

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

**Par : MINATA Safa
AMMAR Hadjira**

Thème

**Évaluation du pouvoir de solubilisation des phosphates par
quelques isolats rhizobiens provenant de la région de Mansoura**

Soutenu publiquement le : 25/06/2018

Devant le jury :

M. BOURAS Nouredine	professeur	Univ. Ghardaïa	Président
M. KRAIMAT Mohamed.	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadreur
M	Maître Conférence B	Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire 2018/2017

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...?

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...?

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce mémoire :

À mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

À ma mère Mazouza qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau .ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.

À mon cher papa Boudjema qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Veuillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

À mes sœurs Nourellmane, Hassana et Nour el Houda et mes frères Abdelmounaim et Younes que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.

À toute ma famille et à la famille du BOUNIB et surtout la famille de mon futur mari MOUMAN

À mon binôme Ammar Hadjira

À mes chéries OULAD HADJ YOUCEF Om keltaum, HADJAJI Samira et MOUMAN Amine, Pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve.

A tous mes amis, j'adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide.



Minata

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie le fruit de ce modeste travail:

Aux êtres qui me sont les plus chers ABK ET FATNA

A mes très chers parents

Pour leurs sacrifice et qui m'ont donné le meilleur d'eux même, leurs patience et leurs précieux conseils pour me guider vers la voie de la réussite, je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi.

À mes très chers frères ; Mohammed lamine et Abdelhamid

À mes très chères sœurs; jojo, Hanane, Aicha et la petite Khaoula. À qui m'ont très chères et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leur vie.

À ma binôme SafaMinata et sa famille

À mes grands-parents cheikh Boubaker ABK, ZAIDI khaira ET Ammar Massoud, fadialaib

À mes cousines, cousins, oncles et tantes maternels et paternels de façon spéciale Sadek, Ikram, Hanane, mas souda,

À mes oiseaux de vie : lejine, Khalid et maloka.

À mon amie d'enfance: Leila ouladamrane.

À mes ami(e)s qui me connaissent, en particulier :fatoma, nadjota, samiha, bahria,khadija , khaola, zahia, soria, fati, fatima,halima, hafida,chiri,sori,somikazarofa,ftima,soso, abola, kltoum,khadoja , hanoda, bouchra, souhir , hafsa, nadjia, jiji, jimi, nono, wafa , mariem, feirouze, malika, yamina, rourou, hanane, zineb, chaima,imane, samira,wafa,sara,luiza,fatna,terkia,amal,rokii , iymo

AUX esprits des martyrs d'accident d'avion de Boufarik.

Tous mes collègues de biologie spécialement biochimie appliquée.

Tous mes amis qui ont contribué à la réussite de ce modeste travail.



Ammar

Remerciement

À Dieu le tout puissant, le Clément, le glorieux, le juste et le gracieux, qu' au terme de ce travail, on le remercier en tout premier lieu.

J' exprime ma profonde gratitude à Mr KRAIMAT .M pour sa contribution à ma formation durant de ce mois. Il a su m' accueillir et guider mes pas dans ce monde nouveau de la recherche. Je vous remercie pour vos critiques, conseils et leçons mais aussi pour votre humour encourageant.

Mes vifs remerciements s' adressent aux membres de jury, d' avoir accepté juger ce travaille.

J' adresse mes sincères remerciements aux membres du laboratoire de de microbiologie en université de Ghardaïa faculté de biologie.

Je remercie tout le corps enseignant et administrative de la Faculté des sciences de la nature et de vie et sciences de la Terre et de l' univers en particulier celui de chef de département.

J' exprime ma reconnaissance à tous les profs qui ont contribué ma cours scolaire. Spécifiquement à Mr Ben bekhti.Z pour son soutien en biochimie et sa disponibilité.

Je remercie toute ma famille et plus particulièrement ma mère pour son soutien, son encouragement et sa confiance.

À tous mes amis, j' adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide.



Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I	Classification simplifiée des bactéries symbiotiques des légumineuses	7
Tableau II	Effets de pH sur la croissance des isolats rhizobiens	21
Tableau III	Effet de NaCl sur la croissance des isolats rhizobiens	22

Liste des Figures

N°	Titre	Page
Figure 1	morphologie d'arachide	4
Figure 2	principales zones productrices d'arachide en algérien (2009)	5
Figure 3	Les Bactéries du genre <i>Rhizobium</i> vues au microscope électronique (x 1 000).	8
Figure 4	Schéma représentatif du cycle de phosphore	13
Figure 5	Transport du phosphate au niveau cellulaire	14
Figure 6	Localisation géographique de la région	17
Figure 7	ensemencement les souches bactériennes	18
Figure 8	Disque d'antibiotique d'Ampicilline et de la Gentamicine	20
Figure 9	Résultat du test au bleu de bromothymol	22
Figure 10	variation l'indice de solubilisation phosphore	23
Figure 11	halo solubilisation	24
Figure 12	variation du diamètre de l'antibiogramme	25
Figure 13	test d'antibiotique	25
Figure 14	Regroupement des isolats rhizobiens suivant l'AFC	26
Figure 15	Regroupement des isolats suivant la CAH	27

Liste des abréviations

%	Pourcentage
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AMP	Ampicillin
AMX	Amoxicillin.
ATP	adenosine triphosphate
BTB	bleu bromothymol
BSP	bactéries solubilisant le phosphore
GN	Gentamicine
H	heur
N	Azote
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₃	Ammoniac
NH ₄ ⁺ :	Ammonium
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	nitrate
<i>Nod</i>	gène de nodulation
P	phosphore
PGPR	Plant Growth Promotion Rhizobacteria
pH	potentiel d'hydrogène
Pi	phosphore inorganique
Po	phosphore organique
ppm	Parts par million
PVK	Pikovskaya
TCP	tricalcium phosphate
YMA	Yeast Manitol Agar.

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
i. Liste des figures	i
ii. Liste des tableaux	ii
iii. Liste des abréviations	iii
iv. Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
Parti 01 : Symbiose légumineuses-<i>Rhizobia</i>	
1. Macrosymbiote (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	03
1.1. Historique et origine	03
1.2. Exigences et biologie de la plante	03
1.3. Production en Algérie	05
2. Microsymbiote (<i>Rhizobia</i>)	05
2.1. Taxonomie	06
2.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques	08
2.3. Caractéristiques génétiques	08
3. Processus de fixation biologique d'azote	09
4. Facteurs influençant la symbiose Légumineuses - <i>Rhizobia</i> .	09
4.1. Stress thermique.	09
4.2. Stress salin.	10
4.3. Effet du pH.	10
4.4. Déficience en phosphore	10
Parti 02 : Le phosphore dans le système sol-plante	
1. Phosphore du sol	11
1.1. La forme de phosphore dans sol	11
1.2. Cycle de phosphore	13
2. Phosphore végétal	13
3. Rôle physiologique du phosphore	14
4. Importances du phosphore dans la fixation symbiotique d'azote	15
5. Solubilisation du phosphore	15
5.1. Solubilisation directe	15
5.2. Solubilisation indirect	16
Chapitre II :Matériel et méthodes	
1.Lieu de l'étude	17
2. Matériel microbiologie	17
3. Matériel et Méthode de travail	18

3.1. Préparation des milieux	18
3.1.1. Le milieu d'enrichissement	18
3.1.2. Le milieu de solubilisation	18
4. Repiquage des <i>Rhizobia</i>	18
5. Purification	19
6. Test physiologique	19
6.1. Tolérance des isolats au pH	19
6.2. Tolérance à la salinité	19
7. Test du bleu de bromothymol (BTB)	19
8. Test de biosolubilisation du phosphate inorganique par les <i>Rhizobium</i>	19
9. Résistance antibiotiques	20
10. Analyses statistiques	20
Chapitre III : résultats et discussion	
1. Caractérisation physiologique	21
1.1. Effets de pH sur la croissance des isolats rhizobiens	21
1.2. Effets de NaCl sur la croissance des isolats rhizobiens	21
2. Test du bleu de bromothymol (BTB)	22
3. Test de biosolubilisation du phosphate inorganique par les <i>Rhizobium</i>	23
4. Test antibiotiques	24
5. Analyse Factorielle des Correspondances (AFC)	25
6. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	26
Discussion	28
Conclusion	31
Référence bibliographique	33
Annexe.	I

Introduction

Introduction

Le sol est un environnement où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse (AMEUR, 2014). En effet, il est estimé que 80 à 90% des processus dans le sol sont des réactions induites par les micro-organismes (KAIOUA et GRAIRI, 2015). Certains microorganismes appelés rhizobactéries ont l'aptitude à coloniser les racines de façon intense. Il s'agit par exemple de : *Rhizobium* (HATIM, 2015).

Toutes les légumineuses ne sont pas capables d'établir une symbiose avec *Rhizobia*, cette caractéristique est inégalement répartie à travers les trois sous familles: 5-10% des genres de Césalpinées, 50% des Mimosacées, 90% des genres de Papilionacées (AMRANI, 2008).

L'arachide est l'une des plus importantes oléagineuses cultivées dans le monde, notamment dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique. Sa culture prend de l'ampleur en Algérie, où elle est cultivée dans plusieurs wilayas El Tarf, Skikda, Adrar, El Oued et Ghardaïa. (AMRI-TILIOUINE, 2007 ;AIT OUALI, 2011).

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont la salinité, les températures élevées et le pH. Des interactions fréquentes entre ces différentes contraintes affectent la croissance et la capacité de survie des micro-organismes dans les sols arides. (SOBTI, 2013).

La fixation symbiotique de l'azote consiste à inoculer les légumineuses avec des *Rhizobia* efficaces (MAOUGAL, 2004). L'azote est un nutriment essentiel et limitant pour le développement des plantes et, bien que majoritaire dans l'atmosphère, (N_2), n'est pas directement assimilable par les végétaux. En revanche, certaines plantes peuvent s'associer en symbiose avec des microorganismes diazotrophe qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique, ces bactéries induisent sur la racine de la plante hôte la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. A l'intérieur des nodules, la bactérie subit des transformations et fixe l'azote moléculaire de l'atmosphère en le convertissant en ammonium, (NH_4^+) assimilable par la plante. En retour la plante fournit aux bactéries des composés carbonés issus de la photosynthèse. (BOUDJENAMA et MANSOUR, 2014).

Cependant, plusieurs contraintes abiotiques peuvent réduire l'efficacité de cette symbiose telle que le déficit en phosphore. (GHANIMI, 2014). Le phosphore est l'un de principaux éléments nutritifs limitant la productivité des légumineuses vu que la majorité du phosphore (P)

contenu dans les sols se trouve sous des formes minérales et organiques complexes qui ne sont pas directement utilisables par les plantes. Le phosphore peut jouer un rôle important sur la croissance des souches de *Rhizobia*. (BOUDANGA, 2011).

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture est une autre approche biologique, elle consiste en l'inoculation des plantes par les rhizobactéries (PGPR : Plant Growth Promotion Rhizobacteria) ils sont bio fertilisants afin de favoriser et améliorer leur croissance et constituer une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides. La souche PGPR possède propriété de fixer librement l'azote en plus production solubilisation du phosphate,. De ont fait l'objet de recherches possibilité de remplacer l'engrais phosphore par des bios fertilités. (SILINI, 2013).

La présente étude a pour objectifs de mettre en évidence la solubilisation du phosphate par des souches *Rhizobia* en se basant sur une approche de caractérisation qui repose essentiellement sur l'étude les performances de croissance de ces souches en différents milieux, la solubilisation du phosphate insoluble et la résistance aux antibiotiques.

Synthèse bibliographique

Parti 01 : Symbiose légumineuses-*Rhizobia*

1. Macrosymbiote (*Arachis hypogaea* L.)

Les légumineuses représentent la famille des Leguminosae (ou Fabaceae), des dicotylédones. Elles forment une famille importante et variée des angiospermes. Plus de 18000 espèces de légumineuses que l'on classe en trois catégories : les Papilionacées, les Mimosées et les Césalpinées (RAMDANE et BOUKARANA, 2016).

L'arachide cultivée est une herbacée annuelle, appartenant à la famille des Fabacées et la sous-famille des Papilionacées. Une famille qui renferme plus de 18 000 espèces, constituant ainsi le groupe de végétaux supérieurs le plus abondant et le plus diversifié (LAZALI, 2009).

1.1. Historique et origine

L'espèce de l'arachide (*Arachis hypogaea*L) est originaire de l'Amérique du Sud. Les portugais introduisirent la plante au début du XVIème siècle sur la côte occidentale de l'Afrique. De leur côté, les espagnols, à peu près à la même époque, l'auraient introduite aux Philippines à partir de la côte Ouest du Mexique (LAZALI, 2009). De là, la culture de l'arachide se serait étendue vers la Chine, le Japon, le Sud-Est asiatique, l'Inde et la côte Est de l'Australie. Ainsi, l'Afrique se trouverait être un lieu de rencontre de deux voies différentes de diffusion de l'espèce (AMRI TILIOUINE, 2007).

1.2. Exigences et biologie de la plante

L'arachide est une plante caractéristique des zones semi-arides et arides dont le système racinaire est puissant. Ce système racinaire est constitué par une racine primaire pivotante qui s'enfonce verticalement dans le sol à une certaine profondeur. L'absorption de l'eau et des éléments minéraux est assurée par le parenchyme cortical des radicelles. Son système racinaire présente des nodules lui permettant de fixer l'azote atmosphérique (ALLEIDI, 2014).

La plante de l'arachide est caractérisée par une tige principale et des ramifications primaires qui peuvent avoir de 0,20 à 0,70 m de long, selon les variétés et les conditions du milieu (fig01). Les ramifications sont toujours herbacées de couleur vert clair, vert sombre ou plus ou moins pourpre (LAZALI, 2009).

Les feuilles sont pennées et possèdent 4 folioles de forme ovale opposées par paires et de couleur verte plus ou moins foncée. Elles sont portées par un pétiole de 4 à 9 cm de long. Deux stipules de 2 à 3 cm de long sont fixées à la base du pétiole (STÉPHANIE, 2008). Les feuille sont

nombreuse, pennées avec deux paires des folies elliptiques opposée et subsessiles. Les fleurs jaunes-orangées papilionacées, prennent naissance à l'aisselle des feuilles. la fécondation à lieu avant l'épanouissement des fleurs (clesitogamie) bien qu'il existe un certain pourcentage d'allogamie de 1 à 4 (AMRI TILIOUINE, 2007).

Le gynophore se développe verticalement sous l'effet d'un géotropisme positif, la gousse prend une position horizontale entre 2 et 7 cm sous la surface du sol (LAZALI, 2009).Après la fécondation, la base de l'ovaire s'allonge pour donner naissance à un organe appelé gynophore qui porte l'ovaire vers le bas (AMRI TILIOUINE, 2007).

L'arachide tolère bien la sécheresse mais il présent des phases de sensibilités variable selon les stades physiologiques. La graine a besoin d'une quantité d'eau importante proche de la capacité de rétention pour s'imbiber avant de germer, l'embryon par contre à des besoins en oxygène élevés Dès que la germination est amorcée (AIT OUALI ,2011).

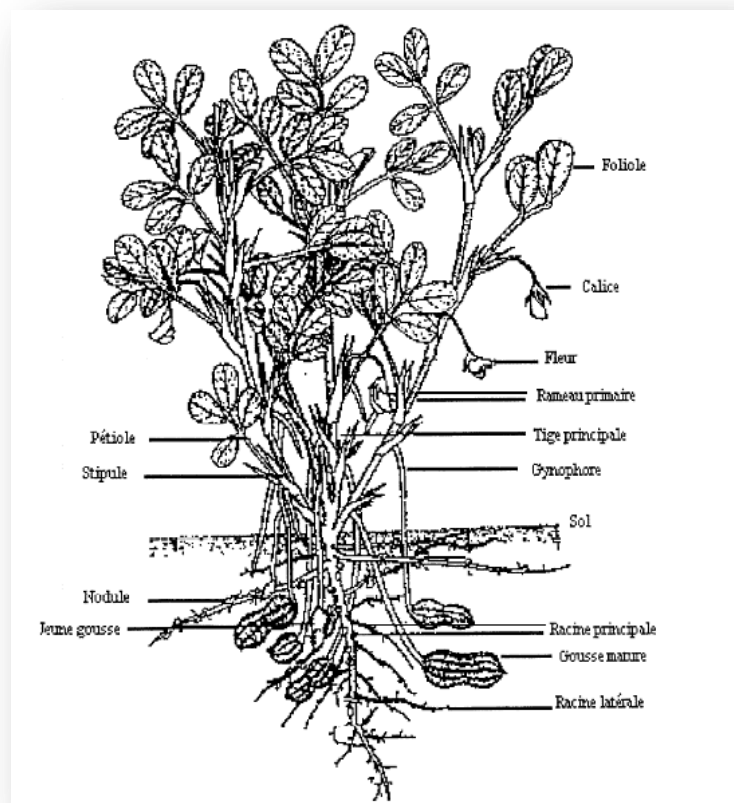


Figure 1: Morphologie d'arachide (Doucouré, 1999)

2. Production en Algérie

La culture d'arachide est très ancienne. En Algérie, (**fig02**) elle s'est développée au cours des années 80, sans pratiquement aucun appui de la part de l'État (**AIT OUALI ,2011**). Cependant, il s'agit de culture des variétés d'arachide de bouche dont le débouché naturel n'est pas la transformation par l'industrie (**LAZALI, 2009**).

Dans la wilaya de Ghardaïa qui affiche une production de 9500 qx pour une superficie de 520 ha. Cette spéculation fait partie de la culture ancienne de la population de SEBSEB. La population agricole dans sa presque totalité pratique cette culture, et se trouve au déliant des autres gammes de cultures. Les superficies exploitées par les arachides s'avèrent de plus en plus en progression. À titre d'exemple pour l'année 2010 à 2011 les valeurs sont 350 ha. La production moyenne en quintaux est de 7000qx, avec une qualité du produit très appréciée par le public (**FIHAKHIR. 2012**)

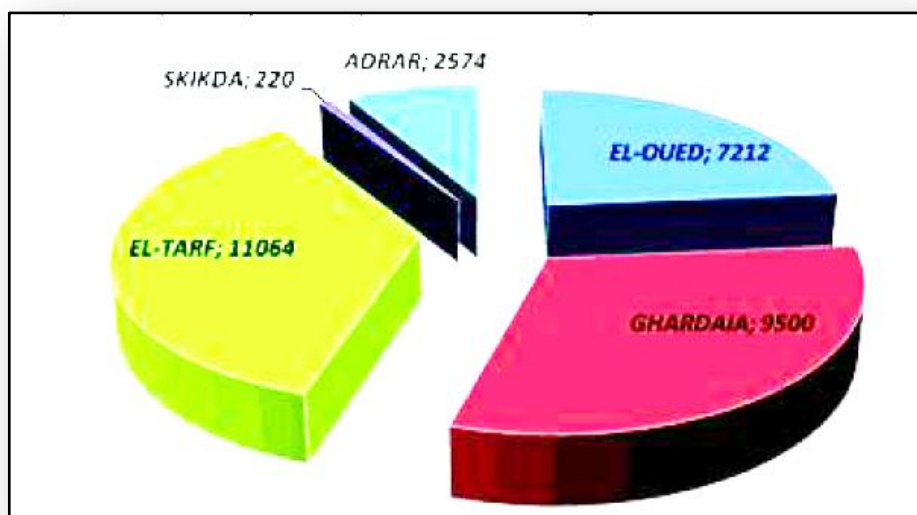


Figure2: Principales zones productrices d'arachide en Algérie (2009) (AIT .OUALI ,2011)

3. Microsymbiote (*Rhizobia*)

À chaque espèce de légumineuse correspond une espèce de *Rhizobium* qui lui est inféodée, mais certaines espèces de *Rhizobium* peuvent être communes à plusieurs espèces végétales. Les souches de *Rhizobium* associées avec les légumineuses tempérées comme la luzerne, les trèfles, arachide, les vesces sont à croissance rapide, alors que les *Bradyrhizobium* associées aux espèces

comme les lupins, le soja et la plupart des espèces tropicales sont à croissance lente (**RAMDANE et BOUKARANA, 2016**).

Le genre *Rhizobium* était d'abord appelé (de la vie latine de racine de signification), et pendant beaucoup d'année c'était un crochet tout le genre pour tous les *Rhizobia*. Quelques espèces plus tard ont été déplacées dedans à de nouveaux genres basés sur des analyses phylogénétiques. (**SAOUDI, 2007**). Il se compose de 122 espèces Les *Rhizobia* sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique et phosphore en association avec des légumineuses hôtes (**MAOUGALRYM, 2004**).

. Le nom de *Rhizobium* a été proposé par Frank en 1889. Ce type de bactérie a été isolé, sous le nom *bacillus radicolica*, il a été rebaptisé *Rhizobium* (du grec rhiza= racine et bio= vie) dont la signification est "vivant dans une racine". ce sont des bactérie appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (classe *Alpha-protobacteria*) et les *Rhizobia* isolés par Beijrnik en 1988 et identifiés comme agents de la fixation d'azote (**AMMAR, 2010**).

Ces bactéries sont capables d'établir une relation symbiotique avec les légumineuse L'infection se traduit par la formation d'un organe appelé nodule. De plus, une des caractéristiques de ces bactéries est la production de bactériocines(substances antibactériennes de nature protéique) (**SAADI ,2009**).

3.1. Taxonomie

Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de la caractérisation des *Rhizobia* mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celle de la structure génomique. La classification moderne est basée sur l'approche poly-phasique, c'est à dire sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique afin de décrire toute nouvelle espèce de *Rhizobia* actuellement, quelque 98 espèces appartenant à 13 genres différents (**RAMDANE et BOUKARANA, 2016**).

L'étude taxonomique (**tab I**) des *Rhizobium* revêt une importance capitale pour leur utilisation en agriculture (**DIOUF, 1997**). La taxonomie des *Rhizobium* a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études (**KHALLEF et BENDANA, 2016**).

Tableau I: Classification simplifiée des bactéries symbiotiques des légumineuses (Ramdane et Boukarane, 2016)

<i>Rhizobium</i>		Principale plante hôte
Genre	Espèce	
<u><i>Rhizobium</i></u>	<u><i>R .leguminosarium</i></u> <u><i>Biovartrifoli</i></u> <u><i>Biovarviciae</i></u> <u><i>Biovarphaseoli</i></u> <u><i>R.lupini</i></u>	Trèfles vesce, pois, lentille, etc. Haricot Lupin Arachide
<u><i>Sinorhizobium</i></u>	<u><i>S.meliloti</i></u> <u><i>S.ferdii</i></u> <u><i>S.terangae</i></u>	Luzerne Melilote Trigone Soja, Vigna Sesbaria, Acacias
<u><i>Allorhizobium</i></u>	<u><i>A.undicola</i></u>	Neptunianatans
<u><i>Mesorhizobium</i></u>	<u><i>M .loti</i></u>	Lotier, Arthylis, lupin
<u><i>Bradyrhizobium</i></u>	<u><i>B.elkanni</i></u> <u><i>B.japonicum</i></u>	Soja, Vigna ,macroptium Soja, Vigna ,macroptium
<u><i>Azorhizobium</i></u>	<u><i>A.caulinodans</i></u>	Sesbania rotrata
<u><i>Blastobacter</i></u>	<u><i>B .denitrificans</i></u>	Aeschynomoneindica
<u><i>Methylbacterium</i></u>	<u><i>M.nodulans</i></u>	Crotalaria
<u><i>Burkholderia</i></u>	<u><i>Burkholderia. Sp</i></u>	Aspalathus
<u><i>Raistonia</i></u>	<u><i>R .taiwanensis</i></u>	Mimose

3.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques

3.2.1. Caractères biochimiques

Les *Rhizobia* sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Les vitamines s'avèrent parfois nécessaire pour la croissance de certaines espèces (MOUAFEK,2010). Les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. Tandis que la majorité des souches à croissance lente préfère les pentoses (SAADI ,2009).

possédant une forme bâtonnet mobile de 0,6 à 0,9 μm (fig03)de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur avec un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches Elles sont des bacilles Gram négatif et elles ne font pas d'endospores. ils sont non sporulantes (BOUDANGA, 2011).



Figure 3:Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope électronique (x 1 000) (BOUDANGA, 2011).

3.2.2. Caractères physiologiques

Le *Rhizobia* est un micro-organisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible pression en oxygène. Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, précisément 6.8, mais certaines souches peuvent tolérer un milieu acide de pH 4 comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C. (AMMAR, 2010)

3.3. Caractéristiques génétiques

La génétique de *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre. Le génome de *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome: de taille supérieure à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2Mb) et un plasmide de taille

inférieur à 1Mb, selon les espèces. Les gènes responsables de la nodulation (NOD) et de la fixation dans les souches de *Rhizobium* sont situées sur ce simple réplikon symbiotique (AMMAR, 2010).

4. Processus de fixation biologique d'azote

La fixation symbiotique de l'azote a été l'un des premiers mécanismes bactériens identifiés dans la rhizosphère des végétaux comme susceptible d'induire une augmentation de la croissance des plantes. Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (KAIOUA et GRAIRI, 2015). C'est le processus de la fixation biologique de l'azote qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est une réduction enzymatique de N₂ (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH₃) ; cette forme de N combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (SAOUDI, 2007). Dans le système biologique fixateur de N₂ les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères (pression de 250- 1.000 atm de N₂ et température de 450°C) (SAOUDI, 2007).



5. Facteurs influençant la symbiose Légumineuses –*Rhizobia*:

La survie des *Rhizobium* dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de phosphore sont des processus très sensibles à l'action directe d'un certain nombre de facteurs de l'environnement. En effet, plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol. Cependant, en Algérie ce processus naturel est affecté par plusieurs contraintes abiotiques parmi lesquels le stress hydrique, le stress salin et les variations de température (IDJER et LAIDI, 2016).

5.1. Stress thermique

La plupart des *Rhizobia* se développe entre 28° et 31°C (IDJER et LAIDI, 2016). Des souches de *Rhizobia* isolées de *Lupinus luteus* capables de s'adapter à des fortes températures pouvant atteindre 45°C ont été décrites (BOUDAD, 2015).

5.2. Stress salin

La tolérance au sel des *Rhizobia* est très variable et dépend, probablement dans une grande mesure, de l'efficacité de leurs mécanismes d'osmorégulation (**Mouafek, 2010**). Dans les zones arides et semis arides, les contraintes salines s'associent souvent au déficit hydrique, pour limiter la production des espèces végétales chez les légumineuses (**BOUDAD ,2015**). La salinité affecte la multiplication et la survie du *Rhizobia* dans le sol et la rhizosphère, inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne entraînant une diminution du nombre des nodules, réduit leur contenu en légghémoglobine, diminue l'activité de la nitrogénase, altère la diffusion intra nodulaire de l'oxygène et modifie le statut ionique (**IDJER S et LAIDI, 2016**).

5.3. Effet du pH

La majorité des légumineuses nécessitent un pH neutre ou légèrement acide pour établir une symbiose efficiente dans le sol. L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte et d'autre part l'efficacité des *Rhizobium* et engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le *Rhizobium* que pour la plante hôte (**BOUDAD ,2015**).

5.4. Déficience en phosphore

Au sein de la plante, une quantité limitante en Pi pourrait avoir des conséquences, majeures sur son métabolisme et son développement. La réponse des cultures à une carence en Pi est complexe (**BARGAZ, 2012**). On assiste à des modifications moléculaires, biochimiques, physiologiques et morphologiques qui permettent à la plante de s'adapter à une disponibilité sub-optimale du Pi dans le sol et d'augmenter son efficacité d'utilisation et/ou d'acquisition. Une description chronologique hypothétique des réponses peut-être proposée en regroupant les réponses en trois catégories : morphologique, métabolique et physiologique (**BARGAZ, 2012**).

Partie 02 : Le phosphore dans le système sol-plante

1. phosphore dans sol

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes (**DJEGHAR et DJEGHAR, 2014**).

Dans les sols, son contenu varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% pour une moyenne de 600 ppm. Le phosphore constitue le deuxième élément en importance pour la nutrition végétale. Cependant, la majorité des sols cultivables en sont pauvres. Pour améliorer la production des plantes, on apporte le phosphore sous forme d'engrais soluble. Cependant, l'enrichissement en phosphore du sol suite à des applications de fertilisants dépend des caractéristiques chimiques et de la nature pédologique du sol. En effet, la plus grande partie du phosphore ajouté sous forme soluble (**BIDI et OUAMEKH, 2015**).

La forte affinité du P pour les particules du sol a longtemps conduit la communauté scientifique à considérer cet élément comme totalement immobile dans le sol. Cependant, on sait actuellement que le P peut être mobilisé et redistribué dans le profil du sol et que dans certains cas il peut être transféré hors de ce profil (**BARGAZ, 2012**)

1.1. La forme de phosphore dans sol

Les sols contiennent 100 à 3000 mg P kg sol⁻¹ sous forme de phosphate qui peut être intégré dans une large gamme de constituants organiques et minéraux. La proportion de P associé à des composés organiques varie selon les sols et leur type d'utilisation et varie de 30 à 65% du P total (**BARGAZ, 2012**). . La disponibilité du P inorganique (Pi) pour la racine dépend des mécanismes qui contrôlent sa concentration en solution et qui sont de nature physico-chimique, biochimique et biologique selon ses principales formes dans le sol. Généralement, le P se trouve sous sa forme minérale et organique (**BARGAZ, 2012**)

1.1.1. Le phosphore minéral

Les ions orthophosphate constituent la seule forme de P directement assimilable par les plantes. Seule une faible proportion de P est présente sous forme de Pi en solution et sa concentration est maintenue pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 µM (**GHANIMI, 2014**).

Les mécanismes physico-chimiques responsables de la mobilisation de P sont l'altération des minéraux primaires, la destruction des agrégats qui libère des minéraux P secondaires suivie de la désorption des ions phosphate contenus dans ces minéraux et enfin les échanges ioniques qui permettent la mise en solution de Pi à partir du pool labile de P inorganique. Cependant, le mécanisme majeur qui détermine la mise en solution de Pi à partir des minéraux phosphatés ou des surfaces d'échanges du sol est la variation du pH de la solution du sol (**GHANIMI, 2014**).

Le P existe sous forme d'orthophosphate (PO_4^{3-}) plutôt que sous sa forme élémentaire puisqu'il réagit facilement avec l'oxygène. Au niveau du sol, les deux principales formes d'ions phosphatés sont le H_2PO_4^- (condition acide) et le HPO_4^{2-} (condition alcaline) (**TAKTEK, 2015**).

En effet, la fraction minérale de P du sol se trouve dans différentes combinaisons avec le Fe^{3+} , l' Al^{3+} , le Ca^{2+} , le fluor et autres éléments. Ainsi, la plus grande partie du P ajouté sous forme soluble est soit adsorbée par le calcium présent sur le complexe d'échange, soit précipitée par les formes libres de fer ou d'aluminium qui se retrouvent en quantités importantes dans les sols de l'ordre de 0,2 à 0,7 % soit plusieurs tonnes par hectares (**BARGAZ, 2012**).

1.1.2. Le phosphore organique

On peut définir le P organique comme l'ensemble des composés comportant un ou plusieurs groupements phosphatés et qui sont produits par le métabolisme des êtres vivants. De ce fait, le P organique dérive principalement des résidus végétaux, des cellules microbiennes et fongiques et des métabolites cellulaires. Le organique peut représenter jusqu'à 80% du P total présent dans un sol (**BARGAZ, 2012**).

Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) et secondairement sous forme de sucres, acides nucléiques, et phospholipides. Les phosphates d'inositol constituent des réserves phosphorées, provenant en majorité des plantes et stockées dans les graines. La présence d'un ou plusieurs groupements phosphate dans les composés de Po entraîne une faible mobilité dans la solution du sol (**GHANIMI, 2014**).

En effet, ils peuvent être fortement adsorbés par les minéraux argileux et peuvent former avec la matière organique des composés difficilement dégradables ou précipiter avec les oxydes de Fe ou d'Al dans les sols acides ou de Ca et Mg dans les sols alcalins. Le taux d'adsorption du Po dans les sols est fonction de sa structure, notamment du nombre de résidus P, de sa charge mais aussi de sa taille moléculaire. Ainsi, les phosphates d'inositol s'adsorbent plus facilement à la surface des argiles que les acides nucléiques, les phospholipides ou les sucres simples. La difficulté d'accessibilité aux formes de Po en interaction avec les argiles et la matière organique du sol

implique qu'une grande proportion de Po du sol reste encore chimiquement non déterminée (BARGAZ, 2012).

1.2. Cycle de phosphore

Le cycle de phosphore est centré autour de la seule forme de Phosphore (fig04) utilisable par les organismes vivants qui est le Phosphore en solution. L'approvisionnement de ce pool de phosphore en solution est sous l'influence de deux sous-cycles ; l'un est biologique (pools organiques) et l'autre géochimique (pools minéral), provient majoritairement de l'altération des roches mères (GHANIMI, 2014).

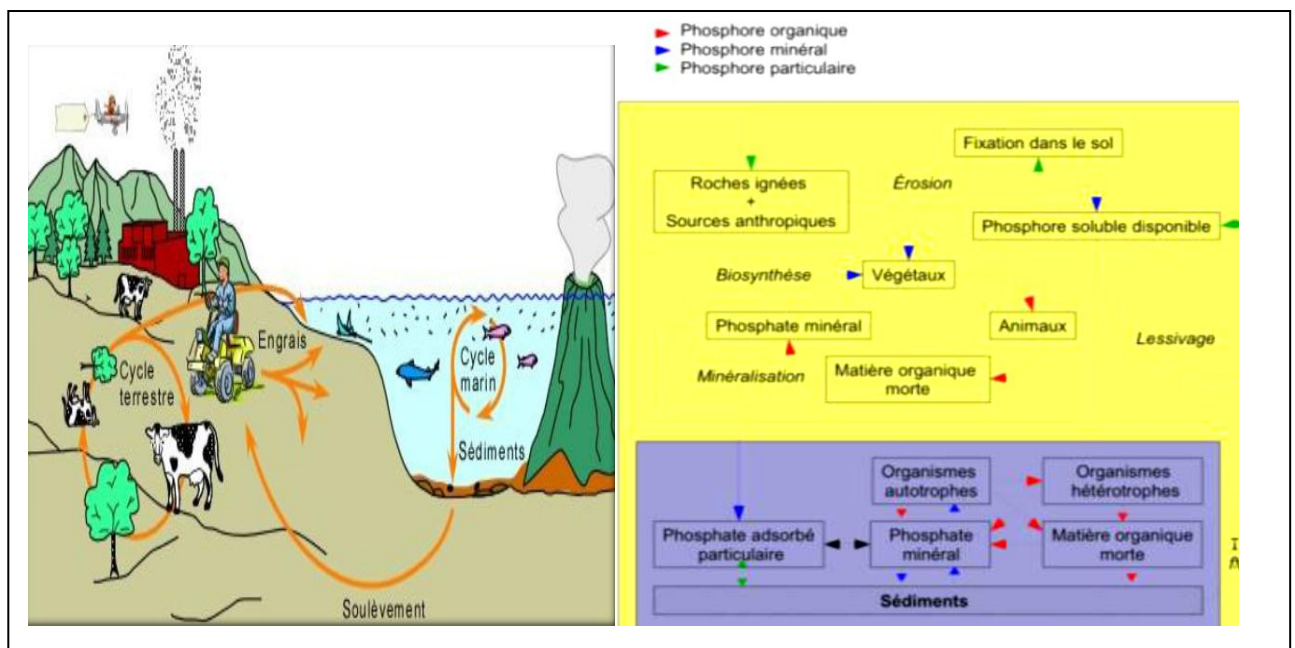


Figure 4: Schéma représentatif du cycle de phosphore (LEFEBVRE S., 2003).

2. Phosphores dans le végétal

Le phosphore se trouve dans la plante sous forme minérale (phosphate alcalins et alcalino-terreux) (BOUHANIA et ZEHRI, 2005).

La plante absorbe (fig05) le phosphore nécessaire sous forme d'ions mono phosphatés H_2PO_4 et diphosphatés HPO_4 . Les mono phosphatés constituent la principale forme absorbée par les plantes. Les quantités de phosphore absorbées sous forme di phosphatée sont plus importantes sur les terres basiques (BOUHANIA et ZEHRI, 2005).

L'absorption du phosphore est très rapide en début de végétation et s'arrête à peu près vers la fin de la période de croissance (BOUHANIA et ZEHRI, 2005).

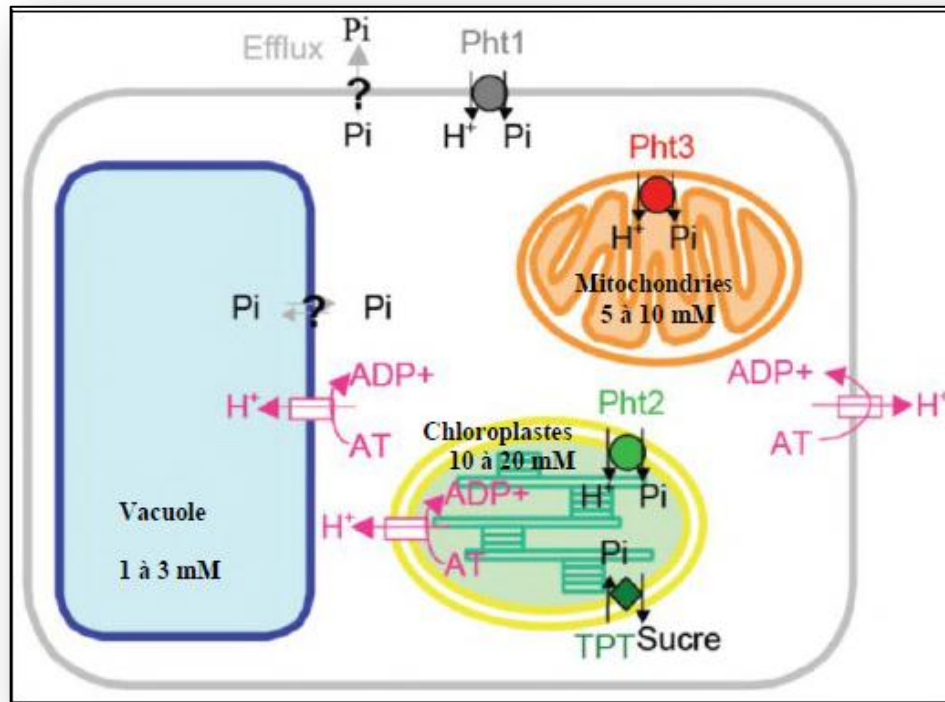


Figure 5: Transport du phosphate au niveau cellulaire (BARGAZ, 2012)

3. Rôle physiologique du phosphore

Le phosphore est un des éléments essentiels dans la constitution de toutes les cellules vivantes, ou il est impliqué dans l'édification des molécules organiques, la synthèse du matériel génétique, et dans le déroulement des processus d'accumulation et de transfert d'énergie. Il constitue un des éléments majeurs dans les fumures (BENAGGAB AMAR, 2011).

Le phosphore joue divers rôles vis-à-vis les plantes. En d'autre terme, il intervient dans le phénomène de photosynthèse en tant que fixateur et transporteur d'énergie et favorise également (HATIM, 2015) :

- ☒ Une bonne croissance.
- ☒ Un bon développement racinaire et un accroissement de la masse des racelles, favorisant ainsi l'amélioration et la croissance de la plante.
- ☒ La rigidité des tissus, ainsi ils sont plus résistants à la verse et aux maladies dues à des champignons.
- ☒ La reproduction à travers une bonne fécondation et une bonne fructification.
- ☒ La qualité des produits (tissus riches en phosphore) pour l'alimentation des hommes et des animaux.

Finalement, une alimentation adéquate et convenable en P permet un développement harmonieux des plantes qui peuvent prélever les quantités nécessaires de nutriments dont elles ont besoin.

4. Importances du phosphore dans la fixation symbiotique d'azote

Les légumineuses disposent d'un système racinaire moins développé par rapport aux graminées, ce qui limite l'absorption du phosphore qui diffuse très lentement à travers la solution du sol vers la rhizosphère. Le phosphore augmente la croissance des plants, le poids du plant, la surface foliaire, le nombre et le poids sec de nodules, l'activité nitrogénasique et le contenu en phosphore dans les racines et les feuilles. (BENAGGAB AMAR, 2011).

En conséquence, l'organogénèse nodulaire immobilise de grandes quantités de P dans les membranes phospholipidiques et les acides nucléiques bactériens et végétaux. On trouve des concentrations en P 3 fois plus élevées dans les nodules que dans les racines et parties aériennes du haricot. Il s'y ajoute l'ATP nécessaire à l'activité de la nitrogénase, $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 ATP$ donnent $2NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (JEAN JACQUES, 2017).

5. Solubilisation du phosphore

La solubilisation microbienne du phosphate joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été démontré que certains microorganismes du sol sont impliqués dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces microorganismes bénéficient directement du P biodisponible nécessaire pour leur croissance. De même, d'autres organismes sont en mesure de profiter du P solubilisé, tels que les champignons et les plantes supérieures (TAKTEK, 2015).

5.1. Solubilisation directe

La minéralisation du P organique du sol (P_o) joue un rôle indispensable dans le cycle du phosphore d'un système agricole. Le P organique peut constituer 40 à 90% du P total du sol. Près de la moitié des micro-organismes dans le sol et les racines des plantes possèdent un potentiel de minéralisation du P sous l'action des phosphatases (HATIM, 2015). Les phosphatases acides utilisent des phosphates organiques comme substrat pour les transformer en une forme inorganique (TAKTEK, 2015). Donc le principal mécanisme de la minéralisation des P organiques est la production de phosphatases acides (HATIM, 2015). Ces enzymes hydrolysent la liaison monoester

à partir de résidus organiques. La plus grande partie de phosphatases extracellulaires du sol provient de la population microbienne (**BOUDANGA,2011**).

5.2. Solubilisation indirecte

Le processus de solubilisation du phosphate par les bactéries solubilisant le phosphore (BSP) est due à la production d'acides organiques à faible poids moléculaire qui a été accompagnée par l'acidification du milieu, et ces acides organiques peuvent chélater les cations avec leur groupes carboxyle et hydroxyle (**BIDI et OUAMEKH, 2015**). L'analyse des filtrats a montré la présence de nombreux composés organiques tels que l'acide malique, glyoxylique, succinique, fumarique, tartrique, acide butyrique céto alpha, oxalique, citrique, l'acide 2-cétogluconique et gluconique (**BOUDANGA, 2011**).

Matériel et méthodes

1. Lieu de l'étude

La présente étude a été réalisée au sein de laboratoire de Microbiologie de l'Université de Ghardaïa.

2. Matériel microbiologie

Il correspond à six isolats rhizobiens, récoltés à partir des nodules racinaires des plants d'arachide, provenant de plusieurs exploitations agricoles dans la région de Mansoura (**Fig. 06**). Les isolats ont été, par la suite, conservés dans des tubes contenant du glycérol (30%), à 4C°

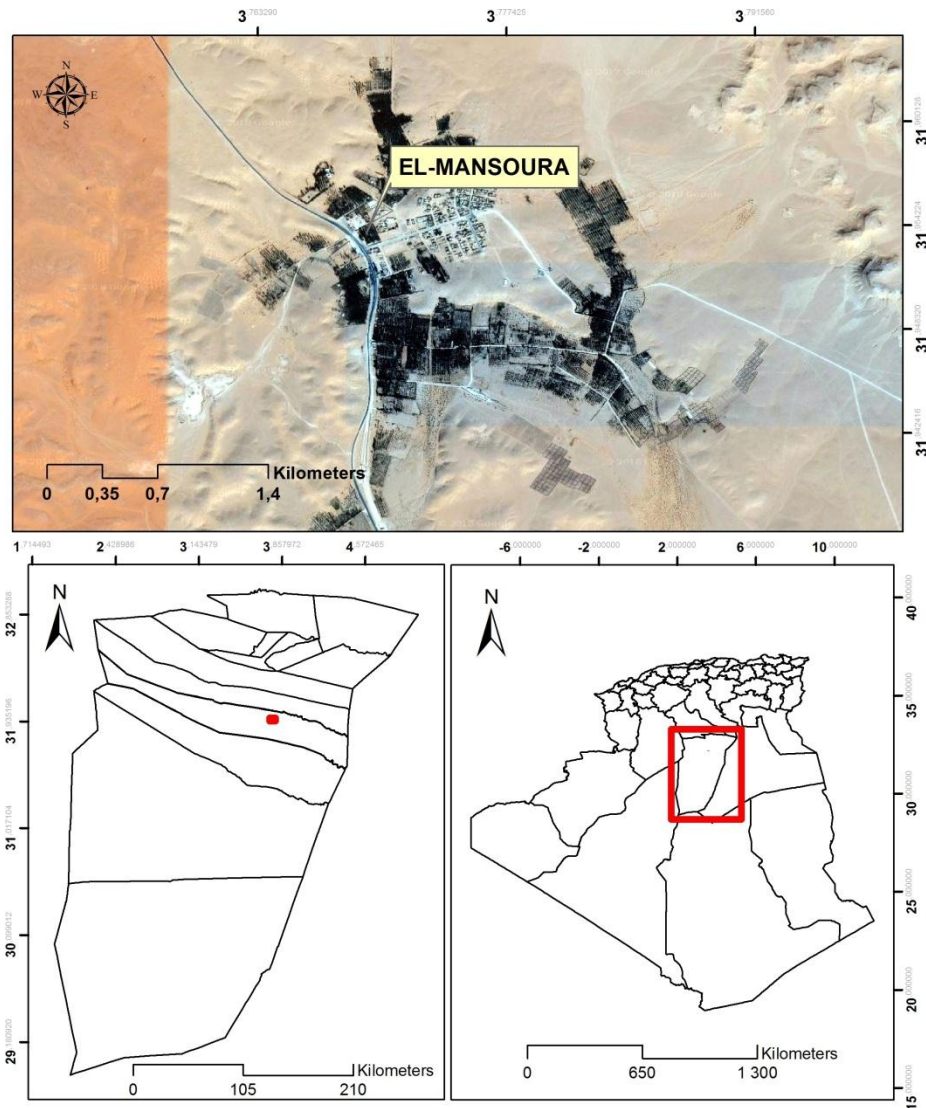


Figure 6: Localisation géographique de la région d'étude

3. Matériel et Méthode de travail

3.1. Préparation des milieux

3.1.1. Le milieu d'enrichissement

Pour cette première étape de tests, nous avons utilisé essentiellement deux milieux solides à base d'extrait de levure : YMA (Yeast Mannitol Agar) et test BTB (bleu de bromothymol) (VINCENT, 1970) (Annexe n°1). Après ajustement du pH à 6.8, les milieux ont été stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

3.2. Le milieu de solubilisation de tricalcium phosphate

Le milieu PVK agar, mis au point par PIKOVSKAYA en 1948, a été utilisé dans cette présente étude pour mettre en évidence la solubilisation de calcium triphosphate (Ca_3PO_4) (Annexe n°1).

4. Repiquage des *Rhizobia*

Les isolats conservés ont été ensemencés en quadrants dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA). Les cultures ont été par la suite incubées pendant 7 jours à 28°C (Fig. 07).

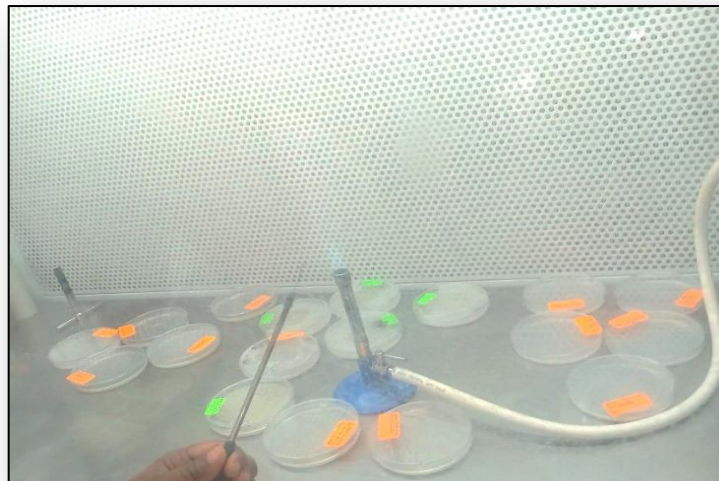


Figure 7: Ensemencement des isolats bactériens (originale ,2018)

5. Purification

Les cultures rhizobiens ont été repiquées plusieurs fois dans des conditions aseptiques sur le milieu YMA jusqu'à l'obtention des colonies homogènes et faciles à caractériser

6. Test physiologique

6.1. Tolérance à la salinité

Quatre concentrations différentes de NaCl ont été testées pour les différents isolats dans le milieu YMA. En effet, le NaCl a été ajouté dans le milieu avant autoclavage à des concentrations de 1%, 3%, 6% et 10%. Les boîtes ont étéensemencées selon la méthode des tests précités et ont été ensuite mises en incubation à 28°C pendant 3 jours.

6.2. Tolérance des isolats au pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au pH sur plusieurs milieux YMA ajustés à chaque fois à pH=4, pH=5, pH=6, pH=6.8, pH=8 et pH=12. Après incubation à 28°C, les observations ont été prises chaque 1 jour durant 3 jours d'incubation.

7. Test du bleu de bromothymol (BTB)

La sélection des isolats par rapport à la production de composés acides ou alcalins a été basée essentiellement sur l'indicateur du pH. En effet, 1.25 ml du BTB (0.5%) est ajouté au milieu YMA avant stérilisation. Le BTB est connu par son virage de coloration en jaune à pH acide, vert à pH neutre et bleu à pH alcalin.

8. Test de biosolubilisation du phosphate inorganique par les *Rhizobium*

Un volume de 10 µl de suspensions bactériennes issues de pré-cultures fraîches, a été déposé à la surface du milieu PVK solide additionné de bleu de bromothymol. Après incubation à 28 °C pendant 7 jours, le diamètre de la colonie et du halo clair ont été mesurés. L'indice de solubilisation a été, en effet, calculé suivant la formule :

$$IS(\%) = \frac{\text{Diamètre de l'halo(mm)} - \text{diamètre de la colonie(mm)}}{\text{Diamètre de la colonie (mm)}} \times 100$$

Ce test consiste à sélectionner les microorganismes capables de produire des zones claires autour des colonies microbiennes dans un milieu de base contenant le phosphate tricalcique (TCP)

(Ca₃PO₄) comme seule source de Phosphore. Ces zones claires sont dues à la production des acides organiques dans le milieu entourant les colonies en question (HATIM, 2015).

9. Résistance aux antibiotiques

Chaque boîte contenant le milieu YMA estensemencée par 10µl d'une pré-culture fraîchement préparée. On utilise trois disques d'antibiotique sont Ampicilline(AMP), Gentamicine(GN) et Amoxicilline (AMO). L'observation après une trois jour d'incubation, les diamètres d'inhibition ont été par la suite mesurés pour chaque isolat (**Fig. 08**).



Figure 8: Disque d'antibiotique d'Ampicilline et de la Gentamicine

10. Analyses statistiques

Les données recueillies ont fait l'objet d'une Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) en utilisant XLSTAT 2016. De même, une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été réalisée en exploitant la méthode d'agrégation de Ward.

Résultats et discussion

1. Caractérisation physiologique :

1.1. Effets de pH sur la croissance des isolats rhizobiens

Les résultats que nous avons obtenus montrent que tous les isolats ont une croissance optimale dans un pH=6,8. Bien que l'isolat M4a a fait preuve d'un large spectre de croissance par rapport aux niveaux du pH testés, les isolats M2a, M3a ont une croissance moyenne à un pH acide (4 et 5), voire même faible lorsque le pH devient fortement alcalin (pH=12). Les isolats M1a, M6a et M7a sont ceux qui ont noté la plus faible croissance dans les milieux à pH différent de 6,8 5(**TabII**)

Tableau II: Effet de pH sur la croissance des isolats rhizobiens

Isolat		M1a	M2a	M3a	M4a	M6a	M7a
pH	4	+	++	++	+++	+	+
	5	+	++	++	+++	±	±
	6	+	+	+	++	+	±
	6.8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	8	++	++	++	++	+	±
	12	+	+	+	++	+	+

+ : moyenne croissance.

++ : Bonne croissance.

+++ : Très bonne croissance

± : faible croissance.

1.2. Effet de NaCl sur la croissance des isolats rhizobiens

Les résultats relatifs à la croissance des isolats rhizobiens en fonction des seuils de salinité sont représentés dans le tableau III. Les isolats testés ont montré une variation assez importante en réponse aux concentrations de sel. En effet, pour la faible concentration de NaCl 1%, la croissance varie entre moyenne pour les isolats M1a et M3a à élevée pour M2a, M4a et M6a. Au fur et à mesure que les concentrations du sel augmentent, les isolats M1a et M2a ont montré la plus faible croissance par rapport aux autres isolats. Néanmoins, l'isolat M4a est celui qui a fait preuve d'une grande tolérance à la salinité, vu qu'elle est bien poussé dans toutes les concentrations de sel. Pour l'isolat M7a, nous avons noté la plus faible croissance sauf que pour la concentration 10% (**Tab. III**).

Tableau III: Effet de NaCl sur la croissance des isolats rhizobiens

Isolat		M1a	M2a	M3a	M4a	M6a	M7a
NaCl	1%	++	+++	++	+++	+++	+
	3%	+	+	++	+++	++	+
	6%	+	+	++	++	+	+
	10%	+++	+++	++	+++	+++	++

+ : Moyenne croissance.

++ : Bonne croissance.

+++ : Très bonne croissance.

± : faible croissance.

2. Test du bleu de bromothymol (BTB)

Cette expérience ayant pour but de distinguer entre les isolats acidifiants du milieu YMA additionné du BTB, et les isolats produisant des composés alcalins. En effet, l'ajout du BTB au milieu YMA permet une mise en évidence d'une réaction acide ou basique.

En effet, nous avons constaté que tous les isolats testés ont tendance à une coloration jaune après 72h d'incubation. Néanmoins, la densité de coloration jaune varie d'un isolat à un autre. Les isolats M1a, M2a et M3 sont ceux qui présentent la densité la plus élevée, couvrant pratiquement toute la surface de la boîte de culture. Les isolats M4a et M6a se caractérisent par une densité moyenne, tandis que pour M7a, nous avons noté la plus faible densité. La coloration jaune révélée dans ce présent test indique que les isolats rhizobienne ont un seuil d'acidification plus ou moins varié (**fig9**)

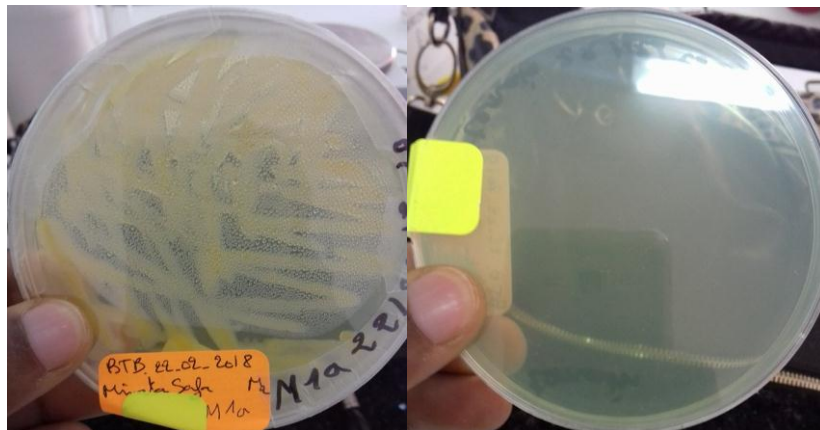


Figure 9: Résultats du test au bleu de bromothymol (orginal, 2018)

3. Test de biosolubilisation du phosphate inorganique par les *Rhizobium*

Six (06) isolats de *Rhizobia* ont été cultivés sur milieu PVK (PIKOVSKAYA, 1948). Solide, avec comme seule source de P le Ca_3PO_4 . Ce test nous permettra d'évaluer la capacité des souches à solubiliser le P à travers leur croissance et le diamètre du halo entourant les colonies. Ces zones claires sont dues à la production d'acides organiques dans le milieu entourant les colonies de *Rhizobium*. Le calcul de l'indice de solubilisation (IS) nous a permis de mettre en évidence la capacité solubilisatrice de chaque isolat bactérien afin de le comparer à d'autres les isolats.

La figure 10 montre que les plus grandes capacités de solubilisation sont notées chez les isolats M6a (400%) et M4a (300%). Les isolats à capacité moyenne de solubilisation sont M2a (200%) M7a (150%) et M1a (100%). L'isolat M3a a noté, par contre, un indice de solubilisation faible (66.66%)(fig.11)

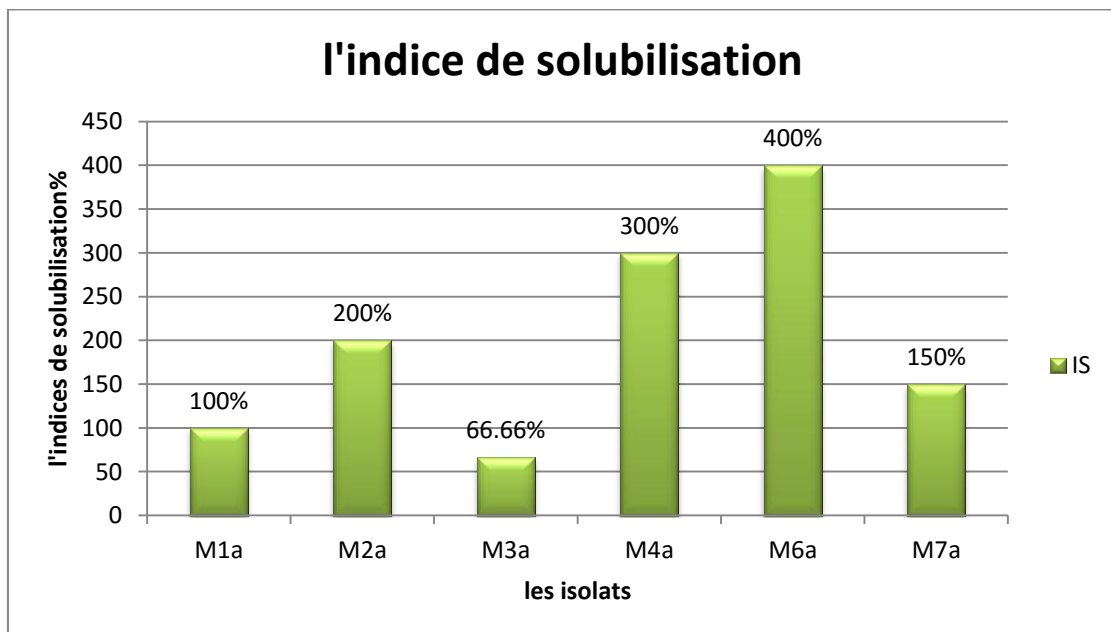


Figure 10: Variation de l'indice de solubilisation du phosphate

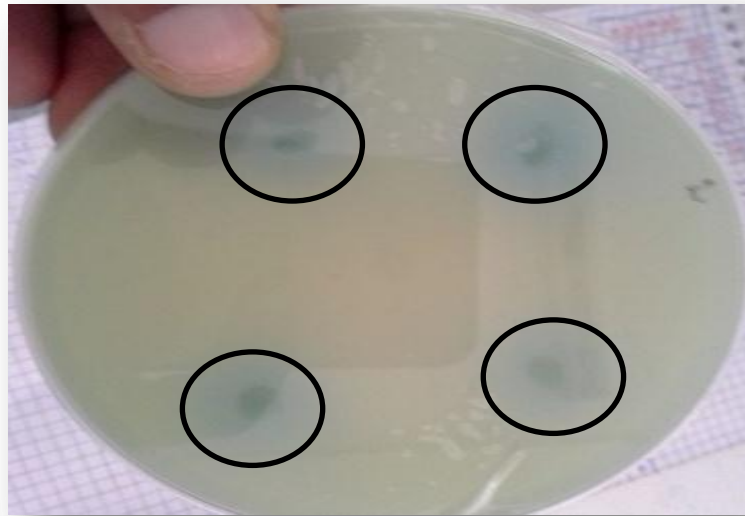


Figure 11: halo de solubilisation (original, 2018)

4. Test d'antibiotiques

Le test d'antibiogramme permet d'établir le spectre de résistance de chacun des isolats aux antibiotiques sélectionnés. Le principe est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence des antibiotiques par diffusion à partir des disques dans un milieu gélosé. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice. Le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité des souches

Les résultats obtenus montrent des réponses similaires de tous les isolats souches avec les antibiotiques. En effet, nous pouvons constater que tous les isolats sont sensibles à la présence de Gentamicine, vu qu'aucun trace de croissance autour de la zone de disque d'antibiotique n'a été notée. Cependant, la zone d'inhibition a été différente d'un isolat à un autre. Les isolats M7a et M3a sont considérés les plus sensibilité (20 mm de zone d'inhibition) suivis par M6a, M4a et M2a à une moyenne sensibilité et pour M1a est la plus faible (10mm). Néanmoins, pour les deux autres antibiogrammes, nous considérons que tous les isolats sont résistants (**Fig. 12 et 13**).

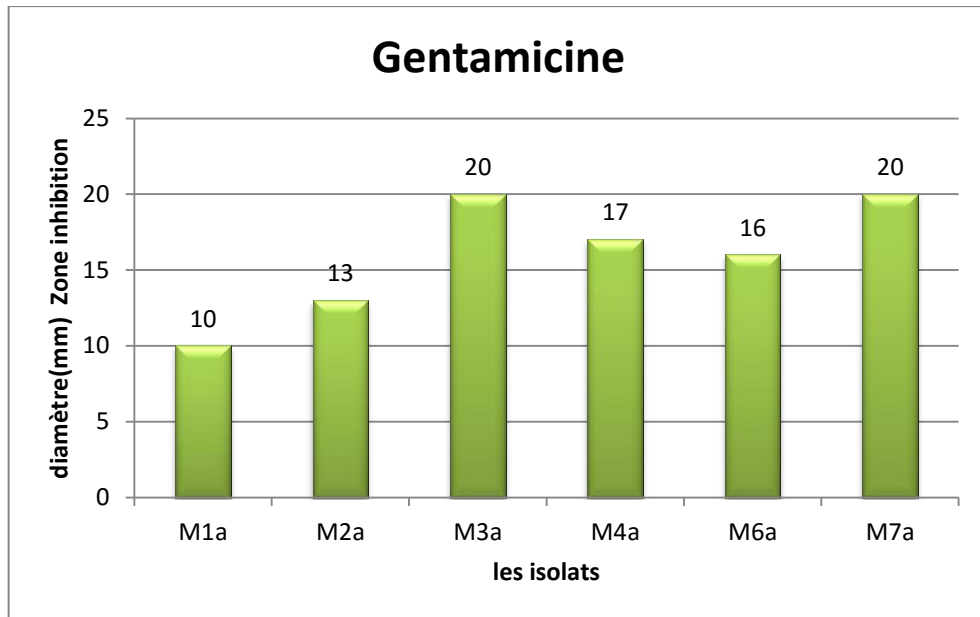


Figure 12: Variation du diamètre de l'antibiogramme



Figure 13: test d'antibiogrammes (originale, 2018)

5. Analyse Factorielle des Correspondances (AFC)

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) met en évidence le lien les différents isolats et les tests physiologiques et de croissance utilisés dans cette étude. En effet, l'inertie figurée dans le premier axe factoriel F1 (61.57%) et le deuxième F2 (22.03%) conduit à une bonne représentation des variables et des individus sur la carte factorielle (83.60%). La première composante factorielle retient les réponses des isolats aux concentrations 1% et 10% de NaCl contre la croissance au pH= 4, 5, 6 et 8. La deuxième composante relie les croissances au pH=4 et la concentration 3% de NaCl contre les pH : 5, 6 et 8 ainsi que les doses 1% et 10% de NaCl. La

carte factorielle nous a permis de distinguer, par conséquent, trois groupes d'isolats rhizobiens (Fig. 14):

- les isolats M7a et M2a à croissance performante tant sur des doses faibles 1% que les plus élevées 10% de NaCl.
- l'isolat M6a qui a bien poussé dans des milieux à pH légèrement alcalin (pH=8).
- les isolats M3a et M4a pouvant pousser non seulement dans des milieux acides (pH=4), mais également dans une salinité moyenne 3%

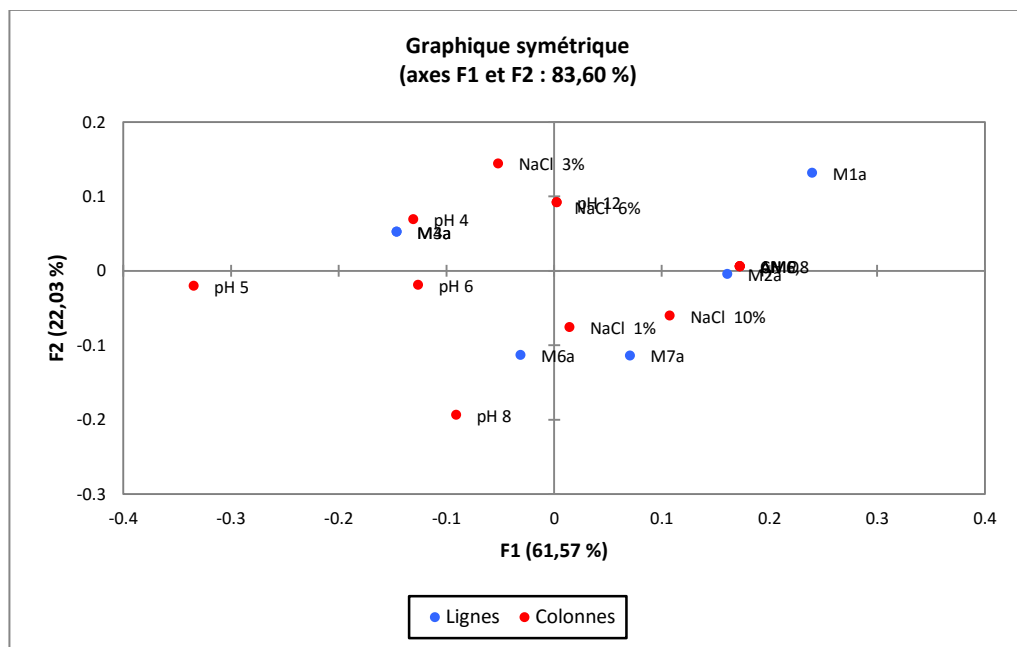


Figure 14: Regroupement des isolats rhizobiens selon l'AFC

6. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La classification des isolats selon la méthode d'agrégation de Ward a été de même utilisée dans ce présent travail, afin de mettre en évidence les clusters de regroupements en utilisant une dissimilarité par distance euclidienne. En effet, les résultats montrent les six (06) isolats testés peuvent être regroupés en deux principales branches. La branche I, regroupe les isolats M3a et M4a présentant une meilleure croissance à une salinité assez importante 10%. La branche II, elle-même se divise en deux clusters A et B. Bien que le cluster A retient les isolats M2a, M6a et M7a à des

performances de croissance moyenne, le cluster B maintient l'isolat M1a dont la résistance à la gentamicine est la plus faible (Fig. 15) (Annexe 2).

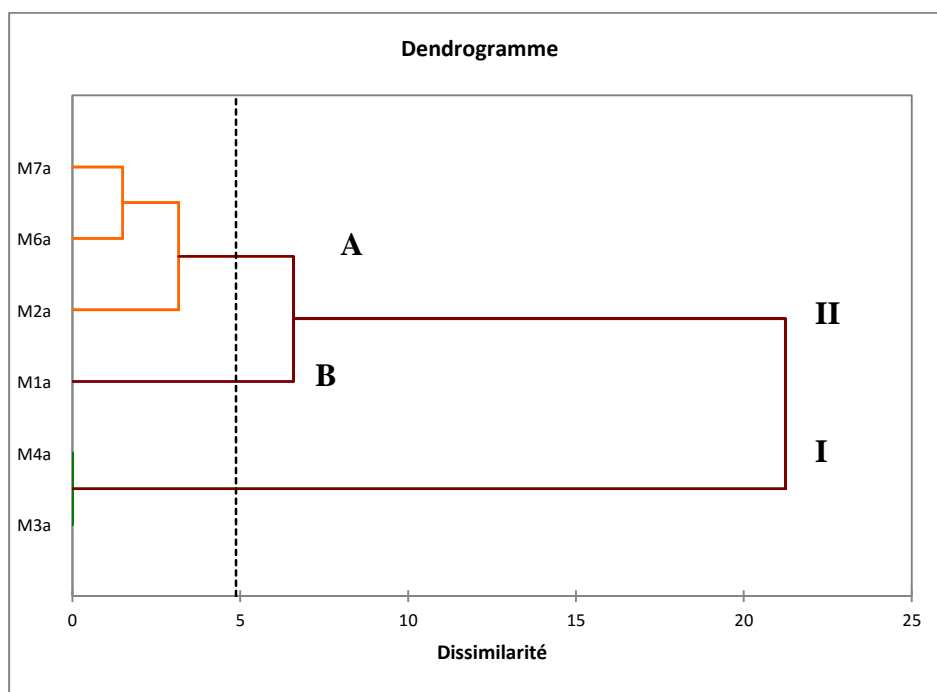


Figure 15. Regroupement des isolats selon la CAH

Discussion

Six isolats *Rhizobia* provenant de la région d'El-Mansoura ont été caractérisés sur des substrats sélectifs (YMA) dans ce présent travail, en utilisant plusieurs tests physiologiques et de croissance.

Bien que la totalité des isolats soient capables de croître dans des pH allant de 4 à 12, l'optimum de croissance de tous les isolats testés se situe entre pH 6 et 6.8, ce qui indique que les isolats obtenus sont des neutrophiles (**RAMDANE et BOUKARANA, 2016**). Dans ce contexte, **BELHADJISSA et BENBITOUR (2017)** ont constaté que la majorité des isolats d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) dans la région de Ghardaïa sont capables de croître dans des pH variant entre 4.5 et 9. D'autres travaux portant sur les isolats de luzerne (*Medicago sativa* L.) ont montré par contre une croissance nulle à pH=4 (**RAMDANE et BOUKARANA, 2016**). Néanmoins, **FECIH (2016)** rapporte que les *Rhizobia* associés à *Medicago sativa* au Maroc sont sensibles aux pH acides (pH 4) vu que la plupart des isolats tolèrent une acidité de pH= 5,5 à 6,0 et que leur croissance a augmenté en milieu alcalin. D'autres *Rhizobia* isolés en Égypte peuvent croître à un pH allant de 6 à 8 avec une certaine tolérance à un pH 3.5 - 4,0 (**ZAHARAN et al, 2012**). La tolérance des *Rhizobia* à l'acidité varie en fonction des espèces et même d'autres souches à la même espèce. L'effet de l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des *Rhizobia*. En effet la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. D'autres études ont montré que les *Rhizobia* à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité. Des souches des mêmes espèces peuvent montrer une large variation de tolérance au pH (**BENSELAMA, 2015**). D'après, **CORREA et BARNEIX (1997)**, la résistance aux pH acide ou alcalin n'est pas corrélée avec le temps de croissance des souches et la capacité de produire des substances alcalinisantes ou acidifiantes du milieu. (**IDJER ET LAIDI, 2016**). En outre, **GLENN et DILWORTH (1994)** ont rapporté que le groupe des souches bactériennes à croissance rapide a tendance à tolérer des milieux basiques allant jusqu'à un pH de 10. Dans ce sens, **RAO et al. (1994)** ont isolé des *Rhizobia* de pois pouvant tolérer des pH supérieurs à 11,5 (Dhane Fitouri, 2011). En effet, La tolérance des *Rhizobia* à pH acide dépend de leur capacité de maintenir le pH intracellulaire entre 7.2 et 7.5, même à un pH acide externe. Des différences dans la composition en lipopolysaccharides, accumulation des polyamines cellulaires ont été associés à la croissance des cellules à pH acide (**SEBIHI, 2005**).

Bien que la plupart des isolats sont considérés comme halotolérants pouvant croître dans des concentrations de NaCl variant de 3% à 10%, l'isolat M7a montré une faible croissance dans toutes les concentrations incluant celle de 3%. De même, **BELHADJISSA et BENBITOUR**

(2017) montrent que les isolats tolèrent jusqu'à 8% de salinité, rien que d'autres croient dans une salinité élevée (10%). En effet, le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs. Certains auteurs ont rapporté que les *Rhizobia* sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (SEBIHI, 2005). BOUDAD(2015), constate, de même, que la variation de cette tolérance à la salinité est liée à la variation de la vitesse de croissance chez les souches rhizobiens.

La coloration jaune parvenue en présence de bleu de bromothymol (BTB) qui a été notée chez tous les isolats met en évidence l'acidification du milieu de culture. Cependant, les résultats obtenus par BELHADJISSA et BENBITOUR (2017) laissent supposer que parmi les isolats testés, il y en a ceux qui sont alcalinisantes. Les *Rhizobia* de *Pisumsativum* L. de la région de Bejaia peuvent avoir de même les deux types de réaction (acidification et alcalinisation) (BELHADJ ET OULDYUCEF, 2017 ; SANDEEP *et al.* 2015). Cependant, les souches à croissance rapide sont considérées comme bactéries acidifiante. Elles devraient, par conséquent, changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (BELLIRDARINE ET ZIADA, 2014).

Les halos clairs observés pour tous les isolats testés mettent en évidence la capacité des isolats solubiliser le phosphore tricalcique (Ca_3PO_4) contenu dans le milieu PVK. En effet, le test consiste à sélectionner les microorganismes capables de produire des zones claires autour des colonies microbiennes dans un milieu de base contenant le phosphate tricalcique (TCP) comme seule source de phosphore. Les zones claires sont dues par, conséquent, à la production des acides organiques dans le milieu entourant les colonies en question (HATIM, 2015). La capacité bactéries rhizosphériques à solubiliser les phosphates insolubles. Dans cette étude, un indice de solubilisation assez important est noté chez les isolats d'arachide pouvant atteindre même les 400%. Dans ce contexte, l'activité solubilisatrice évaluée chez un certain nombre de souches de *Rhizobium* a révélé un IS compris entre 248 pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *Vicia* et 141% pour *Mesorhizobium ciceri*, *M. mediterraneum* et *Sinorhizobium meliloti* (ALIKHANI *et al.*, 2006 in HATIM, 2015). Ainsi, HATIM., (2015) ont pu identifier une espèce *Rhizobium ssp* isolée à partir des nodules racinaires d'Acacia caractérisée par un pouvoir de solubilisation du phosphate tricalcique élevé, avec un IS de 200%.

L'utilisation des antibiotiques agents de l'inhibition sélective des bactéries GN, AMP et AMX montre la capacité de *Rhizobium* à la résistance pour AMP et AMX mais pas pour la GN. Les antibiotiques agissent globalement sur les enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) et sur la synthèse des protéines et des acides nucléiques par des mécanismes spécifiques. Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type de l'antibiotique (RAMDANE ET BOUKARANA, 2016). L'effet semblable de l'amoxicilline et ampïcilline peut se déduire qu'elles appartiennent à la même famille β -lactamines, sous famille pénicilline et au groupe d' amino-pénicillines (pénicilline du groupe A) (DELPHINE, 2008). En effet, L'amoxicilline a un spectre d'activité très similaire à celui de l'ampïcilline (BERNIER, 2008). En revanche, la gentamicine appartenant à la famille des aminoglycosides (DEREDJIAN, 2013). Le mécanisme de résistance aux antibiotiques le plus répandu chez les bactéries Gram négatives est l'inactivation extra ou intracellulaire de l'antibiotique, ce qui aboutit à la perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. La résistance intrinsèque aux antibiotiques a été étudiée aussi bien chez les souches de *Rhizobium*. Le degré de résistance des souches aux antibiotiques peut varier d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (BENSELAMA, 2015). La résistance aux antibiotiques peut s'exprimer au travers de plusieurs mécanismes : production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique ou encore, imperméabilisation de la membrane de la bactérie. Certaines bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques. On parle de résistance innée. Leur patrimoine génétique les rend insensibles à un certain nombre d'agents (BENJIRA, 2016).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail vient de mettre au point la caractérisation des isolats rhizobiens adaptés aux conditions environnementales stressantes, pouvant améliorer la productivité de la culture d'arachide en améliorant la fixation symbiotique d'azote et la solubilisation des phosphates dans les sols calcaires des régions arides.

Pour ce faire, six isolats bactériens, récoltés à partir des nodules d'arachide cultivée dans la région de Mansoura, ont été soumis à des tests physiologiques, d'antibiogramme et de solubilisation de phosphate tricalcique.

Les résultats obtenus relatifs à la variation de la croissance des isolats en fonction de pH du milieu montrent que la totalité des isolats ont un optimum de croissance dans un pH = 6.8. Certains isolats ont révélé une croissance assez importante à un pH acide (pH=4) mais pas pour un pH fortement alcalin (pH=12). L'isolat M4a avait, par contre, une performance de croissance, aussi bien dans des pH acides qu'alcalins.

Bien que les isolats rhizobiens testés ont montré une croissance optimale dans une concentration de NaCl = 1%, la plupart sont considérés comme halotolérants, vu qu'ils ont maintenu leur croissance au seuil de 10% de NaCl.

Le test BTB nous amène à constater le pouvoir acidifiant des isolats du milieu YMA. Ceci est essentiellement dû à leur croissance rapide, ce qui nous oriente vers le genre *Rhizobium* lors d'un éventuel processus d'identification.

Les isolats ont révélé, dans cette étude, une résistance assez importante à l'Amoxicilline et à l'Ampicilline, mais une sensibilité par contre à la Gentamicine.

Le test de solubilisation du phosphate tricalcique, nous laisse à constater que les isolats possèdent un pouvoir élevé de solubilisation lorsque le phosphore est présent dans sa forme insoluble.

L'approche multivariée (AFC et CAH) utilisée dans ce présent travail nous a permis de repérer un groupe d'isolats (M3a et M4a) à croissance performante par rapport à tous les facteurs des tests examinés.

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent la piste vers de perspectives intéressantes. A cet effet, nous recommandons :

Conclusion

- ☒ D'étudier la capacité de ces rhizobactéries à tolérer les différentes conditions de stress environnemental telles : la salinité, le pH, en utilisant d'autres gammes de seuil.
- ☒ D'exploiter les bactéries solubilisatrice des phosphates dans les champs, à travers l'inoculation des plantes par des produits biofertilisants à base de souches solubilisatrice de phosphore, afin de contribuer à la lutte contre l'utilisation intensive des engrais et des pesticides chimiques en agriculture .
- ☒ De mieux approfondir dans les tests d'antibiogramme surtout sur le groupe de gentamicine.
- ☒ D'explorer les résultats par d'autres approches de caractérisation et de procéder à la caractérisation moléculaire afin d'arriver à des souches rhizobiens bien identifiées.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

- 1) AIT OUALI, K.2011.etude de comportement de quelques population d'arachide (*Arachis hypogaea* L) vis_à vis du stress hydrique approche physiologique et agronomique. Diplôme Magister. École Nationale supérieur d'Agronomie (E.N.S.A). El harrach-alger.pp78
- 2) ALIKHANI H.A., SALEH-RASTIN. N and ANTOUN .H. (2006).phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: first international Meeting on Microbial phosphate solubilization. Developments in plant and soil sciences, Vol 102.Springer, Dordrecht.
- 3) ALLEIDI, I, .2014. C caractérisation morphologique des accessions d'arachide (*Arachis hypogaea* l.) pour la teneur en huile ET la tolérance a la sècheresse. Mémoire master.université d'Ouagadougou (UO), Burkina Faso.
- 4) AMEUR, H.2014. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de Streptomyces et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1.Sétif.pp03.
- 5) AMMAR, W., 2010 .étude de l'interaction entre les souches rhizobiennes par production substances inhibitrices bactériocines. thèse de magister. université d'oran ES-Senia.oran.pp03-04-05.
- 6) AMRANI,A.2009.effet de la double inoculation *Rhizobium*-Champignons mycorrhiziens sur la croissance de la féderole et du haricot nain.thèse de magister.université d'oran Es- Sénia.Oran.
- 7) AMRI TILIOUINE, W., 2007, étude de la symbiose à *Rhizobium* chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)aspects microbiologique, physiologique, et agronomiques. Thèse de magister .Institut National Agronomique - El Harrach – Alger.pp14-17-18
- 8) BARGAZ, A., 2012. Caractérisation Agrophysiologique Et Biochimique De Symbioses Haricot (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobia* Performantes Pour La Fixation Symbiotique De L'Azote Sous Déficit En Phosphore. Thèse de doctorat. Université CADI AYYAD, Marrakech, Maroc .pp146.
- 9) BELHADJ, N., et OULDYOUCEF, k.2017. Caractérisation phénotypique des Bactéries isolées des nodules de Pisumsativum l. mémoire master. Université a. mira – Bejaia, Bejaia
- 10) BELHADJAISSA, M, M. et .BENBITOUR, I. (2017).caractérisation de certains souches de *Rhizobia* associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) à haut potentiel de solubiliser le phosphore dans la région de Ghardaïa. Mémoire de master.université de Ghardaïa. Ghardaïa.
- 11) BELLIRDARINE, N et ZIADA, M., 2013. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineusePisumsativumL.cultivéedans différents écosystèmes de l'Estet Centre Algérien .Mémoire de Master. Université Constantine1, constantine.pp64.

- 12) BENAGGAB AMAR, R., 2011. nutrition azotée sous déficience en phosphore chez le niébé (*vigna unguiculata* sub. *Sp unguiculata*.L. Walp) .diplôme Magister. École Nationale supérieur d'Agronomie (E.N.S.A). El harrach-alger.pp78.
- 13) BENJIRA, L.2016. Etude de la prescription d'antibiotique chez l'enfan.Mémoire despecialite en medecine.Université sidi mohammed ben abdellah. Fes.Maroc.pp15.
- 14) BENSELAMA, A. 2015.Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureuse* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-senia.Oran.pp55.
- 15) BERNIER, D.2008. Étude et modélisation de la cinétique orale de l'amoxicilline chez le porcelet sevré.Thèse grade deMaître ès sciences (M.Sc).en sciences vétérinairesèse.Université de Montréal.Canada.pp2.
- 16) BIDI, A., OUAMEKH, M., 2015. Criblage de souches d'actinomycètes solubilisant le phosphate Identification moléculaire de deux souches du genre *Streptomyces*. mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine.pp78
- 17) BOUDAD, I, 2015. Isolement, Purification et étude de la diversité phénotypique des bactéries endophytes nodulaires et racinaires isolées de certaines plantes légumineuses .mémoire MASTER. UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH .Fès. Pp 30.
- 18) BOUDANGA, L., 2011.étude de la performance de la symbiose fève (*vicia faba*) *Rhizobia* cultivée sous différents niveaux du phosphore du sol et sélection des souches locales à haut potentiel de solubilisation du phosphore. Thèse de master.université CADI AYAD, Marrakech, Maroc
- 19) BOUDJENANA,A et MANSOUR,M.2014.caractérisation phénotypique des bactéries hotes de la légumineuse médicinale *Trigonella foenum* L.(Fenugrec).mémoire de master.université constantine1.constantine.
- 20) BOUHANIA, R et ZEHRI, S., 2005. étude comparative de deux types d'engrais phosphatés sur céréales à pailles (orge) dans la région d'oued Righ (station el-Arfiane). du diplôme d'ingénieur. université d'Ouargla, Ouargla.
- 21) CORREA O.S ET BARNEIX A.J. (1997).Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World J. Microbial. Biotechnol. 13, 153-157
- 22) DELPHINE,B. 2008.Impact des bêta- lactamines sur l'émergence d'entérobactéries résistantes dans la flore digestiveChez le porc:caractérisation et stratégie de prévention.Thèse de doctorat. université toulouse III.France.pp26
- 23) DHANE FITOURI, S.2011. diversités phénotypique et moléculaire des Microsymbiote du Sulla du nord (*hedysarum coronarium* l.) et sélection de souches *Rhizobial* efficaces. Doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de Tunisie. Tunisie.

- 24) DIOUF, A., 1997 . caracterisation et utilisation de souches de *Rhizobium* isolees du haricot vert (phaseolus vulgaris) dans la zone des niayes au senegal. thèse de doctorat.université cheikh anta diop dakar (ucad).pp05
- 25) DJEGHAR, H., DJEGHAR, I., 2014.comparaison de quatre milieux pour la culture de bactéries minéralisant le phytate .mémoire master. Université constantine1, Constantine.pp49
- 26) DOUCOURÉ, F.1999. Utilisation d'une souche mutante pour l'identification de variétés d'arachide tolérantes à aspergillus Flavius et à la production d'aflatoxines. Diplôme d'ingénieur agronome. École nationale supérieure d'agriculture. SENEGAL.
- 27) FECIH, T.2016.Effet des différents facteurs prédominants dans les sols sahariens sur la croissance des souches autochtones de *Sinorhizobium S.meliloti*. Mémoire de master. Université Kasdi Merbah-Ouargla.Ouargla.pp39
- 28) FIHAKHIR H ., 2012, Problèmes agro-hydrauliques posés par la mise en valeur des sols des zones de SEBSEB. mémoire de fin d'études. université KASDI MERBAH – OUARGLA
- 29) GHANIMI, R., 2014. Analyse agro-physiologique de la réaction de la symbiose fève-*Rhizobia* sous déficit en phosphore. Mémoire master. Université CADI AYYAD, Marrakech.pp42.
- 30) GLENN A. R. and DILWORTH M. J. 1994. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. FEMS Microbiol. Lett. 123:1-10.
- 31) HATIM, S., 2015. Activités enzymatiques et pouvoir solubilisateur du phosphate chez les bactéries fixatrices d'azote nodulant quatre espèces d'Acacia. mémoire de fin d'études. université sidi mohamed ben abdellahfes. Maroc.pp44
- 32) IDJER, S et LAIDI, F.2016. Caractérisation physiologique des bactéries endosymbiotiques à intérêt environnemental. Memoir MASTER. Université A. MIRA – Béjaïa, Bejaia.pp 51
- 33) JEAN-JACQUES, D. Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote et phytases des nodules de légumineuses. Innovations Agronomiques, INRA, 2017, 60, pp.3-10.
- 34) JORDAN, D.C. (1984) - family iii. *Rhizobiaceae* conn 1938. p. 234-254. In: n.r. kreig and j.h. Holt (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams &wlikins co. Baltimore.
- 35) KAILOUA .A et GRAIRI .I.2015. Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques.Identification de souches représentatives. Diplôme de Master. Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine
- 36) KENENI, ASEFA, PRABU, P. C., ET ASSEFA, F. Characterization of acid and salt tolerant *Rhizobial* strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, vol. 12, p. 365-376.

- 37) KHALLEF, L. R et BENDANA, R I., 2016. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine. Thèse de master. Université des Frères Mentouri. Constantine.pp05-07.
- 38) KULKARNI, S., & NAUTIYAL, C. S. (2000). Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 nodulating *Prosopis juliflora*. Current microbiology, 40(4), 221-226.
- 39) LAZALI, M., 2009. Etude de la symbiose à *Rhizobium* chez l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) cultivée sous contrainte hydrique: aspects morpho-physiologiques et agronomiques. thèse de mastere. Institut National Agronomique, El Harrach, Alger.pp 10-11
- 40) LEFEBVRE S., 2003, Interface eau-sédiments des cours d'eau en région agricole: Rôle dans les cycles biogéochimiques, Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1., 288.
- 41) MAOUGAL, R T., 2004. Techniques de production d'inoculum *Rhizobial*. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) : Inoculation et nodulation. Thèse de magister. Université Mentouri, Constantine.pp13.
- 42) MAOUGAL, R T., 2004. Techniques de production d'inoculum *Rhizobial*. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) : Inoculation et nodulation. Thèse de magister. Université Mentouri, Constantine.pp13
- 43) MOUAFEK, A. 2010. La symbiose à *Rhizobia* chez la fève (*Vicia faba L.*) et La luzerne (*Medicago sativa L.*) dans la région de Biskra. *Masters*
- 44) PIKOVSKAYA, R. I., 1948. Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologia*. 17: 362 – 370
- 45) PUJIC P., NORMAND P., 2009 : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Bio feture* 298 pp 26-29.
- 46) RAMDANE. I et BOUKARANA, I. K.2016. Sélection des souches rhizobiens efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa L.*).Mémoire MASTER. Université KASDI MERBAH-OUARGLA, OUARGLA.pp95.
- 47) RAODLN, GILLER K.E., YEO A.R. and FLOWERS T.J. 2002. The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicerarietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563-570
- 48) RAZA S., JØRNSGARD B., ABOU-TALEB H., CHRISTIANSEN J.L. (2001). Tolerance of Brady *Rhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32 (6):379-383.

- 49) SAADI, S., 2009, détection et caractérisation de bactériocines produites par des souches de *Rhizobia* contre des souches de pseudomonas (*P.savastanoi* et *P. syringae*) phytopathogènes. thèse de magistère, université d'oran ES-Senia, Oran.pp06
- 50) SANDEEP, P. U., NAVNEET, P., ET GAURAV, M. (2015). Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar, India. nusantarabioscienc e. Vol. 7, No. 2, pp. 73-76
- 51) SAOUDI, M., 2007. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine, Constantine.pp37
- 52) SEBIHI, F, Z., 2005. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister .Université Mentouri de Constantine.alger.pp67.
- 53) SILINI,A.2013.effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du ble dur en milieu salin.thèse de doctorat .université deFerhat abbes sétif.Sétif.
- 54) SOBTI,S.2013.Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité.mémoire de masteuniversity kasdi merbah, ouargla.Ouargla.
- 55) STEPHANIE, Y., 2008. L'analyse de la filière arachide dans la région du Sud-Ouest malgache : outil d'appui à la réflexion stratégique d'une organisation paysanne régionale. thèse d'ingénieur, institut des régions chaudes montpollie, montpollie.pp12-14
- 56) TAKTEK, S., 2015. Dissolution biologique des phosphates : Interaction bactéries – mycorhizes. Thèse de doctorat. . Université LAVAL, Québec, Canada.pp128
- 57) VINCENT J.M., 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBPhandbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England
- 58) YOUMNA, H.2017. Contribution à l'évaluation des performances des *Rhizobia* nodulant la fève (*vicia faba l.*) au Maroc à solubiliser le phosphate inorganique. Thèse de doctorat. Université Mohammed v rabat, Maroc
- 59) ZAHRAN, H.H., ABDEL-FATTAH, M., YASSER, M.M., MAHMOUD, A.M. and BEDMAR, E.J. (2012) Diversity and Environmental Stress Responses of *Rhizobial* Bacteria from Egyptian Grain Legumes. Australian Journal of Basic & Applied Sciences, 6, 571-583

Annexes

Annexes 01

Milieu de culture

La Composition de milieux YMA (VINCENT, 1970) (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970).

Mannitol.....	10
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,2
NaCl.....	0,1
Extrait de levure.....	0,5
Eau distillée.....	1000ml
Agar.....	18
PH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La Composition de milieux YMA (VINCENT, 1970)+BTB en g/ml

YMB.....	250ml
BTB.....	1.25ml
Agar.....	5g
PH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de ph on ajoute 1.25ml (0,125g BTB dans 25 ml éthanol), puis on ajoute l'agar.

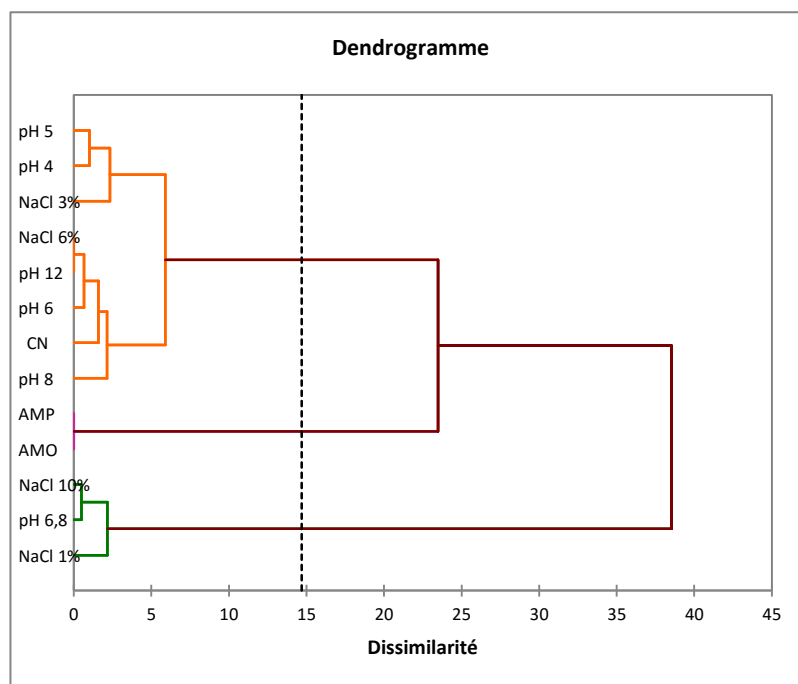
Composition du milieu de culture : Pikovskaya (1948)

Pour un volume de 1L+ BTB

Ca ₃ HPO ₄	0.7g
Glucose.....	10g
NaCl	0.2g
KCl.....	0.295g
FeCl ₃	0,003g
NH ₄ NO ₃	0.373g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.41g
Extraits de levures	3g
Agar.....	20g
PH	6.8 à 7

Annexes 02

Regroupement des caractères suivant la CAH



Résumé :

Cette étude consiste à mettre en évidence la caractérisation des Rhizobactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) cultivée dans la région de Mansoura (Wilaya de Ghardaïa). À partir du rôle que jouent les *Rhizobia* tant que pour la fixation biologique d'azote que pour l'augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs dans l'interface rhizosphériques, nous avons procédé à ce présent travail. Pour cela, six isolats rhizobiennes ont subi un certain nombre des tests biologiques et physiologiques (NaCl, pH, résistance aux antibiotiques, BTB et solubilisation de phosphore). Les résultats obtenu ont montré que les *Rhizobia* étudiés atteignent maximum de croissance à un seuil de 1% de NaCl et de pH 6,8. La capacité des pousser dans des milieux contenant de l'Amoxicilline et de l'Ampicilline a été aussi révélée. Cependant, les halos clairs que les isolats montrent dans le milieu PVK, exprime une capacité de solubilisation du phosphate tricalcique pour tous les isolats testés.

Mots clés : *Arachis hypogaea*, *Rhizobium*, symbiose, phosphore, solubilisation, Ghardaïa

Abstract

This study consists in highlighting the characterization of the Rhizobacteria that have been isolated from root nodules of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) grown in the area of Mansoura (town of Ghardaïa). From the role played by *Rhizobia* as well as the biological fixation of nitrogen to the increase of nutrient availability in the rhizosphere. For this, we preceded this work. Six rhizobial isolates have undergone a number of biological and physiological tests (NaCl, pH, antibiotic resistance, BTB and phosphate solubilization). The results obtained showed that the *Rhizobia* studied reach maximum growth at a threshold of 1% NaCl and pH 6.8. The ability to grow in media containing Amoxicillin and Ampicillin has also been revealed. However, the clear halos that the isolates show in the PVK medium, expresses a solubilization capacity of tricalcium phosphate.

Key words: *Arachis hypogaea*, *rhizobia*, symbiosis, phosphate, solubilization, Ghardaïa

الملخص

هذه الدراسة تهتم بخصائص البكتيريا الجذرية المأخوذة من جذور نبات الكوكاو في (*Arachis hypogaea*) المزرعة اقليم منصوره (ولاية غرداية) وذلك انطلاقا من دور الريزوبيا في التثبيت البيولوجي للأزوت الذي يؤدي لزيادة توافر المغذيات في واجهة الجذور. أجرينا هذا العمل على ست عينات من الريزوبيا التي خضعت لعدد من الاختبارات البيولوجية و الفيزيولوجية منها (ملوحة، الحموضة، المقاومة ضد المضادات الحيوية، ذوبان الفوسفور و ازرق البروموتيمول). النتائج المحصل عليها اظهرت ان النشاط الاعظمي للريزوبيا يكون عند 1% من تركيز الملح و درجة حموضة 6.8 كما انها قادرة على التكاثر في وسط يحتوي على الاموكسيسيلين و الامبيسيلين كما ان ظهور الهالات في الوسط بالنسبة لجميع العينات تظهر القدرة على اذابة الفوسفور ثلاثي الكلس).

لزيادة

كلمات مفتاح: *Arachis hypogaea*، ريذوبيا، تعايش، فوسفور، ذوبان، غرداية،