, qui sont responsables d'une série d'interactions aboutissant à l'établissement de l'association symbiotique et à la formation de nodules, qui conduisent à la fixation d'azote atmosphérique qui permet à la plante hôte d'en bénéficier (Grama , 2006).

#### 2-3-1- Mécanismes moléculaires de la nodulation

Les progrès et les développements scientifiques ont conduit à l'identification de nombreuses informations et mécanismes, y compris le mécanisme à l'origine de l'infection et de la formation de nodules, à savoir le dialogue moléculaire qui se produit entre la plante hôte et la bactérie symbiotique (Boivin *et al* , 1998).

De nombreuses molécules de petit poids moléculaire et matières organiques sont libérées par les racines, qui sont facilement décomposées par les micro-organismes, provoquant la formation d'un grand complexe microbien. Parmi les molécules sécrétées par les racines et participant à ce dialogue moléculaire permanent figurent :

#### ❖ Flavonoïdes

Ce sont des composés aromatiques et phénoliques sécrétés par les racines. Leur forme et leur fonction varient selon les stades de développement des plantes. 4000 types de flavonoïdes différents ont été identifiés dans les plantes vasculaires, mais seuls quelques-uns participent à la spécificité de cette symbiose. (Aoki *et al* , 2000), et ils se propagent passivement à travers la membrane bactérienne afin de susciter les signaux initiaux de l'hôte qui conduisent à l'expression de Nod dans les bactéries (Soussou , 2013). Sa production est limitée uniquement à la zone racinaire, qui est le site de développement des nodules (Broughton *et al* , 2000).

---

### ❖ Facteur Nod

Les flavonoïdes et les peptines sont des stimulants végétaux qui activent les protéines régulatrices de NodD, stimulent l'expression de gènes de structure et provoquent la production et la formation de signaux extracellulaires bactériens ou facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans l'apparition de symbiose, d'infection et de formation de nodules (**Boivin *et al* , 1998**).

### ❖ Autres substances

Il existe un autre ensemble de molécules impliquées dans la signalisation partielle de cette symbiose, nécessaire à la formation ultérieure d'organes nodulaires et au développement de fils d'infection, Parmi ce dernier, les polysaccharides extracellulaires, les lipopolysaccharides, les K- antigènes, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (**Broughton *et al* , 2000; Terefework , 2002**).

## 2-3-2- Processus de nodulation

### 2-3-2-1- Pré-échange de signal

Avant le processus de formation des nodules, un échange de signaux se produit entre la plante et la bactérie, et cela se produit en cas de manque d'ions ammonium (NH), où la plante produit des molécules de signalisation à partir des racines, qui sont des flavonoïdes (**Patriarca *et al* , 2004**). Une fois ces signaux perçus par les bactéries symbiotiques, ils stimulent l'expression de gènes codant pour des enzymes permettant de synthétiser des facteurs Nod LCO ou des lipochitino-oligosaccharides (**Dénarié , 2000**).

Les bactéries sont attirées par les racines de la plante hôte, ce qui implique une chimiotaxie positive (**Hopkins , 2003**), Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (**Patriarca *et al* , 2004**). Les rhizobiums différent dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un deuxième niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (**Moschetii *et al* , 2005**).

### 2-3-2-2-L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (**Perry *et al* , 2004**).

---

Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (**Dupuy et Nougier , 2005**), Le Rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (**Bélangier , 1998**).

---

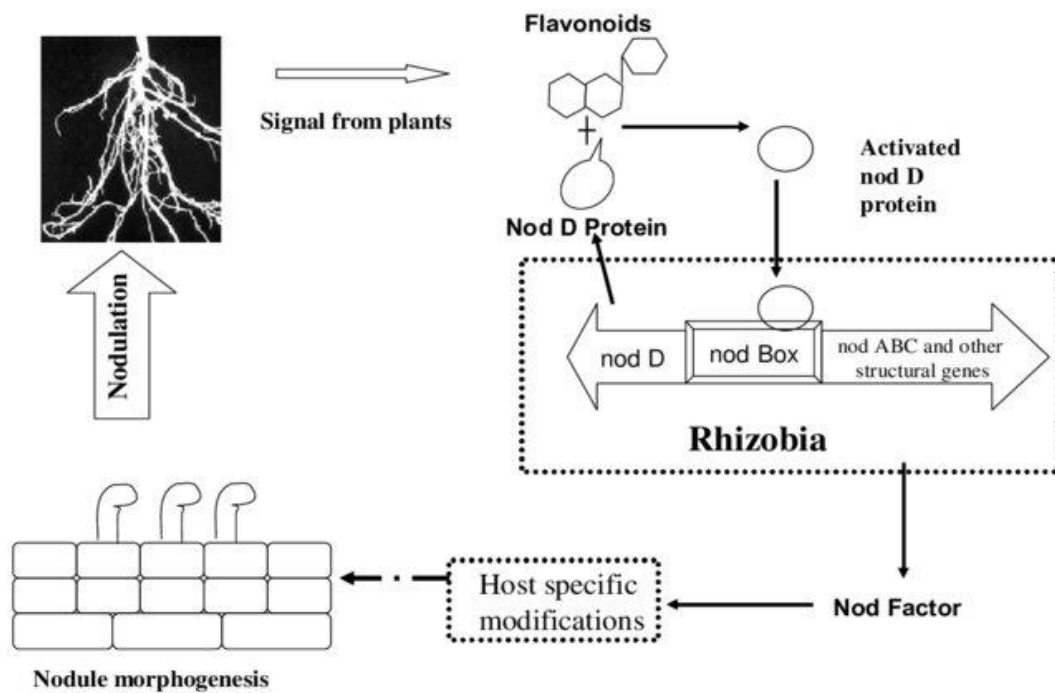
### 2-3-2-3-Développement du nodule et maturation du bactéroïde

Les fils d'infection sont formés par la convergence des vésicules de Golgi vers le point de contact pour former une corde amorphe contenant des matières muqueuses délimitées par des fibres de cellulose d'origine végétale (**Dupuy et Nougier , 2005**). Le rôle de ces cordes est complété dans la liaison des cellules épidermiques. Les cellules du cortex, à partir desquelles sont formés les organes, qui conduisent à la formation de nodules (**Bélangier , 1998**), Les cordons infectieux envahissent presque toute la racine et se ramifient lorsqu'ils atteignent la zone des cellules corticales. Cette zone réagit en augmentant en taille et également par la prolifération cellulaire, qui est activée par la libération de cytokinines bactériennes (**Heller et al , 1989**).

Au stade final de la formation des nodules et de la libération des bactéries des cordons infectieux dans les cellules corticales, s'ensuit la division des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote appelées bactéries (**Machrafi , 2001**) . La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (**Perry et al , 2004**), Elle protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (**Bélangier , 1998**), Les bactéroïdes ne sont pas épars dans le cytoplasme, mais enfermés dans des vésicules au nombre de 6 à 8 bactéroïdes par vésicule chez le soja et le haricot, un seul chez le trèfle (**Heller et al , 1989**).

La transition vers l'état symbiotique s'accompagne d'une forte répression des gènes métaboliques basaux et d'une surexpression des symbiotes dans la fixation et l'assimilation de l'azote (**Becker et al , 2004**), Les cellules bactériennes au repos sont rares en leur présence et se trouvent en petites quantités Ce sont elles qui ont la forme de bâtonnets dans les nodules et sont celles qui survivent et après la mort de la plante , elles se multiplient même dans le sol ,dans lequel elles se trouvent et elles se multiplient ,peut toujours provoquer une infection des racines de la plante qui se trouvent dans la zone dans laquelle elles se trouvent ou à proximité (**Perry et al , 2004**).

Le centre du nodule est entouré de faisceaux de connexion dans lesquels le xylème est externe et le phloème est interne, tandis que cette disposition se reflète dans la structure normale des racines (**Dupay et Nougier , 2005**) . Les nodules utilisent la majeure partie de l'ammonium provenant de la fixation symbiotique de l'azote pour synthétiser des acides aminés, qui passent ensuite au système tige via le xylème (**cone et francoise , 2006**).



**Figure 03 :** processus de nodulation (Kamboj *et al* , 2008).

### 2-3-3-Régulation du nombre des nodules

Un dialogue s'établit grâce à des signaux moléculaires entre le microsymbiote et la plante hôte à la suite duquel des nodules se forment. Le processus de symbiose est contrôlé par un mécanisme d'autorégulation qui contrôle le nombre de nodules et conserve l'azote grâce à la signalisation à distance (Caetano-Anolles *et al* , 1991).

Après l'inoculation, des nodules se forment dans des zones spécifiques de la racine et à mesure que le système racinaire se développe l'infection peut se propager à d'autres zones. Une fois que les nodules acquièrent leur fonction la croissance des nodules dans d'autres parties jeunes est inhibée. Cela permet aux plantes de contrôler le nombre de nodules et de maintenir un certain équilibre : bénéfique (fixation d'azote) / coût (ressources en carbone) (Stacey *et al* , 2006).

Le processus d'autorégulation des plantes se produit grâce à des signaux moléculaires provenant de la racine et de la tige, et les hormones végétales jouent un rôle important dans cette régulation, comme l'acide abscissique produit au niveau de la tige (Oka-Kira et Kawaguchi 2006).

### 3- Facteurs influençant la symbiose Rhizobium- légumineuses

---

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols et Les interactions fréquentes entre ces différentes contraintes affectent la croissance et la capacité de survie des micro-organismes sont le déficit hydrique, la salinité, les températures élevées, les pH extrêmes et les carences en éléments nutritionnels (**Cacciari et al , 1998**).

### **3-1- Stress thermique**

Selon **El-Hillali (2006)**, la température idéale pour la reproduction des rhizobiums se situe entre 28°C et 30 °C, et ils sont généralement incapables de croître et de se reproduire à une température de 37 °C. Il existe des souches de *Rhizobia* capables de s'adapter à des températures élevées allant jusqu'à 45 C°, mais elles deviennent non infectieuses en raison de la perte de leurs plasmides symbiotiques.

La température entraîne un retard sur la formation des nodules ou leur formation dans la partie profonde du sol à des températures plus basses (**Domergue , 2006**), ainsi que sur la différenciation des bactéries au sein des nodules, sur la structure et même sur la fonction des nodules, la survie des rhizomes dans le sol, le nombre de nodules formés et la fixation de l'azote (**Graham , 1992**)

### **3-2- Stress hydrique**

Un effet évident de la sécheresse apparaît sur la quantité d'azote fixé et sur le nombre de nodules, car la formation et la fonction des nodules sont très sensibles à ce facteur du métabolisme général de la racine et de la tige (**Domergue , 2006**).

La carence en eau affecte la fonction et la structure des nodules, qui résulte de la modification des barrières à la diffusion d'oxygène «L'excès d'eau provoque une diminution de l'entrée d'oxygène et sa propagation vers les nodules (**Guy , 1987**) « En outre, cela affecte le processus de photosynthèse et réduit la quantité de substrat carboné nécessaire pour la respiration (**Torche , 2006**).

### **3-3- Effet du pH**

Un pH élevé provoque des perturbations dans la nutrition minérale, dues au manque de solubilité des éléments minéraux, ce qui entraîne un impact sur le développement de la plante hôte et, d'autre part, sur les performances et l'efficacité des rhizobiums, ce qui provoque une diminution de la formation de nodules (**Dhane Fitouri , 2011**).

D'autre part, le pH alcalin ou le sol alcalin a également un effet négatif à la fois sur les rhizobiums et sur la plante hôte en raison de la disponibilité de certains minéraux comme le fer et le magnésium (**Dhane Fitouri , 2011**).

---

Selon (**Bordeleau et Prévost , 1994**), le pH approprié pour les légumineuses est légèrement acide ou neutre pour assurer la formation d'une coexistence efficace entre les deux facteurs de symbiose car le pH extrême affecte négativement les deux partenaires de symbiose.

### **3-4- Stress salin**

Le principal facteur de détérioration du sol et le rendant impropre à l'agriculture est la salinité (**Saadallah et al , 2001**), qui affecte également directement la symbiose entre le rhizome et la plante hôte en inhibant le processus d'infection ainsi que la formation et le développement des nodules, et indirectement en réduisant la croissance des plantes l'hôte et la diminution de la teneur en azote total et l'effet sur certains de ses processus physiologiques .(**Zahran ; 1999 , César et al , 2011**) , les premières étapes de la nodulation sont plus sensibles au stress salin que plus tard (**Cordovilla et al , 1999 , Cesar et al , 2011**).

Le métabolisme de l'azote et la synthèse des protéines sont fortement affectés par le stress osmotique, qui influence les populations bactériennes dans les racines, la plante hôte et leur relation de mutualisme. La formation des nodosités est particulièrement sensible au stress osmotique en raison de la diminution des sites d'infection dans les racines, du nombre de poils racinaires et du pourcentage de ceux porteurs de fils d'infection. Une augmentation significative de l'épaisseur des couches corticales externe et interne des nodosités est observée chez le trèfle. En revanche, les cellules non infectées contiennent une quantité considérable d'amyloplast, tandis que les nodosités formées en présence du stress osmotique en sont totalement dépourvues d'amyloplast (**L'Taief , 2009**).

La réduction de la salinité affecte partiellement l'activité bactérienne et la formation des nodules en réduisant leur disponibilité en oxygène, ce qui empêche la fixation de l'azote symbiotique (**Saadallah et al , 2001**). Il est connu qu'il existe des souches de bactéries rhizobiennes qui tolèrent des concentrations de sel supérieures à 400 mm, tandis que certaines souches sont incapables de fonctionner lorsque la concentration de sel atteint 100 mm (**Domergue , 2006**).

### **3-5- Autres facteurs**

L'azote minéral, présent dans le sol, représente une relation négative avec l'azote fixé de l'atmosphère en raison de la symbiose entre les rhizomes et les légumineuses, car il représente un facteur inhibiteur pour la fixation biologique de l'azote atmosphérique, la synthèse de la

---

nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates, à un certain degré, dans le sol (**Pietsch *et al* , 2007**).

Le sol présente d'autres facteurs qui peuvent également affecter la symbiose et la fixation de l'azote atmosphérique. La nature du sol et les nutriments qu'il contient affectent l'efficacité de cette activité symbiotique (**Bado *et al* , 2002**). Il existe de faibles concentrations de malate et de les succinates qui agissent pour stimuler la fixation de l'azote, y compris des concentrations présentes comme modestes, telles que les acides dicarboxyliques, agissent pour inhiber la fixation de l'azote, en plus du fait qu'une carence en phosphore limite sévèrement l'efficacité de l'activité symbiotique et la formation de nodules (**Prell et Poole , 2006**).

#### **4- Intérêt des bactéries nodulants en agriculture**

La fixation symbiotique de l'azote est une préoccupation majeure pour les chercheurs dans le domaine agricole, où environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixées chaque année. En revanche, environ 40 millions de tonnes d'engrais azotés sont utilisées annuellement pour l'agriculture. Grâce à ces bactéries symbiotiques, les plantes disposent d'une source durable d'azote (**Lévêque et Monoulou , 2001**).

En outre, il permet de préserver le sol et sa fertilité ainsi que d'améliorer la santé et la productivité des plantes, conduisant à une production agricole durable grâce à la réduction du besoin d'utiliser des engrais azotés manufacturés (**Belhadi *et al* , 2018**).

Cette relation symbiotique entre bactéries et légumineuses étant très spécifique, la sélection et l'étude de ces bactéries à des fins agricoles revêtent aujourd'hui une grande importance. Les biotechnologues et les chercheurs travaillent à la préparation du vaccin qui consiste à introduire des souches de *Rhizobium* dans le sol des plantes agricoles et écosystème, qui aide la plante à croître et améliore sa composition et son aération de la sol, ainsi que sa capacité à améliorer la capacité de la plante à résister à diverses conditions environnementales telles que la salinité et la carence en azote... De plus, la préparation d'un bon vaccin utilisant des souches de *rhizobia* doit être très efficace sur le terrain. Il doit avoir une spécificité élevée afin de pouvoir rivaliser dans la formation de nodules et d'améliorer les performances de l'hôte (**Baraibar , 2000**).

# *Partie pratique*



# I- Materiel Et Methode

## 1-Présentation de la zone d'étude (El Oued)

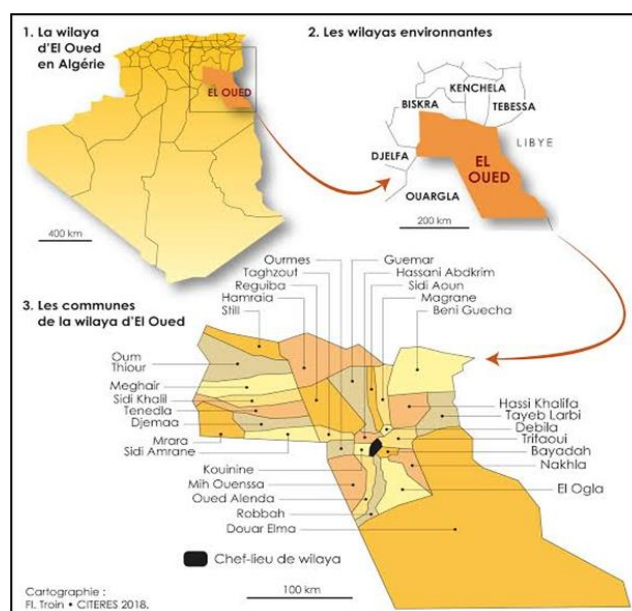
### 1-1-Situation géographique

La wilaya d'El Oued, l'une de principales oasis du Sahara septentrional algérien. Elle est située au sud-est de l'Algérie, à une distance de 650 km de la capitale, au nord-est du Sahara septentrional. Elle occupe une superficie de 44.586 km<sup>2</sup>, la wilaya d'el oued est située au sud-est du pays et partage ses frontières avec les régions suivantes :

- Au nord, elle est bordée par la wilaya de kenchela.
- Au nord, elle est limitrophe de la wilaya de de Tébessa.
- Au nord-ouest, elle est adjacente à la wilaya d'al-mughayir.
- A l'ouest, elle est bordée par la wilaya de Touggourt.
- Au sud-ouest, elle est limitrophe de la wilaya de Ouargla.
- A l'est, elle partage une frontière de 260 kilomètres avec la république Tunisienne (**Monographie , 2021**).

Traditionnellement, les limites des oasis du Souf sont l'erg oriental jusqu'aux abords du Chott Melghir, où s'étire une masse de palmeraies limitée à l'Est par la frontière tunisienne et à l'ouest par l'immense oasis de l'Oued Righ. Les limites de cette oasis atteignent la frontière libyenne au sud (**VOISIN , 2004**).

Cette région se trouve à une altitude moyenne de 80 m, accusant ainsi une diminution notable du sud au nord pour être à 25 m au-dessous du niveau de la mer dans le chott Melghir qui occupe le fond de l'immense bassin du Bas Sahara. Elle possède des dunes qui dépassent parfois les 100 m de hauteur (**A.N.R.H. , 2009**).



**Figure 04** :situation géographique de la région de d'El Oued ( **Cartographie , 2018**)

## 1-2- Caractérisation climatique

**Tableau 03** : données climatiques de la wilaya d'El-oued des années (2019-2023) (Station météorologique en Guemar 2024)

Année	T (°C)	P (mm)	H (%)	V (m/s)
2019	23.58	1.41	38.08	3.5
2020	30.41	0.91	46.44	3.25
2021	23.41	2	37.75	3.58
2022	23.58	1.41	38.08	3.5
2023	23.25	2.25	38.83	3.33

**T** : Température moyenne annuelle (°C), **P** : Précipitation moyenne annuelle (mm), **H** : Humidité moyenne annuelle (%), **V** : Vitesse moyenne annuelle du vent (m/s).

### ❖ Température

Représente un facteur limitant de toute première importance car elle contrôle l'ensemble des phénomènes métaboliques (**RAMADE , 2003**). La région d'El Oued est connue pour son climat avec des températures très élevées en été au mois de Juin, Juillet, Août, alors qu'elles sont basses en hiver au mois de Décembre, Janvier.

Nous avons également remarqué à travers les statistiques que la moyenne la température en 2020 est élevée Depuis 5 ans, et avec des moyennes presque égales au fil des années (2019-2022-2021-2023).

### ❖ Les précipitations

C'est l'ensemble de particules de liquide ou solide qui tombent en chute libre dans l'atmosphère (sous forme des pluies, neige, grêle) (**CLEMENT , 1981**). Les précipitations de la région de El Oued saisonnière est extrêmement variable, arrivent a leur maximum en automne, qu'autre période pluviale d'hiver (**VOISIN , 2004**) Cette région a également connu une pluviométrie moyenne au cours des années 2021-2023, d'environ 2 (mm) supérieure à celle des années 2019- 2022 et Nous avons également assisté à une diminution très significative au cours de l'année 2019 puisque la précipitation moyenne au cours de cette année était de 0,91 (mm).

### ❖ L'humidité

Par définition c'est le pourcentage de vapeur d'eau présente dans l'air car elle maintient un certain pourcentage de la quantité d'eau en raison de plusieurs facteurs, notamment les précipitations d'eau, la forme des précipitations, le nombre de jours de précipitations, ainsi que la température (**FAURIE *et al* , 1980**). La région de la vallée est connue pour sa plus grande humidité en hiver et au printemps, et l'humidité moyenne varie d'un mois à l'autre et d'une année à l'autre, car on constate qu'elle est à peu près égale au cours des cinq dernières années (2019 - 2023).

### ❖ Les vents

Sont fréquents et cycliques dans la région d'étude (**NADJAH , 1971**). Ils sont caractérisés par des directions dominantes variables en fonction des saisons. Les vents dominants sont qui sont de direction Est-Nord provenant des méditerranées chargés d'humidité appelés El-bahri, soufflent au printemps. Tandis ce que les vents du Siroco ou Chihili apparaissent pendant la période estivale venant de Sud ou Sud-Ouest (**HLISS , 2007**). La vitesse moyenne du vent au cours de l'année 2021 était de 3,58 m/s, et elle était semblable au cours des années 2019, 2020, 2022 et 2023.

### 1-3- Caractérisation pédologique

Le sol est la couche superficielle dans laquelle les plantes établissent leurs racines et dans laquelle elles peuvent croître et absorber de la nourriture et de l'eau. C'est une couche de petits fragments dont les propriétés ont changé à la suite de la décomposition des plantes et d'animaux.

Selon **Ali (2008)**, la nature des sols de la région EL-Oued est sableuse, avec de gros galets et de larges pores, ce qui le rend très perméable à l'eau. On y trouve quelques surfaces calcaires et pierreuses dans certaines zones.

## 2- Méthodologie du travail

### 2-1- Echantillonnage des plantes

Dans notre expérience d'étude, nous avons choisis deux espèces de la famille des fabaceae, pour collecter les leurs nodules racinaires. Les deux plantes appartiennent de deux zones écologiques différentes pour objectifs de comparer le comportement adaptatif des bactéries isolés. Les plantes sont présentées comme suit :

#### 2-1-1-Retama reatama

Elle appartient à la famille des fabacées, c'est une plante arbustive à fleurs. Se caractérise par :

1. **Fruit** : est une étroite gousse indéhissante de moins de 2cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines. Les graines contiennent de la cytosine, un alcaloïde toxique
2. **Feuilles** : sont très caduques, les inférieurs sont trifoliolés les supérieurs sont simples et unifoliées, elles sont minuscules, alternes et linéaires, qui ne demeurent en place que quelques jours.
3. **Tiges** : pouvant atteindre jusqu'à 3 mètres de long, caractérisés par un tronc trapu et court, portant de nombreux rameaux dense, arqués, flexibles et retombants, fortement sillonnés et peu feuillés, les jeunes arbustes sont soyeux d'un vert argenté à gris argenté.
4. **Fleurs** : unisexuées sont en petites grappes latérales, réparties sur de courts racèmes, avec petite calice bilabié, à lèvres supérieurs profondément bidentées, pétales à onglets plus ou moins soudés au tube staminal, étendard dressé avec 10 étamines monadelphes le couleur les fleurs *Retama raetam* blanches, la floraison est longue et précoce de la fin d'hiver à début printemps, selon le climat, elle peut s'étendre jusqu'au mois de mai.
5. **Racines** : le système racinaire est de type pivotant pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur (10 -25 m). Des racines adventives sont également présentes sur les rameaux et colonisent la surface des dunes.

On la trouve dans de nombreuses régions comme l'Afrique du Nord, le bassin méditerranéen et la péninsule arabique (**Bouredja et al , 2011**). En Algérie *Retama raetam* est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, El-oued (el- magren) Touggourt, au centre de la Kabylie, à l'est de Biskra, également à Ouargla.



**Figure 05** : représentation photographique de l'espèce *Retama raetam*. (**BELGOT et al , 2021**)

### 2-1-2-Vicia ervilia

Est une espèce de plantes dicotylédones de la famille de Fabaceae est une petite plante herbacée, annuelle, diploïde et une culture secondaire encore présente dans le bassin méditerranéen et en Asie du Sud-Ouest. Le principal producteur en est la Turquie «Même si elle était encore cultivée dans de nombreux pays méditerranéens au début du XXe siècle, d'autres cultures offrant une production plus importante et plus régulière l'ont ensuite remplacée Cependant, les graines de *V. ervilia* peuvent représenter une source utile de protéines pour l'alimentation humaine et animale *Vicia ervilia*, communément appelée ervil ou vesce amère. Outre les noms anglais, d'autres noms communs incluent : Kirsana (**Aletor and al , 1994**).

1. **Feuilles** : sans vrille ou avec une vrille simple, peu développée. Les feuilles, composées pennées, comptent de 4 à 20 paires de folioles mucronées, oblongues-linéaires, de 5 à 15 mm de long sur 1 à 4 mm de large, densément couvertes de poils apprimés. Elles portent à la base des stipules dentées, presque en forme de flèche.
2. **Fleurs** : Les inflorescences, portées par un pédoncule plus court que les feuilles, sont composées de 1 à 4 fleurs, longue de 6 à 12 mm, ont des sépales soudés dont les extrémités (dents), en forme d'arêtes, La corolle est blanchâtre, parfois avec des stries violettes.
3. **Tiges** : à tiges dressées ou ascendantes, ramifiées, pouvant atteindre de 20 à 50 cm de haut.
4. **Gousses** : Les gousses lomentacées (c'est-à-dire resserrées entre chaque graine), pendantes, de couleur jaune paille à maturité, mesurent de 15 à 30 mm de long sur 5 à 6 mm de large et comprennent 2 à 4 graines. Jusqu'à cinq gousses peuvent se développer à partir d'un même nœud, Celles-ci sont de couleur marron ou avec un motif noir.
5. **Racines** : dont les racines forment un réseau dense. C'est une herbe au port dressé, très ramifié.



**Figure 06** : Photo des différentes parties de la plante *Vicia ervilia* ( **Original** ).

## 2-2-Prélèvement et conservation des nodules

La collecte des nodules est réalisée selon la technique préconisée par **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**. La technique est résumée comme suit :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.
  - Manuellement, éliminer le sol lié aux racines sans toutefois endommager ou perdre les nodules.
  - Récupérer racine la plante et la mettre dans un sachet en plastique.
  - Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.
  - Au laboratoire et la partie racinaire est lavée soigneusement à l'eau courante.
  - Couper les nodules à 1-2 mm du site d'attache, puis sécher avec du papier absorbant de l'eau.
- Nous avons adopté la méthode de **Vincent (1970)**, pour la conservation des nodules pour une longue durée, où il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) anhydre qui permet une longue conservation (6 à 12 mois).
- La dessiccation est réalisée dans des tubes en verre ; chacun est rempli au  $\frac{3}{4}$  de son volume, par du  $\text{CaCl}_2$  anhydre recouvert d'une couche de coton et identifié par une étiquette (**figure 07**) de façon à mettre en évidence :
- ✓ Le nom de la plante (genre et espèce) ;
  - ✓ Le lieu du prélèvement ;
  - ✓ La date du prélèvement.



**Figure 07** : nodules et fractions des racines conservés ( **Original** ).

### 2-3-Réhydratation des nodules conservés

Les nodules conservés ont été réhydraté selon la méthode de (**Vincent 1970**). Les échantillons déjà conservés ont été humidifiés en les plaçant dans de l'eau distillée en les

laissant pendant 24 heures au réfrigérateur à 4 °C puis pendant une heure à température ambiante.



**Figure 08 : trempage des nodules et fractions des racines ( Original ).**

## **2-4-Isolement des souches bactériennes fixatrices d'azote**

### **2-4-1-Stérilisation des nodules**

Après l'humidification les nodules saines sont transférés dans un tube stérile et immergé dans de l'éthanol à 95 % pendant 5 à 10 secondes, puis rapidement transféré dans d'hypochlorite de sodium 3% pendant 3 minutes puis les nodules sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile.

Cette stérilisation superficielle des nodules vise à réduire Contamination des milieux de culture par des micro-organismes exogènes aux tissus superficiels de ces nodules. La stérilisation se fait sous une hotte à flux laminaire et un bec Bunsen.

### **2-4-2-Ecrasement des nodules**

Dans des tubes stériles, 4 à 5 nodules stériles sont écrasés dans quelques gouttes d'eau distillée stérile à l'aide d'une pince stérilisée par flambage au bec Bunsen et immersion dans un mélange de l'éthanol, d'hypochlorite de sodium et d'eau distillée stérile.



**Figure 09** : préparation des nodules (stérilisation et écrasement) ( **Original** ).

### 2-5-Préparation des milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des souches bactériennes fixatrices d'azote et pour réaliser une identification morphologique des isolats de colonies (forme, couleur, hauteur des colonies...). Les milieux de cultures suivantes sont préparés (**Annexe 01**):

- ✓ **Milieu liquide** : YMB (Yaset Manitol Broth)
- ✓ **Milieux solides** : YMA (Yaset Manitol Agar)
- ✓ **Milieux solides** : YMA +RC (Yaset Manitol Agar + Rouge congo)

### 2-6-Isolement des bactéries

Après l'écrasement des nodules et obtention de l'extrait laiteux (suspension), à l'aide d'un anneau de platine, des gouttes sont prélevées et étalées dans une boîte de Pétri selon la technique des quatre quadrants soit 1 ml de la suspension est prélevées et étalées sur toute la surface de la boîte de Pétri couler par milieu de culture YMA (**Vincent, 1970**).

Les boites sont scellées avec du Para film, puis incubées à une température comprise entre 28 et 37 °C pendant 48 à 72 heures.



**Figure 10** : isolement des bactéries( **Original** ).

## 2-7-Purification des bactéries

### 2-7-1-Sur YAM

Après avoir observé la croissance et le développement des bactéries dans la boîte de Pétri contenant l'YMA, et en fonction des caractéristiques morphologiques des différents colonies nous avons isolé les souches similaires dans des nouvelles boîte couler par l'YAM. Cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'isolats homogènes et purs

### 2-7-2-Sur YAM+ RC

Après avoir obtenu des isolats homogènes ou proches de l'homogénéité et afin de vérifier la pureté des isolats. Nous avons ensemencé les isolats obtenus sur milieu nutritif YMA supplémenté avec 0,0025% de rouge Congo (RC), en utilisant une anse de platine stérile suivant la technique des quatre quadrants. Les boîtes de Pétri sont hermétiquement fermée à l'aide du Parafilm et conservée à une température comprise entre 28 et 37 °C pendant 48 à 72 heures.

## 3- Caractérisation macroscopique

A l'aide d'une loupe binoculaire nous avons observé les colonies bactériennes sur les milieux de cultures YAM et YAM+RC, afin de préciser les caractéristiques morphologiques générale des colonies telle que : la couleur, la forme, la taille. etc.



**Figure 11** : observation des colonies bactériennes purifiées sur les milieux de cultures YAM et YAM+RC ( **Original** ).

## 4- Caractérisation microscopique

### 4-1-Coloration de gram

Après avoir obtenu des échantillons homogènes n'absorbant pas la couleur rouge Congo. La coloration de gram a été réalisée sur des lames pour observation microscopique selon la méthode préconisée (**Annexe 02**).

#### **4-2-Forme des souches**

Les lames colorées sont observées sous microscope optique à différents grossissement (X60 et X 100) en mettant une goutte d'huile de paraffine. Cette observation nous permet de préciser la forme des souches.



**Figure 12** : microscope optique utilisé pour l'observation des souches ( **Original** ).

#### **5- Conservation des souches**

Les souches caractérisées sont conservées dans 500  $\mu$ l glycérol à 60% et 500  $\mu$ l la suspension bactérienne en phase exponentielle . Le mélange a été homogénéisé et stocké a -20 C°.

#### **6- Test de Inoculation des souches isolées**

##### **6-1-Préparation des graines**

Les graines de luzerne (*Medicago sativa*) sont choisies pour la réalisation de ce test. Nous avons commencé par la stérilisation des graines de la manière suivante :

- Les graines ont d'abord été placées dans de l'eau distillée et bien agitées pendant quelques minutes avec une spatule puis filtrées.
- On place les graines dans de l'eau distillée stérilisée avec quelques gouttes d'hypochlorite de sodium pendant quelques minutes puis en les filtrant.

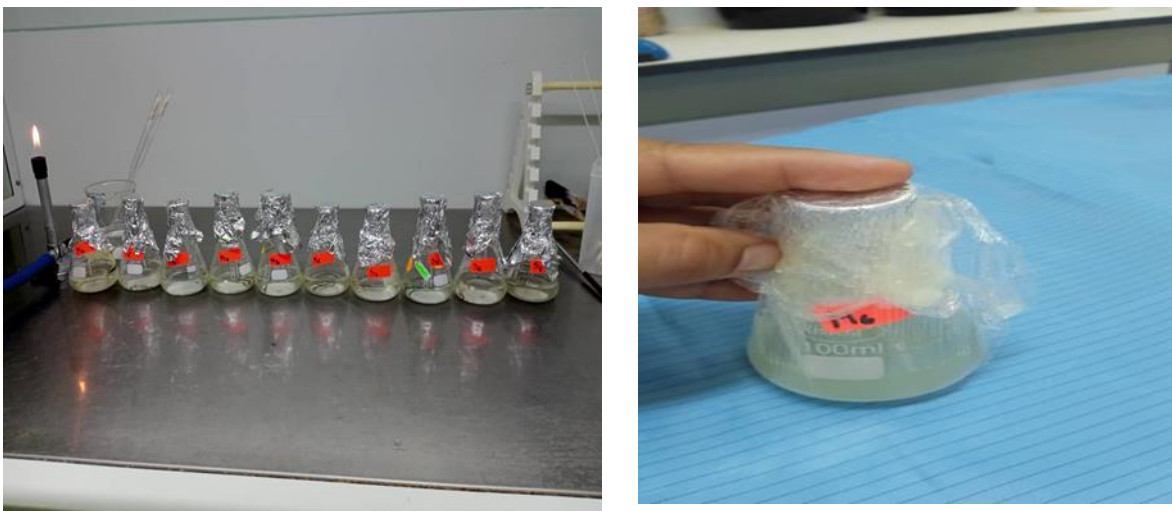
- Enfin, les graines sont rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer d'hypochlorite de sodium.
- Les graines ont mise à germer dans des boîtes de Pétri tapisser par deux papiers filtre.
- Une humidification avec l'eau distillée a été faite.



**Figure 13 :** préparation des graines pour la germination ( **Original** ).

### 6-2- Préparation d'inoculum bactérien

Les souches bactériennes conservées ont été remise en culture dans 100 ml de milieu YMB (**Annexe 01**) sous hotte et autour d'un bec benzène. Ces bactéries sont ensuite placées dans un incubateur agitateur pendant 48 h à température comprise entre 28 et 37 °C.



**Figure 14 :** méthode préparation d'inoculum bactérien ( **Original** ).

### 6-3-Inoculation des graines

Après germination, des graines uniformes ont été sélectionnées et inoculées pendant 01 heure avec 100 ml de milieu contenant l'inoculum préparé ultérieurement.

Les graines inoculées sont passées délicatement dans des bacs en plastique contenant du sable dunaire. Une irrigation quotidienne avec de l'eau distillée a été faite.



**Figure 15** : Le processus d'inoculation des graines dans une suspension bactérienne et de transport des plants inoculés jusqu'au site de plantation ( **Original** ).

### 6-4-Paramètres étudiés

#### 6-4-1-Le taux de survie

Le taux de survie correspond au nombre des plantes qui ont survécu en fin de l'essai.

#### 6-4-2-Mesures biométriques

##### 6-4-2-1-Longueurs des tiges et racines

A la fin de l'expérience, les longueurs des tiges et des racines des plantules sont mesurées à l'aide d'une règle gradué en cm.



**Figure 16** : mesures biométriques des plantules ( **Original** ).

##### 6-4-2-2- Poids frais et sec d'une plante

Après la croissance des plants et à la fin de l'expérience, après 20 jours de vie végétale, le poids frais et sec a été mesuré avec une balance sensible en mg.



**Figure 17** : mesures du poids frais et sec des plantules ( **Original** ).

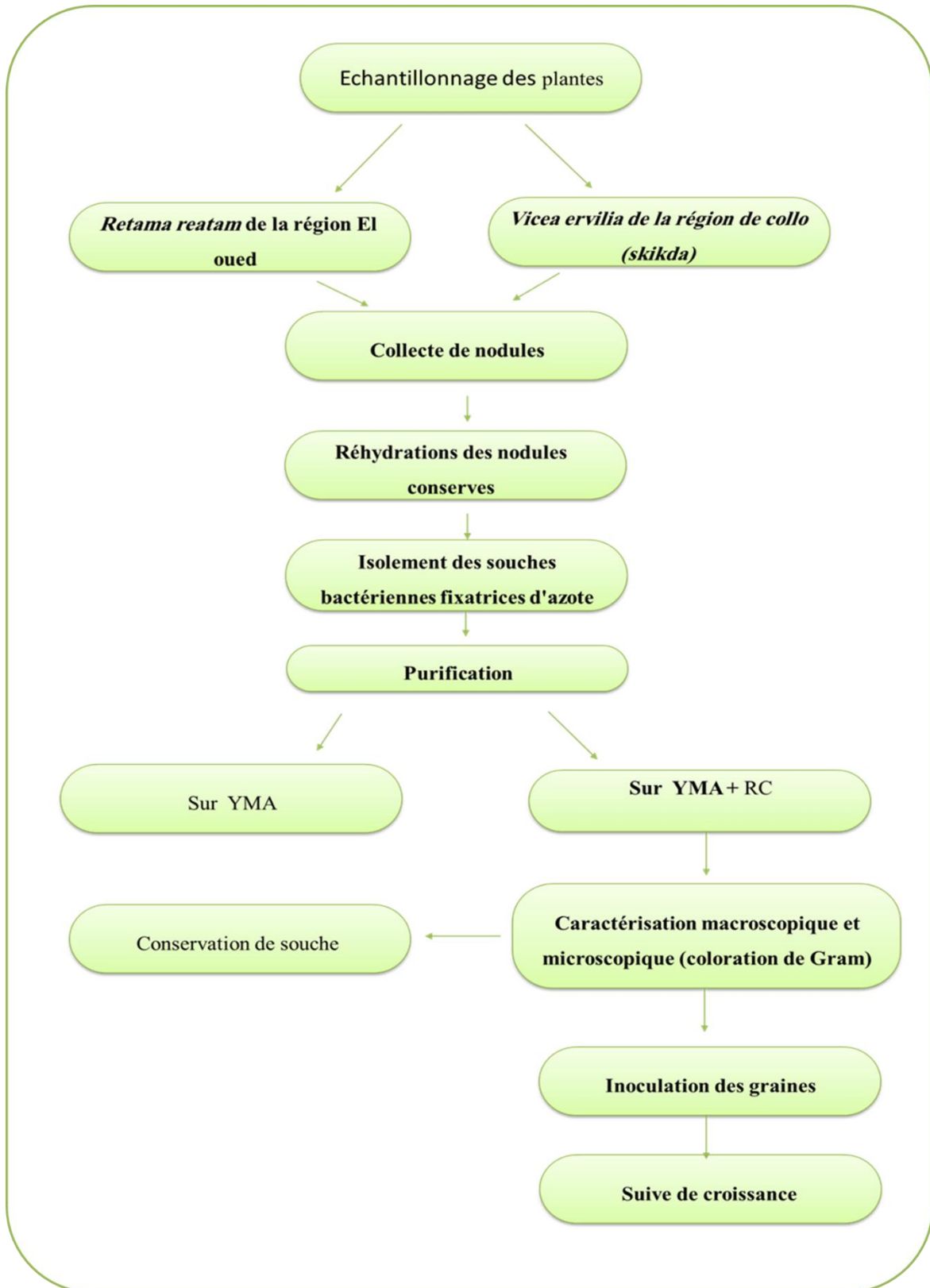


Figure 18 : Schéma présentatif de la méthodologie du travail

## II- Résultats et Discussion

### 1-Résultats de l'isolement des bactéries des nodules racinaires

#### 1-1-Observations macroscopiques

Les résultats de l'isolement sur milieu de culture sélectifs pour les bactéries fixatrices d'azote « YMA » ont permis d'obtenir différents types de colonie depuis les nodules des deux plante (**Tableau04**) :

Pour les nodules de l'espèce saharienne *R. reatam*, 06 colonie ont été obtenues au cours de cette étude. On a remarqué que la colonie codée par M2 et M4 ont des formes similaires (Petit, circulaire régulière) et avec différentes couleurs où M2 apparaît avec une couleur blanche et un aspect transparent, alors que M4 : avec une couleur blanche mat.

Les colonies M5 et M6 ont des formes grandes et irrégulières et M5 en couleur blanc mat, M6 blanche transparent successivement.

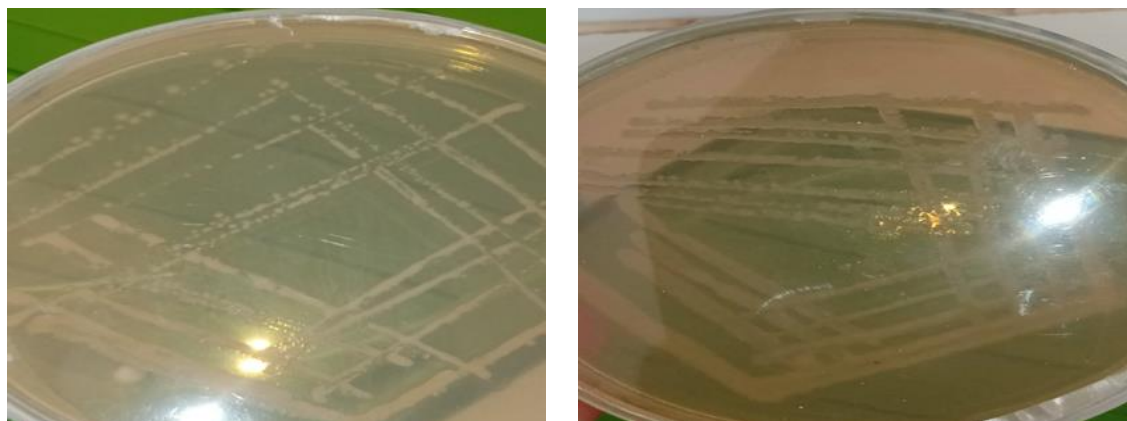
La colonie M1 a une taille moyenne et une forme circulaire et régulière et un couleur blanc mat. Tandis que M3 a une forme ovale régulièrement et apparaît de la même couleur de M1. Ces deux colonies apparaissent complètement différentes aux autres colonies.

Pour les nodules de la deuxième plante *Vicia ervilia*, on a observé seulement 04 colonies : S3 et S4 apparaissent avec des tailles et des formes similaires (Grandes, irrégulières), mais de couleur différente (S3 : Blanche Mat, S4 : blanche transparent).

La colonie S1 a une taille moyenne, et une forme circulaire avec des contours régulière et une Blanche Mat. Alors que la colonie S2 apparaît comme : Petite, circulaire et régulière et blanche transparente.

**Tableau 04** : description morphologique des colonies sur YMA

Plantes	Code	Milieu de culture	Forme et taille de colonie	Couleur de colonie
<i>R. reatum</i>	M1	YMA	Moyenne, circulaire régulière	Blanche Mat
	M2	YMA	Petite, circulaire régulière	Blanche transparent
	M3	YMA	Moyenne, ovale régulière	Blanche Mat
	M4	YMA	Petite, circulaire régulière	Blanche Mat
	M5	YMA	Grande, irrégulière	Blanche Mat
	M6	YMA	Grande, irrégulière	Blanche avec un petit de gris
<i>Vicia ervilia</i>	S1	YMA	Moyenne, circulaire régulière	Blanche Mat
	S2	YMA	Petite, circulaire régulière	Blanche transparent
	S3	YMA	Grande, irrégulière	Blanche Mat
	S4	YMA	Grande, irrégulière	Blanche avec un petit de gris



**Figure 19** : photos des colonies bactériennes isoler sur YMA ( **Original** ).

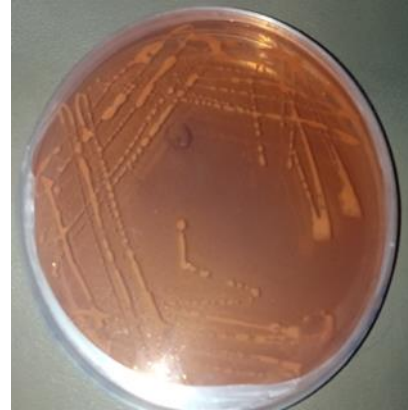
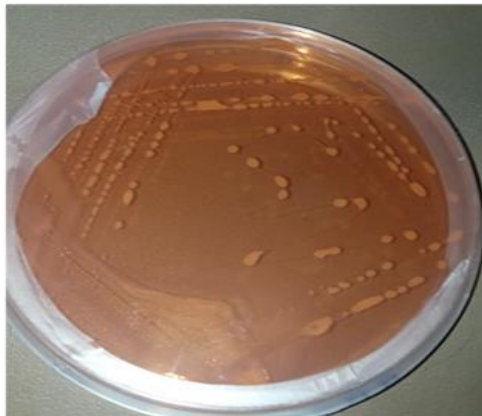
Après des purifications successives des colonies bactériennes sur milieu de culture YMA. Les souches purifiées ont été repiqué sur milieu de culture solide YAM+RC.

Les résultats de l'isolement sur YMA + RC est présenté au tableau (05) ci-dessous, nous avons observé les mêmes aspects des colonies, quelque-soit la forme, la taille et même la couleur. Ce qui signifie qu'elles n'ont pas absorbé de RC, à l'exception des deux colonies : M1 extrait de la plante *Retama reatam*, ainsi que S1 obtenu à partir de la plante *Vicia ervilia*, où nous avons remarqué qu'il présente un petit point rouge au milieu de ces deux colonies.

**Tableau 05** : description morphologique des colonies sur YMA+RC.

Plantes	Code	Milieu de culture	Taille et Forme de colonie	Couleur de colonie
<i>R reatam</i>	M1	YMA+RC	Moyen, circulaire régulière	Blanche à point rose
	M2	YMA+RC	Petite, circulaire régulière	Blanche Mat
	M3	YMA+RC	Moyen, ovale régulière	Blanche Mat
	M4	YMA+RC	Petite, circulaire régulière	Blanche Mat
	M5	YMA+RC	Grande	Blanche Mat

			irrégulière	
	M6	YMA+RC	Grande, irrégulière	Blanche avec un petit de gris
<i>Vicia ervilia</i>	S1	YMA+RC	Moyenne, circulaire régulière	Blanche à point rose
	S2	YMA+RC	Petite, circulaire régulière	Blanche
	S3	YMA+RC	Grande, irrégulière	Blanche
	S4	YMA+RC	Grande, irrégulière	Blanche avec un petit de gris



**Figure 20** : photos des colonies bactériennes isolés sur milieu de culture YMA+RC ( **Original** ).

## 2- Résultats des observations microscopiques

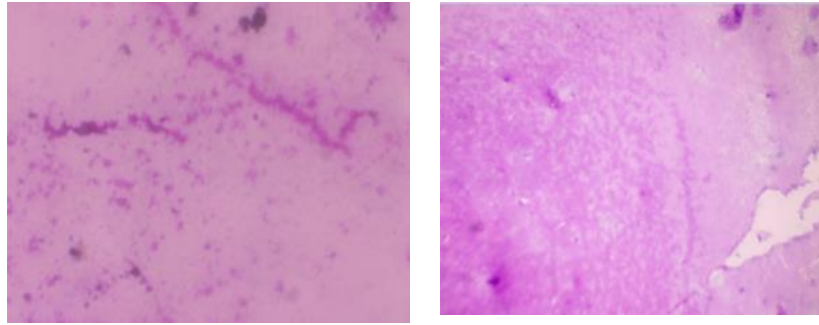
A partir de la purification réalisée sur les bactéries des nodules des deux plantes, 10 souches sont isolées. Dont 06 souches de *Retama reatam* et 04 souches de *Vicia ervilia*.

### 2-1- Coloration de Gram

Après avoir réalisé le test de coloration de Gram, qui vise à identifier le type de souche bactérienne (Gram positif ou Gram négatif), selon sa couleur après le test. Et après une observation microscopique à l'aide d'un microscope optique et avec des grossissements (X60 et X100), dix (10) souches prend une couleur rose, c'est-à-dire qu'ils sont Grams négatifs, comme il est montré au tableau suivant :

**Tableau 06** : résultats de coloration de Gram des souches isolées.

Plantes	Code	Coloration de Gram	
		Positif	Négatif
<i>R. reatam</i>	RR13P3M1		-
	RR13P4M2		-
	RR13P4M3		-
	RR13P4M4		-
	RR13P3M5		-
	RR13P3M6		-
<i>Vicia ervilia</i>	VE1P4S1		-
	VE1P4S2		-
	VE1P4S3		-
	VE1P4S4		-



**Figure 21** : coloration de Gram des souches isolées (100x) (Original).

### 2-2-Forme des souches

Après observation une observation microscope, deux types de formes ont été observé. Les souches codées par RR13P4M2, RR13P4M4, et RR13P3M6 isolé des nodules de *Retama reatam* ont la forme de bacille, alors que les souches RR13P3M1, RR13P4M3 ont une forme de coccobacille.

Les souches VE1P4S1 et VE1P4S3 isolées de la plante *Vicia ervilia*, présente des formes de coccobacille. Alors que les deux souches VE1P4S2 et VE1P4S4 ont une forme de bacille.

**Tableau 07** : description phénotypique des souches isolées.

Plantes	Code	Description
R. reatam	RR13P3M1	Coccobacille
	RR13P4M2	bacille
	RR13P4M3	Coccobacille
	RR13P4M4	bacille
	RR13P3M5	Coccobacille
	RR13P3M6	bacille
V.ervilia	VE1P4S1	bacille
	VE1P4S2	bacille
	VE1P4S3	Coccobacille
	VE1P4S4	bacille

### 3- Résultats de l'inoculation par les souches fixatrices d'azote

#### 3-1-Taux de survie

Le tableau (08) présente les résultats d'inoculation des graines de *Medicago sativa* par les souches fixatrices d'azote isolés des nodules racinaires des deux plantes. Les plantes inoculées avec des bactéries isolées de la plante saharienne *Retama reatam* ont montré un taux de germination de 100% à 81.50% plus élevé que les plantes inoculées avec des bactéries isolés de la plante *Vicia ervilia* (de 82.22% à 44.44%). On note également que le taux de survie est plus élevé au c'elle de contrôle.

**Tableau 08:** taux de survie des graines germés inoculés.

Souche	Nombre de grains semis	Après 20 jours de plantation	Taux de survie (%)
RR13P3M1	14	14	100%
RR13P4M2	14	12	85.81%
RR13P4M3	14	10	81.42%
RR13P4M4	14	12	85.81 %
RR13P3M5	14	12	85.81 %
RR13P3M6	14	10	81.42 %
VE1P4S1	18	14	77.77%
VE1P4S2	18	13	82.22%
VE1P4S3	18	8	44.44%
VE1P4S4	18	11	61.11%
Témoin	18	17	94.44%



**Figure 22 :** Photos de différentes plantules en phase de croissance inoculation par les souches bactériennes isolées de deux plantes étudiées ( **Original** ).

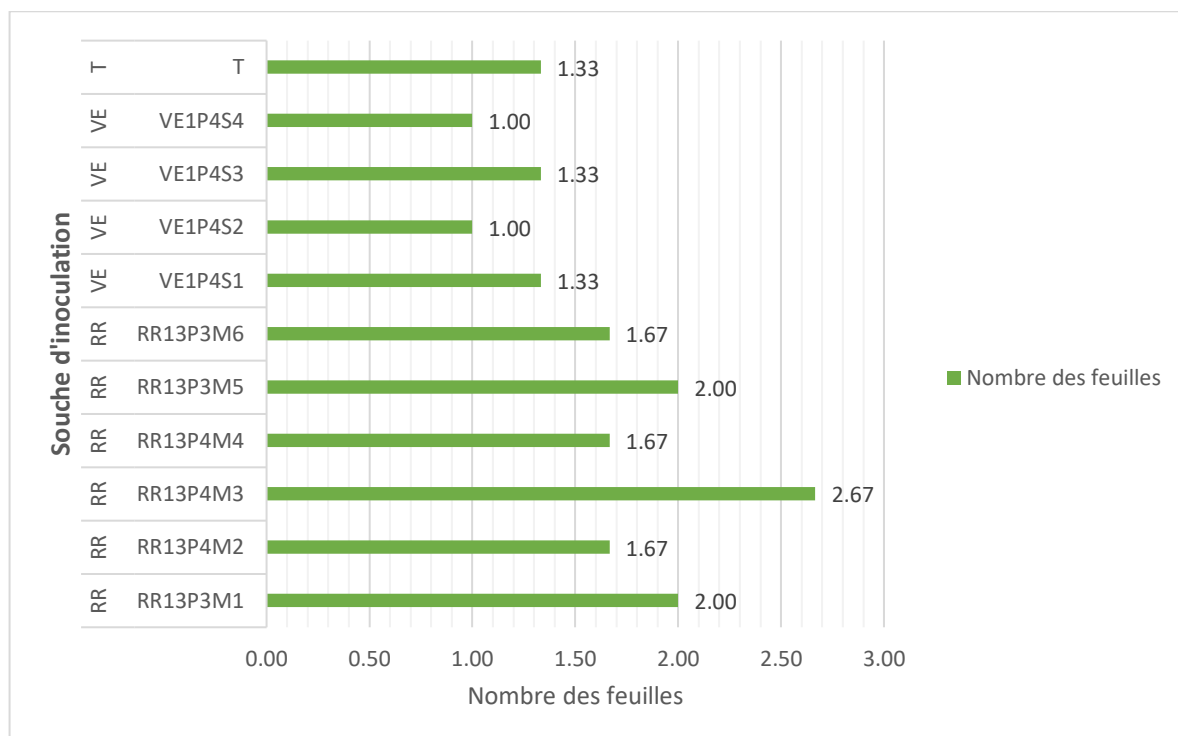
### 3-2-Paramètres biométriques

Après avoir réalisé l'expérience, nous avons prélevé trois échantillons de plants pour chaque type de souche inoculation et plusieurs mesures ont été effectuées sur ceux-ci, et les résultats ont été les suivants :

#### 3-2-1-Nombre des feuilles

En observant le nombre moyen de feuilles présentes dans ces plantes sélectionnées aléatoirement, on remarque que :

- Le nombre de feuilles des plantules inoculés avec des souches isolées de la plante de la saharienne *R. reatam* était supérieur à celui trouvé dans les deux témoins et bien supérieur à celui trouvé dans les plants inoculés avec des souches isolées de la plante *V. ervilia*.
- Les feuilles moyennes des plants inoculés avec les souches isolées de la plante *R. reatam* variaient de (1,67 à 2,67), tandis que le plus grand nombre était de 2,67 pour la souche RR13P4M3, et en proportions égales pour RR13P3M1 et RR13P3M5 par 2, ainsi que pour RR13P3M6, RR13P4M4 et RR13P4M2 par 1.67 feuilles
- Quant aux plants inoculés avec des souches bactériennes isolées de la plante *V. ervilia* il varie de (1 à 1,33). Quant au témoin le nombre moyen de feuilles est proche du nombre de feuilles de plants inoculés avec les souches isolées de la plante *V. ervilia*.
- Nous en concluons que les souches isolées de la plante *R. reatam* ont provoqué un changement notable dans les plants inoculés avec celle-ci, comme une augmentation du nombre de feuilles.

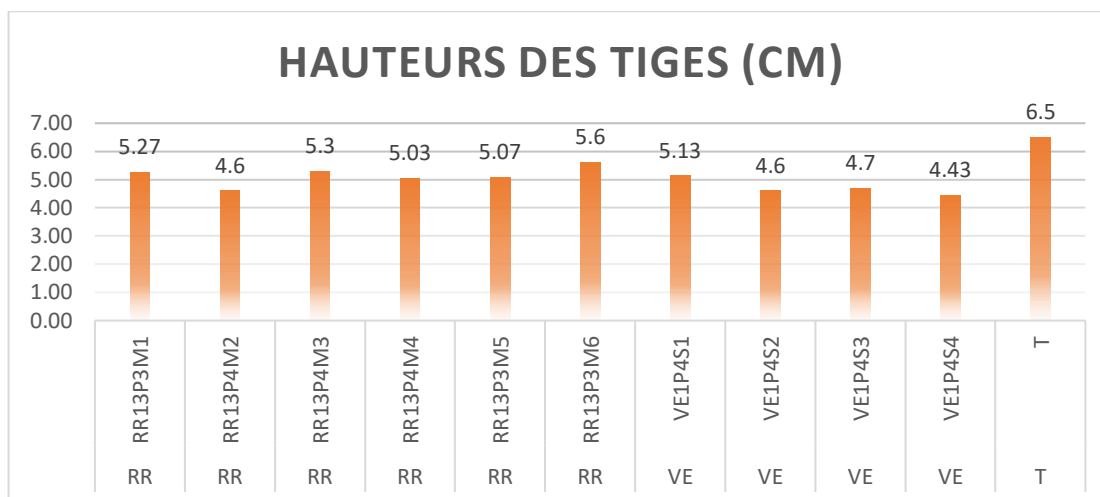


**Figure 23 :** nombre de feuilles de plantules inoculés avec différentes souches bactériennes

### 3-2-2-Hauteurs des tiges

Nous remarquons sur les graphiques à barres obtenus en mesurant la longueur moyenne des tiges pour chacun des trois plants échantillonnés inoculés avec différentes souches isolées des deux plantes étudiées que :

- Le plus grand pourcentage de longueur moyenne de tige se trouvait dans les plantules du témoin T, à une hauteur estimée à 6,5 cm, proche de celui des plantules inoculés avec les souches RR13P3M6 et RR13P3M1 isolées de *R. reatam*
- les longueurs moyennes des tiges du reste des plantules sont mesurées entre (4,6/5,3 cm)
- Quant aux plantules inoculés avec des souches isolées de la plante *V. ervilia*, le pourcentage le plus élevé de longueur moyenne de tige a été enregistré dans la souche VE3P4S1 à 5,13 cm, et une longueur plus faible, estimée à 4,6 cm, dans la souche VE1P4S2, et une longueur similaire de c'était dans chacun des plantules inoculés avec les deux souches VE1P4S3 et VE1P4S3.
- Nous concluons que le rapport de longueur des tiges n'a pas été affecté de manière significative par rapport au témoin pour les plantules inoculés par les souches de *R. reatam*. Cependant, cela a affecté négativement la longueur des tiges des plantules inoculés par les souches de *V. ervilia*.

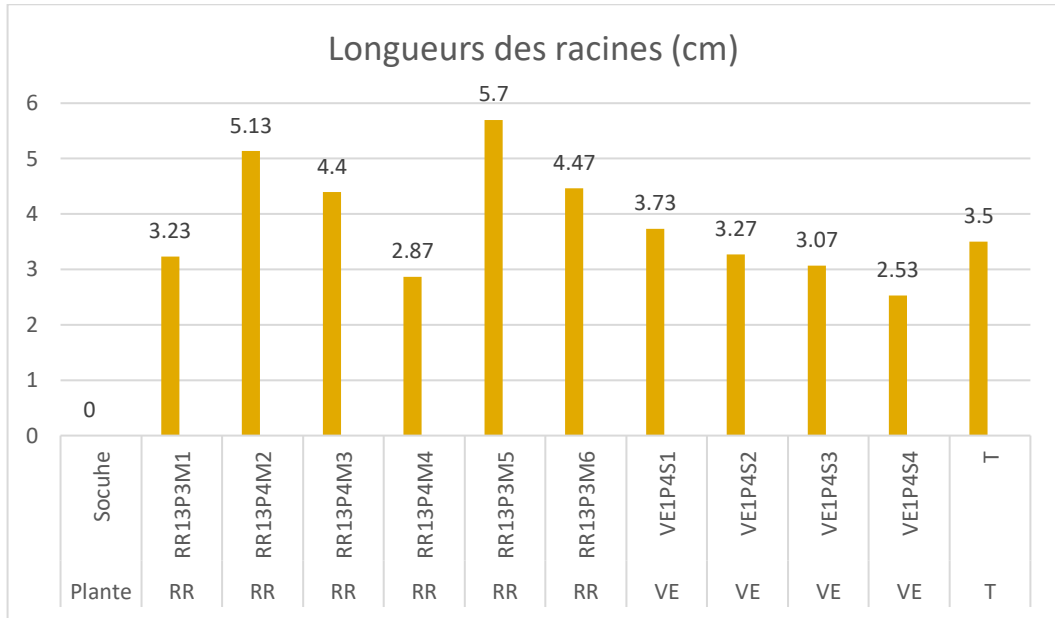


**Figure 24** : Image d'un graphique à barres montrant la hauteur de la tige de différents plants inoculés avec des bactéries

### 3-2-3-Longueurs des racines

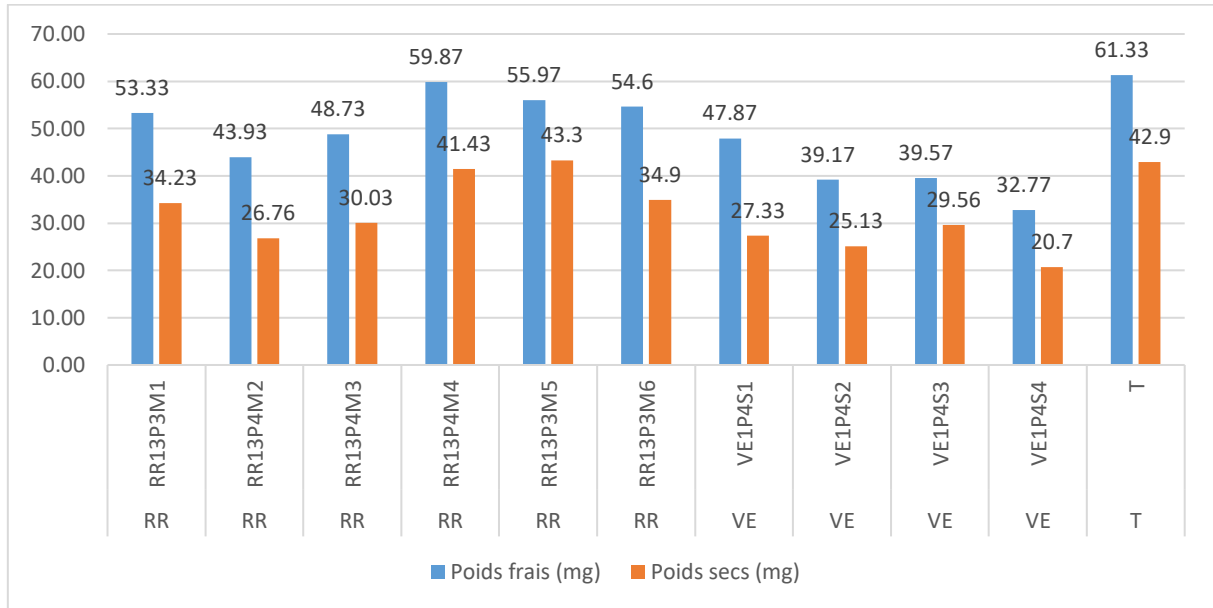
Nous remarquons à partir de ces résultats que la longueur des racines des plants inoculés avec des souches isolées de la plante *R. reatam* a été plus affectée que celle des plants inoculés avec des souches isolées de la plante *V. ervilia*, et dans certains plants, elle est plus grande que celle du témoin, comme :

- La longueur moyenne des racines des plantules RR13P3M5 était de 5,7cm. Une mesure similaire pour les plantules RR23P4M2 était de 5,13cm.
- Ainsi qu'un pourcentage similaire pour chacun des plantules RR13P4M3 avec un rapport de 4,4 cm, et RR13P3M6 avec un rapport de 4,47 cm, et le pourcentage le plus faible atteint 2,87 cm pour les plantules RR13P4M4.
- Quant à la plante *V. ervilia*, la longueur moyenne des racines était de 3,73 cm à VE1P4S1, et à un rythme similaire pour le reste des plantules VE1P4S2 (3,73 cm), VE1P4S3 (3,27 cm) et VE1P4S4 (2,53 cm).
- De ceci nous concluons que les souches isolées de la plante *Retam* RR13P4M2, RR13P4M3, RR13P3M5, RR13P3M6 ont eu un effet positif sur les racines de la plante hôte par rapport à la plante témoin, Nous avons également observé une grande ramification racinaire de tous les plantules inoculés avec les souches isolées de la plante *R. reatam*.



**Figure 25** : longueurs des racines de plantules inoculées avec différentes souches bactériennes.

3-2-4-Poids sec et frais



**Figure 26 :** poid frais et secs des plantules inoculées avec différentes souches bactériennes.

Les différentes plantules inoculées par les souches bactériennes ont montré des poids moins que celle de témoin, les mesures ont été enregistré après 20 jours de plantation. Les plantules inoculées par les souches de R.reatam ont montré une faible différence avec celle du témoin.

## 4- Discussion

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire du globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type *rhizobia* et les plantes de la famille des légumineuses (**De Faria et al , 1989**).

La formation de nodules est l'une des conditions fondamentales de la fixation de l'azote, car elle est considérée comme la zone de coexistence entre le rhizome et la plante hôte, mais cette fixation et cette formation de nodules sont affectées par plusieurs facteurs différents. Selon (**Brockwel et al , 1995**) la fixation potentielle de l'azote par les *Rhizobium* est limitée par des contraintes environnementales comme température, pH ... dont l'impact est parfois considérable sur la fixation de l'azote, cet impact peut affecte le processus nodulation et le nombre des nodules.

Ces contraintes sont de nature physique, chimique et biologique. Les facteurs limitants agissent à différent niveaux : ils peuvent affecter le microorganisme à l'état libre, le processus d'infection et le développement du nodule et le fonctionnement de la symbiose lorsque cette dernière a été établie. En outre, la plante joue un rôle dominant par rapport à la bactérie, de sorte que tout facteur affectant l'état physiologique de la plante retentit directement sur l'activité fixatrice de l'azote de la bactérie symbiotique.

A l'occasion de la Journée mondiale des sols, le Directeur général José Graziane da sila a déclaré à la FAO que les sols et les légumineuses représentent un modèle unique de solidarité qui protège l'environnement, améliore la productivité et contribue à l'adaptation au changement climatique (**FAO.2021**).

Les plantes sahariennes sont connues comme étant parmi les plantes les plus importantes qui ont la capacité de s'adapter aux conditions de sécheresse et à d'autres facteurs dans des environnements désertiques difficiles. En effet, elles ont la particularité de pouvoir fixation biologique d'azote grâce à leur symbiotique avec le *Rhizobium* et change leur morphologie pour réduire la perte de quantité d'eau. Selon (**Bouafia et Boulaya 2022**), De nombreuses légumineuses se sont également parfaitement adaptées au manque d'humidité, et aux sables mouvant.

Les légumineuses dans les régions saharienne et à l'égard aux conditions édapho-climatiques défavorables du Sahara, requièrent une importance particulière en relation avec leurs capacités d'établir l'association avec les rhizobiums. Cette capacité leur confère des potentialités d'adaptation à mieux se développer sur des sols pauvres et dégradés (**Date , 2000**).

Bien que les plantes sahariennes vivent dans des conditions défavorables, elles ont la capacité de résister à ces conditions. La formation de nodules dans les légumineuses est affectée par des facteurs du sol tels que la température et le pH... Cependant, les sols de notre région sont connus pour leur niveau élevé de salinité, températures et pH, malgré ça les racines de la fabaceae *Retama reatam* contiennent des nodules fonctionnels.

Et à travers les résultats dans lesquels les caractéristiques morphologiques et culturelles ont été étudiées, et après culture dans le milieu spécifique au bactéries fixatrices d'azote, nous avons constaté que les bactéries isolées appartiennent au groupe des *Rhizobiums*, surtout après les avoir cultivées dans un milieu solide spécialité avec l'ajout de Congo Red YMA+ RC, sachant que les *Rhizobiums* n'absorbent pas ou absorbent faiblement le colorant rouge Congo.

Après coloration de Gram, les résultats ont montré qu'elles sont Gram négatives dans toutes les souches bactériennes isolées, ce qui signifie qu'il s'agit bien de bactéries fixatrices d'azote et qu'elles appartiennent aux *Rhizobiums*, qui présentent deux types de formes pour les souches qui en sont isolées (**coccobacille et bacille**).

Nous avons également remarqué que plante saharienne *R. reatam* possède de petits nodules et malgré cela, ils contiennent des bactéries symbiotiques qui fixent l'azote. Alors que la plante *Vicia ervilia* présente de nodules grands très clairs de couleur rose.

L'utilisation des *Rhizobium* en agriculture est principalement réalisée via l'inoculation des semences. Les agriculteurs peuvent traiter les graines des légumineuses avec des cultures pures de *Rhizobium*, ce qui permet d'assurer une colonisation rapide et efficace des racines par ces bactéries symbiotiques. Cette pratique est courante dans les cultures commerciales de légumineuses car elle permet de réduire ou même d'éliminer le besoin d'engrais azotés synthétiques, ce qui peut réduire les coûts de production et avoir des avantages environnementaux en limitant la pollution par les nitrates.

En plus de la fixation de l'azote, les *Rhizobium* peuvent également améliorer la structure du sol et favoriser la santé des plantes en stimulant leur croissance et en renforçant leur résistance aux maladies. En résumé, l'utilisation des *Rhizobium* en agriculture contribue à une gestion plus durable des ressources et à des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement.

# *Conclusion*

L'objectif de notre travail est l'isolement des souches bactériennes fixatrices d'azote des nodules racinaires d'une fabacée spontanées sahariennes et d'une autre plante récoltée d'une région subhumide.

Six (06) souches bactériennes fixatrices d'azotes ont été isolées et purifiées de l'espèce spontanée saharienne, alors que seulement 04 souches ont été isolées de la plante de la région subhumide.

L'aptitude de fixation de l'azote atmosphérique des souches isolés a été confirmée par la culture sur un milieu sélectif ne contenant pas de l'azote. Les caractérisations phénotypiques des souches ont été réalisées par la coloration de gram et l'observation microscopique, les souches purifiées sont des grams négatifs et des formes différentes entre les bacilles, coccobacilles.

Les essais d'inoculation des graines de luzerne par les souches fixatrices d'azote, a montré des bonnes promotions des croissances des racines des plantules inoculées par les souches isolées de la plante saharienne.

L'utilisation des bactéries endophytes en agriculture peut se faire par le biais de diverses méthodes, notamment l'inoculation des semences. Ces bactéries d'une part, aident à l'amélioration et l'efficacité de l'absorption des nutriments par les plantes, endophytes peuvent contribuer à réduire la dépendance aux engrais chimiques, ce qui peut avoir des avantages économiques et environnementaux.

# *Références bibliographiques*

- **Ait Saada D., Ait Chabane O., Bouderoua K., Selselet-Attou G. (2016).** Place des légumes secs dans l'alimentation humaine – atouts nutritionnels et impacts sur la sante. Forum Régional pour le Développement des Légumineuses Alimentaires, Université de Mostaganem, Algérie, p5.
- **Aletor, V. A., Goodchild, A. V., & Abd El Moneim, A. M. (1994).** Nutritional and antinutritional characteristics of selected Vicia genotypes. *Animal Feed Science Technology*, 47, 125-139pp.
- **ANRH, (2009).** Agence Nationale des Ressources Hydrauliques. Direction Régionale SudOuargla. Rapports et compagne des mesures
- **Aoki, T., Hatanaka, Y., Look, D. C. (2000)** ZnO diode fabricated by excimer-laser doping. *Applied Physics Letters*, 76(22), 3257-3258.
- **Bado B V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse Doctorat. Université Laval, Québec.167p.
- **Baraibar A, (2000).** Rhizobium inoculants formulations, field performance and inoculation procedures.
- **Bélangier E. (1998).** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de Rhizobium sp. (Oxytropis Arctobla) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval. 155p.
- **BELGOT, K. SEROUTI, K. YAHIAOUI, A . (2021).** Effets Physiologiques De L'activité Allélochimique D'une Plante Sahariennes (Retama raetam) Sur Une Espèce Model (Zea mays). Distribution géographique et générale. Université Echahid Hamma LAKHDAR D'El Oued. EL- Oued. Faculte Des Sciences De La Nature Et De La Vie 17p.70pp
- **Boivin C, Lortet G, Larquin J, BA S, Méar N, Ferro M, de Lajudie P, Promé JC et Dreyfus B. (1998):** Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums application aux souches d'Acacia et de Sesbania du Sénégal. In *Acacia au Sénégal*. Edition: Orstom. France. pp. 378-386.
- **Bordeleau L M et D. Prevost. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*.161. pp. 115-124.
- **Broughton W J, Jabbouri Set Perret X. (2000).** Keys to Symbiotic Harmony *JournalofBacteriology*.182. 20. pp. 5641-5652.
- **Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991)** Plant Genetic Control of Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382.

- 
- **Campa C, Grignon C, Gueye M et Hamou S. (1998)** : L'Acacia au Sénégal. Edition : Orstom. 476p
  - Caratini R., 1984. Les plantes. Bordas, Paris. 3
  - **Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ, (2011).** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*. 5: 24-31.
  - **Chen W M, Laevens S, Lee TM, Coenye T, de Vos P, Mergeay M et Vandamme P. (2001).** *Ralstoniataiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *P. Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 51. pp.1729-35.
  - **CLEMENT J.M. (1981).** Larousse agricole. Ed. Montparnasse, Paris, 1207 P.
  - **Cordovilla MP, Ligerio F, Lluch C, (1999).** Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO<sub>3</sub> fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Science* 140:127-136.
  - **Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. (2006).** Legume comparative genomics: progress in phylonenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: p 99-103 . 4
  - **Herridge et al, (2016).** Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research. The legume-rhizobia symbiosis and assessing the need to inoculate, p18-19, pp 312
  - **Dénarié J. (2000).** Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier.
  - **Dhane Fitouri S. (2011).** Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L) et selection des souches rhizobiales efficaces. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de Tunisie. 149p.
  - **Domergue O. (2006).** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. p78.
  - **Duc, G ; Mignolet, C ; Carrouée, B ; & Huyghe, C. (2010).** Importance économique passée et présente des légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Innovations agronomiques*, 11, p1-24. 15
  - **Dupuy Y et Nougier P. (2005).** Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

- 
- **E. Cacciari, E. Di Mattia, P. Quatrini, M. C. Moscatelli, S. Grego, D. Lippi, M.R. de paolis. (1998).** Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress : page 183-184
  - **FAO. (2016),** Légumineuses : Des graines nutritives pour un avenir durable.
  - **FAO. (2021),** Les légumineuses et le Changement climatique (version révisée).
  - **FAURIE. C.FERRA.C. ET MEDORI. P. (1980).** Ecologie. Ed. Baillière, Paris, 168 p.
  - **Gage D J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol.*68 (2). pp. 280-300
  - **Graham PH. (1992).** Stress tolerance in Rhizobium and bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology.*38. pp. 475-484.
  - **Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*41. pp. 582-587
  - **Grama B S. (2006).** Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie.93p.
  - **Guignard J.L., Dupont F., (2005).** Botanique. 13ème Edition Masson. Sprent : p 164-179. 6- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist.*111. pp.607-619. 7
  - **Haukka K, Lindström K et Young PW. (1998).** Three Phylogenetic Groups of nodA and Nif H Genes in Sinorhizobium and Mesorhizobium Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol.*64 (2). pp. 419-426.
  - **Hopkins WG. (2003).** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. pp. 99-119.
  - **Jordan D C. (1984):** Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, pp. 234-245.

- 
- **Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. et Stevens P. (2001).** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Ed: de boeck. pp.415-418.  
11
  - **Lévêque C, Mounoulou J.C. (2001).** Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod , Paris.
  - **L'Taief B., Bouaziz S., Manasara Z.A., Hajji M. et Lachaal M. (2009).** Effet de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium* sp. et du régime des pluies sur la production et la teneur en azote du pois chiche. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (4).pp. 537- 544.
  - **Machrafi Y. (2001).** Inhibition de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.
  - **Madigan M et Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes. Edition: Person Education France. pp.599-601.
  - **Mahboub, A. (2018) Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les plantes légumineuses, Mémoire de Master, université 8 mai (1945).** Guelma . factuléé des sciences de la nature et de la vie .65p.
  - **Moschetii G, Peluso A L, Protopapa A, Anastasio M, Pepe O et Defez R. (2005).** Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP- 16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarium* biovar viciae. *Systematic and applied Microbiology.* 28.pp. 619-631.
  - **Moulin LA, Munive A, Dreyfus B et Boivin C- Masson. (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411.pp.948-50.
  - **NADJAH . A. (1971) .** Le Souf des oasis. Ed. maison livres, Alger, 174 p
  - **Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006)** Long-distance signaling to control root nodule number.*Current Opinion in Plant Biology* 9: 496-502.
  - **Patriarca E J, Tate R, Ferraioli S et Iaccarino M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Cyto.* 1234.pp.201-62.
  - **Pelmont J., (1995).** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541-572.
  - **Perry J J, staley JT et Lory S, (2004).** Microliologie. Edition Dunod, Paris.
  - **Pietsch G, Friedel J.K et Freyer B. (2007).** Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research.*102.pp.104-118.

- **Prell J et Poole P. (2006).**Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Trends in Microbiology.14 .4.
- **RAMADE . F . (2003) .** Eléments d'écologie-écologie fondamentale, Ed. Dunod. Paris, 690p
- **RavenP. H; Evert R. F. Et Eichlorn S. E ; (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris. 5
- **Rémond D. et Walrand S. (2017).** Les graines de légumineuses: caractéristiques nutritionnelles et effets sur la santé. Innovations Agronomiques, **INRA, (2017)**, p60.
- **Richter G. (1993).** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp. 341-352.
- **Saadallah K, Drevon J J et Abdelly C. (2001).** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolusvulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie.21.pp. 627-634.
- **Saoudi M. (2008).** Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.LP): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Canstantine. 99p.
- **Sobihi FZ. (2008).** Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. 121p.
- **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. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in legumeRhizobia technology. P.450.Springer-Verlag.new York.
- **Sprent, J.I ; (1995).** Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. Soil Biol. Biochem 27: 401-407. 2
- **Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, D May G (2006)** Genetics and functional genomics of legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology 9: 110–121.
- **Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C et Dreyfus B. (2001).** Methylophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbioses with legumes.J. Bacteriol. 183.pp. 214-220.

- 
- **Tahkoubit . A. (2018)** . Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin. Estimation des quantités d'azote fixé par différentes légumineuses cultivées .Université des Frères Mentouri Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie . p9 . pp59.
  - **Terefework Z. (2002)**. Diversity and phylogeny of *Rhizobiumgalegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis.Academic Dessertation in Microbiology. University of Helsinki.ISSN.pp 1239-9469.
  - **Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Shekhar Nautiyal C, Mittal S,Tripathi AK, Johri BN (2005)** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150.
  - **Torche A. (2006)**.Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse Magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri, Constantine, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, 166p.
  - **Tortora G.J, Funk BR, Case C L. (2003)**. Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique. Inc. pp. 826-830.
  - **Vincent JM (1970)** A manual for the practical study of root-nodule bacteria, IBP handbook, N° 75, Blackwells, Oxford
  - **VOISIN R, (2004)**. Le Souf monographie, Edit El Walid. 319p
  - **Wang ET and Martinez-Romero E. (2000)**. *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microb Ecol.* 40.pp.25-32.
  - **Werner, D, (1992)**. Symbiosis of plants and microbes. Chapman & Hall. Germany.Burton 1985.
  - **Wery J. (1985)**. Relation entre la nutrition azote et la production chez les légumineuses. In: nutrition azotée des légumineuses. Ed INRA, Paris. 213p.
  - **Young N.D., Mudge J., and Ellis T.H., (2003)**. Legume genomes: more than peas in a pod. *CurrOpin PlantBio* : 16, 199-204pp.
  - **Zahran, H.H., (1999)**. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), pp.968-989
  - **Mahnane W.** Appréciation de la diversité génétique du genre *Retama* par les marqueurs biochimiques. Thèse en biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université Mentouri Constantine. 2009-2010.

- **Sylvie M., (2011)** Etude phytochimique et évaluation biologique de derris Ferrugurée benth. (fabaceae).biochemistry danger, French.25-28 p.
- De Faria SM., Lewis GP., Sprent JL., Sutherland JM., 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. New phytologist, 111. 607-619 P.
- **Soussou, S. (2013)** Adaptation de la symbiose Fabacées-Rhizobium aux sites miniers: Absorption du zinc par Anthyllis vulneraria et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'Hedysarum coronarium (Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro). 135p
- **Belhadi, D., Philippe, D-L., Ramdani, N., Christine, L-R., Boulila, F., Pierre, T., Boulila, A., Benguedouard, A., Kacie, Y., Gisèle, L. (2018)** Vicia faba L in the Bejaia region of Algeria is nodulated by Rhizobium leguminosarum sv. viciae, Rhizobium laguerreae and two new genospecies. Systematic and Applied Microbiology. 41, 122-130.
- **Heller K, Merry R, and Mc Laughlin M. (1989).** Cadmium: a modern day problem. Rural Research.162.pp. 32-35
- **Come D et Françoise C. (2006).** Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes, Ed : Tec et Doc. Lavoisier.
- **Romero ,L ,(2000)** , Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia.Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland Oldroyd. 220 p.
- **Davent , S ,(1996)** , Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends in Plant Science 3, 473-478 p.
- **Beaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R., (2004).** Legume seed inoculation technology. Soil Biology & Biochemistry 36:1275-1288.
- **Guerroudj K, Benata H, Ourarhi M, Hanaa AM, Roger P, El Idrissi MM. (2009).** Diversité des Rhizobia qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc. Symposium international, Agriculture durable en région méditerranéenne. Rabat.Maroc.pp.376-379.
- **Kamboj A, Saluja AK. (2008).** Ageratum conyzoides L.: A review its phytochemical and pharmacological profile. Int. J. Green. Pharm., 2: 59-68
- **على ،أ،(2008).**جغرافة الزراعة .دار الفكر العربي.الجزائر
- <https://rattibha.com/thread/1512707975529615365> 17-03-2024
- <https://www.quora.com/Why> -should-soybean-be -inoculated-with-legume -bacteria-before-planting . 17-03-2024 . **Meaning of Life - Quora**



# *Annexes*

**ANNEXE 01****Milieux de culture et solutions utilisés****Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l. (Vincent, 1970)**

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
Mg SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

YMB	1000 ml
Agar	15
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

**Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l**

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

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

**ANNEXE 02****Coloration de Gram**

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

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

## ANNEXE 03

## Appareils outils et solutions utilisés dans l'expériences

Appareils	Outils	solutions
-Balance	-Bécher	-Mannitol
-Agitateur	-Ballon	-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
-Autoclave	-Pipette	-MgSO <sub>4</sub>
-Bain marie	-Papier aluminium	-Na CL
-Bec Benzène	-Boites de pétrie	-Extrait de levure
-Le hotte	-Spatule	-Eau distillé (stérilis)
-Spectro	-Tubes eppendorf	-Agar
-Microscopique	-Para film	-Rouge Congo
-la loupe	-Anse de platine	-Glycérol
	-Pince	-Eau de javel
	-Ciseaux	-éthanol
	-Gants	
	-Masque	
	-Papier transparent	
	-Lame et lamelle	
	-Paro matique.	