



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

Faculté des Sciences et Techniques Fès

Département des Sciences de la Vie



MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE

MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES

GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

**Isolement, Purification et étude de la diversité  
phénotypique des bactéries endophytes  
nodulaires et racinaires isolées de certaines  
plantes légumineuses**

Présenté par :

**BOUDAD Imane**

Le 25 Juin 2015 devant le jury composé de:

Pr. EL GHADARAOUI Lahsen	FST-Fès	Président
Pr. FAGHIRE Mustapha	FS-Agadir	Encadrant
Pr. HALOTI Said	FST-Fès	Coencadrant
Pr. MAAZOUZI Nadia	FST-Fès	Examinatrice
Pr. FADIL Fatima	FST-Fès	Examinatrice
Pr. BOURAADA Khalid	PMY-Fès	Examineur
Pr. EL HARCHLI El Hassan	FST-Fès	Examineur

**Année Universitaire : 2014/2015**

Faculté des Sciences et Techniques Fès

B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 📠 212 (35) 60 82 14

[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

## **FICHE PRÉSENTATIVE DU MEMOIRE**

- Nom et Prénom de l'auteur: **Imane BOUDAD.**

- Intitulé du travail: **Isolement, Purification et étude de la diversité phénotypique des bactéries endophytes nodulaires et racinaires isolées de certaines plantes légumineuses..**

- Encadrant:

- Nom, Prénom et Grade: **FAGHIRE Mustapha, Professeur Assistant- FSA.**
- Laboratoire des Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr (UIZ), B.P 8106, Cité Dakhla, 80000, Agadir, Maroc.

- Lieux de réalisation des travaux (laboratoires, institutions,...)

- Laboratoire des Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr.

- Période de réalisation du travail de thèse : **De 15 Février 2015 à 15 Juin 2015.**

Ce travail a donné lieu aux résultats suivants (publications, communications,...) :

### **Communications :**

Iman BOUDAD, Khadijattou TAOUFIQ, Mustapha FAGHIRE, 2015. Isolement, Purification et étude de la diversité phénotypique des bactéries endophytes nodulaires et racinaires isolées de certaines plantes légumineuses. Congrès international, Biotechnologie au Service de la Société "BioSeS 2015". **Soumise**

## DEDICACES

*Je dédie ce travail à*

*Ma mère, mon père, mes sœurs, mes frères et  
toute ma famille.*

*Tous mes proches et amis qui m'ont toujours  
encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, et mes  
camarades de formation pour tous ces agréables moments  
passés ensemble.*

*Touts ceux et celles que j'ai rencontré et qui m'ont aidé  
durant 5 ans des études universitaires. Sans vous aides et  
vous encouragement je ne serais pas arrivée à atteindre mes  
objectifs et d'avoir l'envie de continuer mes études.  
Cette réussite n'aurais jamais vu le jour sans l'appui  
moral et intellectuel des membres de ma familles et mes  
amis.*

*Merci à tous et à  
toutes.*

## ***REMERCIEMENTS***

*Au terme de ce travail, j'aimerais exprimer mon profond remerciement à mon encadrant Pr. **FAGHIRE Mustapha**, enseignant-chercheur à la faculté des sciences d'Agadir, pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses recommandations et ses discussions perspicaces ainsi que pour ses conseils qui ont beaucoup enrichi ma recherche au sein du laboratoire et contribué au bon achèvement de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier également le Pr. **HALOTI Said** pour m'avoir co-encadré au cours de la réalisation de ce travail.*

*Mon appréciation et ma gratitude s'adressent au Pr. **El GHADARAOUI Lahsen**, coordinateur du master Gestion et Conservation de la Biodiversité pour leur sympathie et leur encouragement durant la période d'enseignement.*

*Mes remerciements et ma gratitude s'adressent également à Pr. **HATIMI Abdelhakim** le responsable du laboratoire de Biotechnologies Végétales à la faculté des sciences d'Agadir de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire de Biotechnologies Végétales, pour leurs enthousiasmes, leurs aides et leurs conseils.*

*Je remercie enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.*

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure1</b> : Diversité des Légumineuses.....	<b>3</b>
<b>Figure 2</b> : Nodules racinaires, symbiose légumineuse_rhizobia.....	<b>7</b>
<b>Figure3</b> : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse..	<b>10</b>
<b>Figure4</b> : Le matériel végétal utilisé pour piéger les bactéries.....	<b>12</b>
<b>Figure5</b> : Les étapes d'isolement des bactéries symbiotiques.....	<b>13</b>
<b>Figure6</b> : Les étapes de la purification des souches.....	<b>13</b>
<b>Figure7</b> : Aspect des colonies bactériennes isolées sur milieu de culture YEM .....	<b>17</b>
<b>Figure 8</b> : Observation sous microscope (Gx100) des souches isolées Gram-.....	<b>19</b>
<b>Figure9</b> : Croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire et nodulaire de certaines légumineuses maraichères.....	<b>20</b>
<b>Figure 10</b> : Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot en fonction du temps.....	<b>21</b>
<b>Figure11</b> : Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire en fonction du temps.....	<b>22</b>
<b>Figure12</b> : Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire en fonction du temps.....	<b>23</b>
<b>Figure13</b> : Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot en fonction du temps.....	<b>24</b>
<b>Figure14</b> : Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire en fonction du temps.....	<b>25</b>
<b>Figure15</b> : Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire en fonction du temps.....	<b>26</b>
<b>Figure 16</b> : Solubilisation du phosphate inorganique par les souches isolées.....	<b>27</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau1</b> : Caractéristiques morphologiques des souches isolées.....	<b>18</b>
<b>Tableau2</b> : Résultats de la solubilisation du phosphate inorganique.....	<b>28</b>

## Résumé

Cette étude est menée au Laboratoire de Biotechnologies Végétales, faculté des sciences d'Agadir pour mettre en évidence la biodiversité de certaines endophytes bactériens de trois légumineuses. Le matériel végétal est des jeunes racines et nodules de certaines légumineuses maraichères en période de floraison (haricot, pois chiche et fève). 24 isolats sont isolés après une série de purification sur milieu YEM. Les résultats obtenus ont montrés une variabilité au niveau des souches isolées vis-à-vis du taux de croissance. On note qu'il n ya pas de différence remarquable entre la croissance des bactéries racinaires et celle nodulaires. En générale la croissance des souches dans le milieu à pH neutre est plus grande que celle aux pH trop acide ou basique et on remarque que la croissance des souches HR5, PR6, PN2, FR5 et FN3 est normale aux différentes valeurs de pH testées. Les résultats du test de la salinité montrent que la croissance des bactéries est inversement proportionnelle à la teneur en NaCl. On note aussi que les souches HR5, PR3, PN5, FR2, FN3 et FN4 ont le maximum taux de croissance et qui sont bien adaptée à ce stress. D'une autre part, le test de la solubilisation du phosphate à révélé que seul 6 parmi les 24 souches qui sont capables de solubilisé le phosphate organique (PR4, PN2, PN3, FN3, FR2 et FR5). Finalement, le test de coloration Gram a montré que la totalité des souches sont de Gram négatif.

Les souches HR5, PN2, FN3 et FR2 sont celles qui ont montré une meilleure performance en réponse aux différents paramètres étudiés, et peuvent être considérées comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes en symbioses. Par conséquent, ces quatres souches peuvent servir à la production de biofertilisants bénéfique pour d'autres plantes.

**Mots clés :** Biodiversité, endophytes bactériens, physiologie, légumineuses.

## **Abstract**

The study of biodiversity of certain bacterial endophytes of certain legumes, has been carried out through experiments in Plant Biotechnology laboratory at the Faculty of Science in Agadir. The plant material were young roots and nodules of certain garden legumes during flowering (beans, chickpeas and beans). 24 strains were isolated after purification on a series of YEM medium. The results obtained have shown a variability in isolated strains towards the growth rate. We noted that there is not remarkable difference between the growth of bacteria and the root nodule. In general the growth of the strains in neutral pH environment is greater than the growth in extreme pH and it is noted that the growth of stem HR5, PR6, PN2, FR5 and FN3 are normal in different tested pH values . The test results of salinity have shown that the lower the NaCl content is, the bigger the growth is. We have also noted that HR5 strains, PR3, PN5, FR2, FN3 and FN4 have the maximum growth rate and that they have shown better aaption to this stress. On the other hand, the test of the phosphate solubilization revealed that only 6/24 strains which are capable of dissolved inorganic phosphate (PR4, PN2, PN3, FR2 and FR5). Finally, the Gram test showed that all strains are Gram negative.

The HR5 strains, PN2, FN3 and FR2 are those that have shown better performance in response to the different studied parameters, and can be considered as promoting rhizobacteria of plant growth in symbiosis. Therefore, these three strains can be used to produce beneficial Biofertil others plants.

Keywords: Biodiversity, bacterial endophytes, physiology, legumes.

## ملخص

هذا البحث عبارة عن دراسة حول التنوع البيولوجي لبعض البكتيريات النباتية المتواجدة عند بعض البقوليات من خلال التجارب التي تم إنجازها في مختبر البيوتكنولوجيا النباتية بكلية العلوم بأكادير. المعدات النباتية المستعملة في هذا البحث عبارة عن جذور فتيّة وعقد جذرية لبعض البقوليات الاستهلاكية (الفاصوليا والحمص والفاصوليا). في فترة الإزهار خلال هذه التجارب، تم عزل 24 سلالة بعد تنقيتها على مراحل متتالية في الوسط YEM. وقد أظهرت النتائج التي تم التوصل إليها، اختلافا على مستوى السلالات المعزولة بالنظر إلى معدل النمو. كما سجلنا عدم وجود اختلاف ملحوظ بين نمو البكتيريا الجذرية و البكتيريا العقدية. وبشكل عام، نستنتج أن نمو السلالات في الوسط المحايد (pH=7) أكبر من نموها في الوسط الذي يتميز ب pH قصوى (حمضي أو قاعدي). أما فيما يخص مختلف قيم pH المختبرة، نلاحظ نموا عاديا بالنسبة للسلالات (أو الجذور) HR5، PR6، PN2، FR5 و FN3. وقد أظهرت نتائج اختبار الملوحة أنه كلما كان منسوب كلوريد الصوديوم ضعيفا كلما كان النمو أكبر بكثير، بالإضافة إلى أن كل من السلالات (أو الجذور) HR5، PR3، PN5، FR2، FN3 و FN4 لها معدل نمو عالي وأنها تكيفت بشكل جيد مع هذا الضغط. ومن ناحية أخرى، كشف اختبار ذوبان الفوسفات أن 6/24 من السلالات فقط، هي القادرة على تحليل الفوسفات غير العضوي (PR4، PN2، PN3، FR2 و FR5). في النهاية، أظهر اختبار جرام ان جميع السلالات (اختيار السلالات أو الجذور بحسب معنى المواد التي تتحدثين عنها فأنا لا أعرف ماذا تعني طبيعة هذه المواد) هي سلبية الجرام.

السلالات (أو الجذور) HR5، PN2، FN3 و FR2 هي تلك التي أظهرت نجاحا أفضل في الاستجابة لمختلف المعايير المدروسة، ويمكن اعتبارها مثل الريزوبكتيريا التي تسهل النمو التكافلي للنباتات. وبناء على ذلك، يمكن استخدام هذه السلالات (أو الجذور) الثلاث لإنتاج الأسمدة الحيوية المفيدة لغيرها من النباتات.

الكلمات المفتاح: التنوع البيولوجي، بكتيريا نباتية، علم وظائف الأعضاء، البقوليات.

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>I. Les légumineuses.....</b>	<b>2</b>
1. Systématique .....	2
2. Potentiel fourrager.....	2
3. Intérêts environnementaux.....	3
<b>II. La diversité des rhizobia.....</b>	<b>4</b>
1. Les rhizobia.....	4
2. Les microsymbiotes des légumineuses maraichères.....	4
3. Caractérisation des rhizobia.....	5
3.1 Les critères morphologiques.....	5
3.2 Les critères physiologiques .....	5
3.3 Les critères symbiotiques .....	6
3.4 Les critères biochimiques .....	6
3.5 Les caractéristiques écologiques .....	6
<b>III. Symbiose légumineuse-rhizobia.....</b>	<b>7</b>
1. La nodulation.....	8
1.1 Les étapes de la nodulation .....	8
a. Echange de signal d'infection.....	8
b. Infection.....	9
c. Développement du nodule .....	9
2. Spécificité symbiotique .....	9
3. Facteurs qui influencent la fixation symbiotique .....	10
3.1 Facteurs abiotiques .....	11
a. Le stress salin .....	11
b. Le stress hydrique .....	11
c. Le pH du sol .....	11
3.2 Effet des techniques culturales sur la fixation symbiotique....	11
a. Effet de la fertilisation chimique.....	11
b. Effet du travail du sol .....	12

4. Effet des bactéries amélioratrices de la croissance des plantes ...	12
<b>Matériel &amp; Méthodes</b>	
<b>I. Le matériel végétal.....</b>	13
<b>II. Isolement et purification des souches de rhizobia.....</b>	13
1- Technique d'isolement et purification .....	13
2- Milieu d'isolement ou de culture .....	15
3- Conservation des souches .....	15
<b>III. Caractérisation phénotypiques des souches isolées .....</b>	15
1- La morphologie .....	15
2- Test de croissance .....	15
3- Tolérance à la salinité .....	15
4- Tolérance au pH .....	16
<b>IV. Caractérisation biochimique des souches isolées .....</b>	16
1- La coloration de Gram .....	16
2- Solubilisation du phosphate .....	17
<b>V. Analyses statistiques .....</b>	17
<b>Résultats</b>	
1- Description des isolats .....	18
1.1 Caractéristiques observées .....	18
1.2 Coloration de Gram .....	20
2- Caractérisation phénotypique et biochimique .....	20
2.1 Test de croissance .....	20
2.2 Tolérance à la salinité .....	22
2.3 Tolérance au différents pH.....	25
2.4 Solubilisation du phosphate .....	28
<b>Discussion.....</b>	30
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	32
<b>Références bibliographiques.....</b>	33
<b>Annexe.....</b>	38

## Introduction

Les végétaux, par le biais de ses racines, assimilent des minéraux du sol et l'eau nécessaires à leur croissance, mais aussi vont sécréter dans le sol des exsudats racinaires issus de la photosynthèse (Somers et Vanderleyden 2004). Ces rhizodépôts, sont une source d'éléments nutritifs qui vont stimuler la croissance et l'activité d'une partie des microorganismes situés dans la rhizosphère (Hartmann et al. 2009). La rhizosphère est la zone du sol entourant les racines qui est directement et indirectement sous leur influence physique, chimique et biologique et qui présente une forte activité microbienne. La rhizosphère donc est un site d'interactions intenses entre le sol, le végétal et les microorganismes. Ces interactions peuvent être bénéfiques (symbioses), neutres ou délétères (parasitisme, prédation, antagonisme) (Raaijmakers et al. 2009).

Les symbioses plantes-microorganismes, sont de deux types : la symbiose mutualiste et la symbiose associative. Les symbioses mutualistes les plus courantes sont les symbioses fixatrices d'azote impliquant des Fabacées avec les rhizobia. La symbiose associative est une interaction facultative, à plus large spectre d'hôte, et avec peu ou pas de différenciation des partenaires. L'exemple le mieux connu de cette dernière, est celui des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes, ou Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR).

Ces bactéries présentent un intérêt agronomique important, car leur utilisation pourrait permettre de diminuer les apports d'engrais ou de pesticides chimiques. Qui ont pour effet d'inhiber le développement des phytopathogènes et sont aussi connues pour leur effet d'améliorer la santé et stimuler la croissance des plantes.

L'objectif donc de ce travail est l'étude de ces bactéries indigènes symbiotique de trois légumineuses par la mise en évidence leur biodiversité phénotypique. Donc, ceci consiste à isoler et purifier ces bactéries symbiotiques, afin de révéler la diversité phénotypique et physiologique de ces bactéries à partir des tests biochimiques et enfin, de constituer une banque de ces isolats bactériens.

Le présent mémoire comporte trois parties qui sont indiqués ci-dessous:

**Parties I :** Revue bibliographique rapportant l'importance de la symbiose plantes microorganisme.

**Parties II :** Matériel et Méthodes utilisés pour atteindre les objectifs de cette présente étude.

**Parties III :** Résultats et discussion de cette présente étude.

## Revue bibliographique

### I. Les légumineuses

#### 4. Systématique

Les légumineuses ou *Fabaceae* constituent l'un des groupes les plus importants parmi les angiospermes, elles sont des eudicotylédones à gousses (Sprent, 1995). Elles correspondent à la troisième grande famille des angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006).

En classification classique, en se basant sur la forme florale (différences florales), ce groupe de plantes correspond à la famille des *Leguminosae* avec trois sous-familles : *Mimosoideae*, *Papilionoideae* (monophylétiques) et *Caesalpinioideae* (paraphylétique) (Taubert, 1894 ; Guignard et Dupont, 2005).

La classification taxonomique postérieure a mis dans l'ordre des fabales ces sous-familles des légumineuses qui sont, les *Mimosaceae*, les *Caesalpinaceae* et les *Fabaceae*. Actuellement on accepte la classification des légumineuses dans la famille des *Fabaceae* qui comprend 20 000 espèces distribuées en trois sous-familles, *Faboideae*, *Mimosoideae* et *Caesalpinioideae*.

Les *Faboideae* et les *Mimosoideae* constituent le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000) en formant généralement des nodules racinaires et occasionnellement caulinaires (Allen et Allen, 1981).

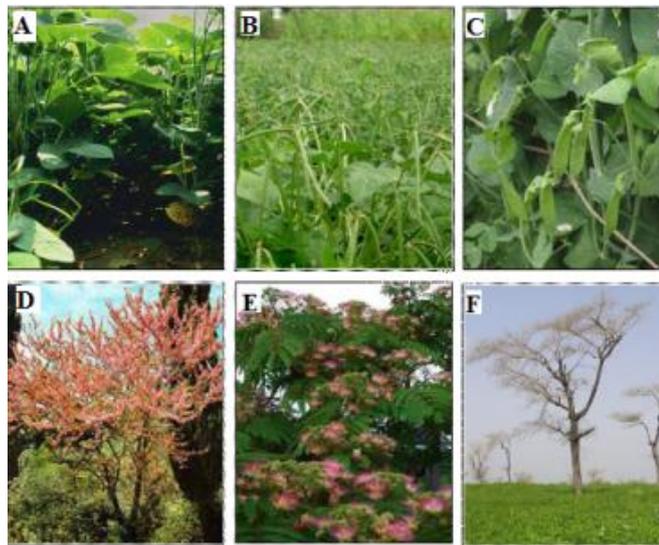
#### 5. Potentiel fourrager

Les plantes de la famille des légumineuses présentent un grand intérêt économique et fourrager.

Certaines espèces fourragères peuvent être cultivées dans des terrains pauvres en azote et servir comme d'excellents engrais biologiques. C'est le cas de l'acacia (*acacia* spp.), les trèfles (*trifolium*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'esparcette (*Onobrychis viciifolia*), et les lupins (*Lupinus*). D'autres sont cultivées pour leur grande valeur alimentaire grâce à leur haute teneur en énergie et en protéines comme la fève (*Vicia faba*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et les haricots (*Phaseolus*) (figure 1). Parmi les plantes ligneuses des légumineuses on cite le robinier faux-acacia (*Robinia*

*pseudoacacia*), utile pour le reboisement et le repeuplement des sols dégradés, les légumineuses contiennent aussi des plantes ornementales comme la pluie d'or (*Laburnum anagyroides*) et la glycine (*Wisteria sinensis*) (Chiej, 1983; Strasburger et al., 1994). Certaines légumineuses arbustives jouent un rôle important dans les systèmes sylvo-pastoraux en présentant un intérêt fourrager indéniable, c'est l'exemple des cytises (Bourbouze, 1980, Le Houerou, 1980).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne, féverole...). Elles constituent aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène).



**Figure 1 : Exemple des Légumineuses**

A. Glycine max, le soja (Papilionoideae); B. Vigna unguiculata, le niébé (Papilionoideae) ; C. Pisum sativum, le pois cultivé (Papilionoideae) ; D. Cercis siliquastrum (Caesalpinoideae) ; E. Albizia julibrissin (Mimosoideae); F. Acacia albida (Mimosoideae) (ERNIE, 2008).

## 6. Intérêts environnementaux

En plus de son haut potentiel de production fourragère, le groupe des légumineuses offre la possibilité d'améliorer la teneur en matière organique et de maintenir une richesse en azote du sol (Stringi et al., 1998 ; Ben Jeddi ; 2005).

Certaines espèces de cette famille peuvent entrer en symbiose avec une bactérie du genre Rhizobia, pour permettre la fixation de l'azote atmosphérique. Alors et grâce à cette symbiose, les plantes de cette famille peuvent croître et s'adapter à des sols dégradés et très pauvres en azote. (FerlandWathan, 1967).

Les légumineuses à graines restent toujours une part importante de l'alimentation particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme (Broughton, 2003 ; Kangfu, 2011).

## II. Diversité des rhizobia

La fixation biologique de l'azote est un processus exclusif aux procaryotes. Dans le domaine des archaea, elle se produit uniquement dans le phyla des euryarchaeota alors que dans le domaine des Bacteria elle se produit dans 6 des 50 phyla décrits jusqu'à présent (Raymond et *al.*, 2004): qui sont les bactéries vertes sulfureuses, les cyanobactéries, les Gram positives à faible et à fort contenu en G et C, les spirochaetes, les firmicutes et les Proteobacteria. Dans cette dernière subdivision se trouve le plus grand nombre de diazotrophes (Hugenholtz et *al.*, 1998; Rappe et Giovannoni, 2003) et à laquelle appartient tous les rhizobia connus.

### 3. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol, appartenant à la famille des Rhizobiaceae, ils sont des Gram négatifs, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992). Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7 (Burton, 1985).

Quelques auteurs considèrent les rhizobia comme des bactéries qui sont capables de noduler. D'autres distinguent entre les vrais rhizobia appartenant à la classe des *Alphaproteobacteria* et qui inclut actuellement 5 genres: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, et les bactéries non-rhizobia mais qui sont capables aussi de noduler et elles sont constituées des souches de quelques espèces appartenant aux classes Beta et Gammaproteobacteria et qui incluent les genres *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Cupriavidus* et *Burkholderia*.

### 4. Microsymbiotes des légumineuses maraichères

Le *Rhizobium leguminosarum* a été la première espèce reconnue du groupe (Frank, 1889) avec trois biovars (Jordan, 1984) : qui sont *Rhizobium leguminosarum* biovar *Viciae* qui nodule les genres *Pisum*, *Viciae*, *Lathyrus* et *Lens*; *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* qui nodule le genre *Phaseolus* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* qui nodule le

genre *Trifolium*. Il est important de signaler que chez cette espèce, les gènes de fixation, de nodulation ainsi que ceux de la spécificité de l'hôte sont localisés au niveau du plasmide, par conséquent la désignation biovar reflète des caractéristiques plasmidiques et non chromosomiques.

#### 4. Caractérisation des rhizobia

Plusieurs études ont été réalisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobia. Ces études ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce (De Lajudie et *al.*, 1994; Faghire et *al.*, 2012).

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, physiologiques et écologiques. (Graham et *al.*, 1991). Ces critères sont très utiles dans l'identification courante des microorganismes et fournissent une information phylogénétique de manière indirecte.

##### 4.1 Critères morphologiques

Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme).

Parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobia, figurent la croissance dans le milieu YEM (Vincent, 1970), ce critère est sur lequel a été basée la première classification des bactéries symbiotiques fixatrices de l'azote en deux genres qui sont *Rhizobia* et *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). En fait, les souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* possèdent un temps de génération inférieur à 4 heures et forment des colonies circulaires convexes généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours sous des conditions optimales d'incubation. En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un temps de génération de 6 à 8 heures et forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation.

##### 4.2 Critères physiologiques

Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'acides aminés, la tolérance à différentes concentrations en sels et aux

variations du pH, la croissance à différentes températures, la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, etc...

#### 4.3 Critères symbiotiques

Ils indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche. Les propriétés symbiotiques ont été longtemps la base unique de la caractérisation des rhizobia et de leur regroupement en « groupe d'inoculation » en fonction de la ou des légumineuses nodulées.

L'infectivité d'un rhizobia s'exprime par sa spécificité à travers sa capacité de noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées (Faghire et al. 2011, Bargaz et al 2011).

L'efficacité est la capacité de réduire efficacement l'azote atmosphérique en ammonium. Différentes techniques d'estimation de l'efficacité sont disponibles, trois sont les plus utilisées, la méthode Kjeldahl qui permet de mesurer l'azote total de la partie végétative de la plante, la méthode de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) qui permet d'évaluer l'activité de la nitrogénase par l'apport de l'acétylène comme substrat et par la mesure de l'éthylène dégagé comme produit de réduction final, et la troisième méthode consiste à déterminer le poids sec de la partie végétative des plantes inoculées par la souche à tester comparativement au témoin non inoculé (Faghire et al. 2011).

#### 4.4 Critères biochimiques

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différentes enzymes telles que le glutamate déshydrogénase, le glucose 6-phosphate déshydrogénase, l'indole-phénol oxydase, le nitrate réductase, l'uréase, l'adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliquées dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés. Ils sont très utiles en raison de leur rapport direct avec la nature et l'activité des enzymes et protéines de transport microbiennes. Puisque les protéines sont des produits génétiques, l'analyse de ces caractéristiques est une comparaison indirecte des génomes microbiens

#### 4.5 Caractéristiques écologiques

Les caractéristiques écologiques sont celles qui affectent la relation de l'organisme avec l'environnement, parmi les caractéristiques écologiques on cite la nature des relations symbiotiques, l'habilité à causer des maladies à différents hôtes et les préférences à différents habitats.

Elles sont importantes du point de vue de la biodiversité, puisque les microorganismes qui sont très proches phylogénétiquement peuvent se différencier significativement au niveau des caractéristiques écologiques.

### III- Symbiose légumineuse-rhizobia

Là où se développent des légumineuses indigènes, les rhizobia du sol ou les rhizobia endophytes des semences établissent une symbiose avec la légumineuse hôte (Giller, 2001). La symbiose légumineuse rhizobia est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobia pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote atmosphérique qui sera assimilé par la plante hôte (Raven et *al.*, 2000).

Grâce à cette symbiose une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée. A titre d'exemple, au Brésil l'inoculation du soja (*glycine max L.*) aux champs fournit jusqu'à 300 kg de N/ha, ce qui entraîne des économies d'engrais azotés estimés à 3 milliards de dollars (Santos et *al.*, 2006).

L'établissement de la symbiose entre le rhizobia et la plante légumineuses est un phénomène complexe. L'interaction symbiotique entre les bactéries rhizobia et les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry et *al.*, 2004).



**Figure 2** : Partie d'une racinaire d'une légumineuse avec nodosité.

## 5. Nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008; Lohar *et al.*, 2009). En présence des rhizobia, la plante émet des signaux par la production de flavonoïdes qui stimulent la sécrétion des facteurs *Nod* par les rhizobia (D'Haeze et Holsters, 2002).

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués suivant la persistance ou non du méristème. Les nodules à croissance indéterminée ont généralement un mode de croissance continue et les étapes de développement du nodule sont séparées dans l'espace et non dans le temps (Nap et Bisseling 1990). Ce type de nodules est caractéristiques des espèces des climats tempérés tels que *Medicago*, *Pisum*, *Vicia* et *Trifolium*. Par contre, les nodules à croissance déterminée sont observés chez les espèces tropicales (*Lotus*, *Glycine*, *Vigna* et *Phaseolus*). Ces nodules sont originaires d'un méristème qui détermine sa croissance durant une période de temps limitée. Cependant, les étapes de développement nodulaire sont séparées dans le temps (Nap et Bisseling, 1990).

### 5.1 Etapes de la nodulation

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003).

Au cours de cette interaction symbiotique, le macrosymbiote (légumineuse) comme le microsymbiote (rhizobia) mettent en jeu des changements morphologiques et physiologiques profonds qui, d'un point de vue moléculaire, sont contrôlés par l'expression coordonnée des gènes des deux organismes; ce sont des signaux moléculaires qui déclenchent la division des cellules corticales de la racine conduisant à la formation d'un nouvel organe différencié chez la plante, le nodule ou nodosité, c'est donc l'étape préliminaire de l'interaction entre les rhizobia et leurs plantes hôtes. Ensuite la phase symbiotique finale commence où les rhizobia qui occupent les nodules fixent l' $N_2$ .

#### a. Echange de signal d'infection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka et col, 2002). Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines de ces substances appartiennent au groupe des flavonoïdes

tels que les flavones, isoflavones et flavonones (Rasanen, 2002). Ce signal, une fois perçu par le rhizobia, induit la production de facteurs Nod (Oldroyd, 2001). Ces derniers sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca *et al.*, 2004).

### **b. Infection**

L'infection des racines peut avoir lieu à travers des poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Les facteurs Nod émis par les rhizobia, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques (Pelmont, 1995; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobia (Esseling *et al.*, 2003).

### **c. Développement du nodule**

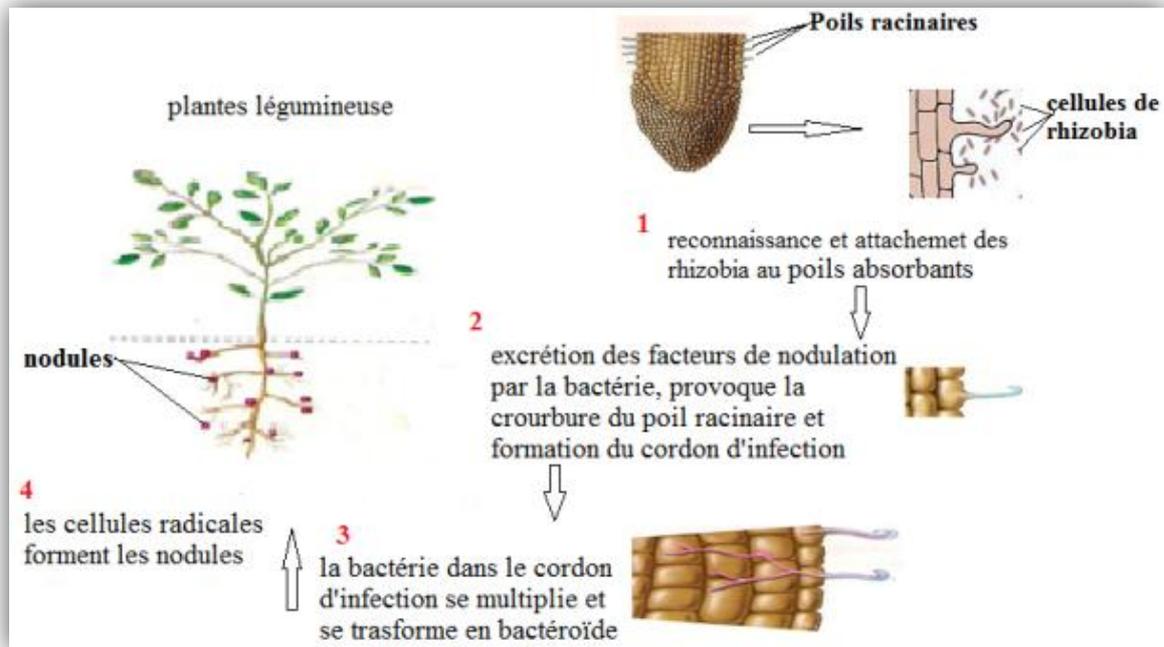
Une fois que les parois se multiplient, les cellules des poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le fil d'infection est formée. Elle se compose de cellules de la paroi nouvellement synthétisées qui formeront le matériel entourant le rhizobia. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004). La progression des bactéries vers la base du poil absorbant se fait grâce à l'élongation du cordon d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996), qui est délimité du reste de la cellule par une paroi végétale primaire néo-synthétisée et de nature pecto-cellulosique (Rae *et al.*, 1992).

Le passage à l'état symbiotique s'accompagne d'une forte répression des gènes du métabolisme basal et d'une surexpression de ceux impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote (Becker *et al.*, 2004). Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont présentes dans le nodule; ce sont les cellules qui survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes introduites dans le même site (Perry *et al.*, 2004).

## **6. Spécificité symbiotique**

La symbiose légumineuses – rhizobium est très spécifique, un Rhizobium donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient à son spectre d'hôte. Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobia sont très

variables, en effet, on trouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et col, 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactérien (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*.) (Boivin et al 1997).



**Figure 3:** Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.

Cette spécificité serait contrôlée par les lectines de l'hôte qui reconnaissent certains glucides des parois bactériennes (Larpen, 1985; Marie et al., 2001; Deakin et Broughton 2009). Les lipopolysaccharides sont un des composés minoritaires de la membrane bactérienne externe qui jouent aussi un rôle important dans la spécificité rhizobia légumineuses (Jones et al., 2007).

Cette spécificité symbiotique est en relation avec la composition des exsudats racinaires qui est intimement liée à l'espèce, rendant la rhizosphère plus spécifique et favorable à ses partenaires symbiotiques (Sharma et al., 2004).

## 7. Facteurs qui influencent la fixation symbiotique

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

## 7.1 Facteurs abiotiques

### a. Le stress salin

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la FSN (Fixation Symbiotique de l'Azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao *et al.*, 2002, Faghire *et al.*, 2011). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong *et al.*, 2006).

### b. Le stress hydrique

Le stress hydrique affecte la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux, tels que la formation et la croissance nodulaire; le métabolisme du carbone et de l'azote; l'activité de la nitrogénase et la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Zahran et Sprent 1986; Aguirreolea et Sanchez-Dyáz 1989; Sadowsky 2005, Farissi *et al.*).

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

### c. Le pH du sol

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficiente dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994). 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 rhizobia et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobia que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

## 7.2 Effet des techniques culturales sur la fixation symbiotique

### a. Effet de la fertilisation chimique

La fertilisation chimique raisonnée des cultures se traduit par des effets généralement positifs sur l'abondance et la croissance des organismes vivants dans le sol et la végétation. Mais d'un autre côté, la fertilisation chimique tend à diminuer la richesse spécifique de nombreux groupes (plantes, bactéries du sol, microarthropodes...) (Klimek *et al.*, 2007).

### **b. Effet du travail du sol**

La survie ainsi que le pouvoir infectif des rhizobia sont largement affectés par les pratiques culturales puisqu'elles agissent indirectement sur les propriétés chimiques du sol (Slattery et *al.*, 2001).

Ainsi, la mécanisation cause des perturbations qui sont la cause directe de l'oxydation rapide ainsi que de la décomposition de la matière organique du sol, engendrant une diminution du stock du carbone nécessaire à leur survie. Ces conditions occasionnent une vulnérabilité de ces microorganismes aux conditions externes (Coventry et *al.*, 1985) et une diminution de leur diversité (Sturz et *al.*, 1997).

## **8. Effet des bactéries amélioratrices de la croissance des plantes**

Parmi les microorganismes du sol, certains à effet PGPR (plant growth promoting bacteria) ont la particularité d'améliorer la croissance des plantes directement ou indirectement (Khan et *al.*, 2009).

Les PGPR sont des bactéries qui rentrent en symbiose associative avec la plante, sans différenciation morphologique des deux partenaires. La rhizosphère est leur habitat privilégié, même si certaines souches sont capables de coloniser l'intérieur des plantes (endophytes). Au niveau de la rhizosphère, ces bactéries vont pouvoir bénéficier des rhizodépôts relargués par la plante. En revanche, les PGPR vont avoir un effet bénéfique et stimulateur de la croissance des plantes qui sont leurs associés. Cet effet peut permettre de classer la plupart des PGPR en deux groupes (Bashan et Holguin 1998) : les PGPR phytoprotectrices, qui ont un effet de protection des plantes donc indirectement de leur croissance. D'un autre part, les PGPR phytostimulatrices, qui stimulent directement la croissance racinaire via la stimulation directe qui consiste à fournir des éléments nutritifs pour la plante. Parmi ces éléments, figurent : (i) l'azote à travers l'activité des nitrates réductases; (ii) les phytohormones (tels que l'acide indole acétique, la zéatine, l'acide gibbérellique et l'acide abscissique); (iii) le fer séquestré par les sidérophores bactériens; et (iv) le phosphore à travers la solubilisation d'acides organiques (Zaidi et *al.*, 2009). La distinction entre ces deux groupes fonctionnels n'est cependant pas toujours nette, et certaines PGPR peuvent appartenir aux deux groupes.

## Matériel & Méthodes

### I. Matériel végétal

La collecte des légumineuses et les bactéries qui sont leurs associées, ont été réalisées pendant la période mois février 2015 au sein du Laboratoire de Biotechnologies Végétales, faculté des sciences d'Agadir. Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est constitué de plantes de certaines légumineuses maraîchères (fève, haricot et pois- chiche) (Figure 4).



**Figure 4 :** Matériel végétal utilisé pour l'isolement des bactéries

### II. Isolement et purification des souches de rhizobia

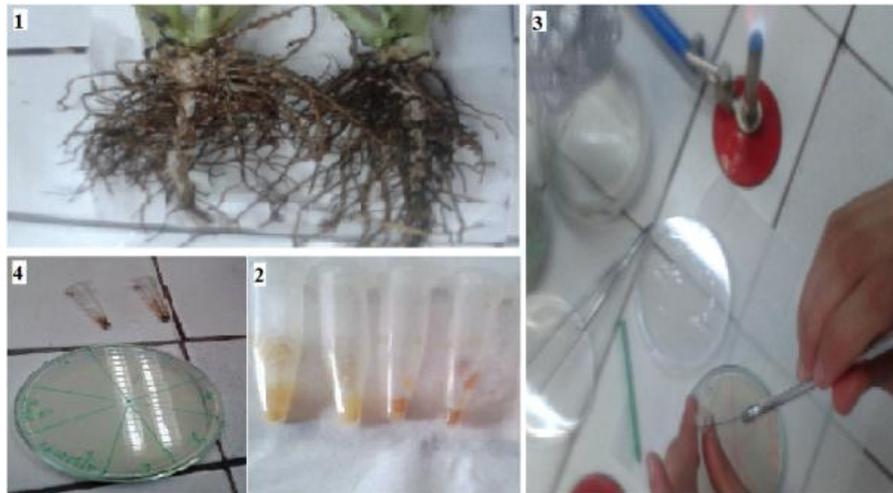
#### 1- Technique d'isolement et purification

La récolte des plantes avec leurs racines a été faite de façon aléatoire au stade plein floraison, à raison de 3 plantes par espèce.

Au laboratoire de Biotechnologies Végétales, tout d'abord; une sélection des racines et des nodules des plantes récoltées a été réalisée sur les racines des plantes collectées. Ces racines et nodules ont été lavés à l'eau de robinet pour éliminer les restes du sol puis désinfectés en surface en les submergeant dans une solution d'eau de Javel diluée à 1/3 pendant 5 min. Ils ont été rincés 5 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer le reste d'eau de Javel et cela sous des conditions aseptiques. Ensuite, ils ont été broyés indépendamment dans des eppendorf à l'aide d'une baguette stérile. Puis et avec une anse flambée et refroidie, on effectue des ensemencements à partir du broyat sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YEM (Vincent, 1970) (figure 5).

Les boîtes renversées ont été incubées dans l'étuve à 28°C ce qui permet la croissance des bactéries extraites des nodules et des racines. A partir des colonies formées par une série de repiquages a été effectuée suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures exemptes de contaminations.

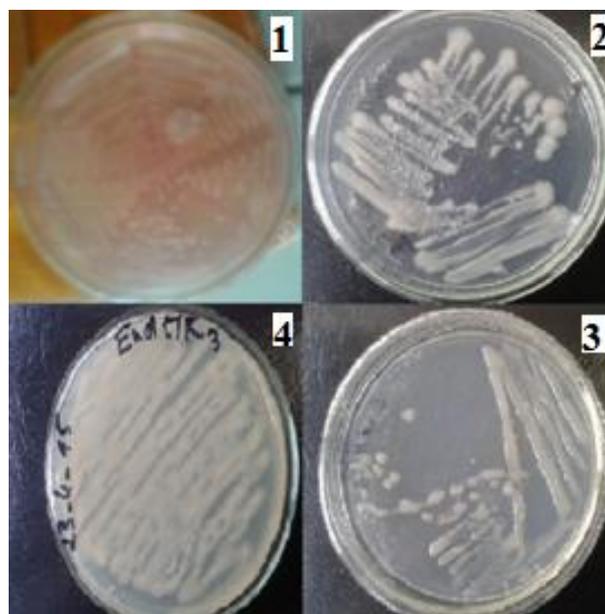
Après une série de repiquages, et en se basant sur les caractéristiques morphologiques des colonies représentant le type majoritaire, un nombre de 24 isolats a finalement été retenu.



**Figure 5** : Les étapes d'isolement des bactéries symbiotiques :

- 1 : Rinçage de la partie racinaire contenant les nodules.
- 2 : Broyage du matériel végétal.
- 3 : Récupération du broyat à l'aide d'une anse.
- 4 : Ensemencements des bactéries sur les boîtes de Pétri selon la technique de huit cadrans.

Après l'étape de l'isolement ; nous avons sélectionné les souches les plus représentatives pour procéder à leur purification par une série de repiquages successifs sur le milieu YEM solide (Figure 6). Chaque colonie choisie a été prélevée par une anse en platine, flambée et refroidie, et ensemencée par des stries transversales dans le milieu YEM solide puis incubée à 28 °C.



**Figure 6** : Etapes de la purification des souches.

- 1 : Isolement des souches
- 2 : Première étape de purification
- 3 : Deuxième étape de purification
- 4 : Souche pure

## **2- Milieu d'isolement ou de culture**

Pour la culture et la purification de nos souches des endophytes, nous avons utilisé le milieu Yeast Extract Mannitol (YEM) (Vincent, 1970) (Annexe 1).

## **3- Conservation des souches**

Il existe plusieurs techniques de conservation des souches isolées; dans cette étude, l'ensemble des 24 isolats sélectionnés a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant du milieu (YEM) et conservées à 4°C (Chahboune 2011). Un rappel de réensemencement doit être effectué tous les trois mois.

# **III. Caractérisation phénotypiques des souches isolées**

Dans le but d'étudier la diversité des microsymbiotes des plantes étudiées, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique des isolats de la collection et physiologique (tolérance au stress salin, au pH et la solubilisation du phosphate inorganique).

## **1- La morphologie**

Les caractéristiques morphologiques ont été déterminées sur l'ensemble des souches isolées, ces caractéristiques concernent ; l'aspect, la forme, la couleur, le diamètre, etc...).

## **2- Test de croissance**

La croissance des isolats a été suivie par mesure périodique de la densité optique à 600 nm pendant 7 jours en utilisant le spectrophotomètre de la lumière U.V visible modèle UV-1200. Les isolats ont été cultivés sur milieu YEM liquide jusqu'à une densité optique (D.O.) voisine de 1. Ces précultures ont été inoculées dans des Erlenmeyers contenant 100 ml du milieu de culture YEM liquide de façon à obtenir une D.O. initiale voisine de 0.05. Ensuite les cultures ont été incubées à 28°C et à l'obscurité dans un agitateur rotatif CERTOMAT BS-T (Sartorius, Allemagne).

## **3- Tolérance à la salinité**

La présence de NaCl dans le milieu influence l'équilibre osmotique des cellules. Il existe des microorganismes qui requièrent la présence de Na<sup>+</sup> pour survivre, mais la concentration tolérée dépendra de la capacité de ces microorganismes à synthétiser des solutés compatibles stockés dans le cytoplasme pour obtenir un équilibre osmotique afin d'éviter la déshydratation.

La croissance des souches rhizobiales à différents concentrations de chlorure de sodium a été évaluée en inoculant les souches sur milieu YEM liquide additionné de 0.5, 1.5 et 2.5% de NaCl.

Après la préparation du milieu YEM liquide avec des différentes concentrations de NaCl et à l'aide d'une pipette de (20ml), nous avons versé le milieu dans des tubes (30ml du milieu YEM liquide dans chaque tube), après nous avons bouché les tubes avec du coton cardé et du papier aluminium, puis nous avons stérilisé tous les tubes à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

Après le refroidissement du milieu en conditions aseptiques, nous avons prélevé à l'aide d'une anse en platine flambée et refroidie, les colonies déjà développées sur le milieu YEM gélosé, puis on les aensemencés dans les tubes contenant les différentes concentrations de NaCl, Les tubesensemencés ont été mis dans l'incubateur réglé à 28 C° pendant 24h, en suite nous avons mesuré la densité optique à l'aide d'un Spectrophotomètre, et cela après chaque 24 h d' incubation pendant une semaine.

#### **4- Tolérance au pH**

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance aux différents pH sur le milieu YEM liquide additionné d'une solution de NaOH 1N de HCL 1N. Le pH a été ajusté aux valeurs suivantes: 4, 7 et 9.

Ce test a été réalisé de la même façon citée précédemment, la seule différence c'est que au lieu de NaCl on a utilisé différentes concentrations de en HCL et NaOH ajusté à 3 valeurs de pH (4, 7 et 9). Ensuite, les tubesensemencés ont été incubés à 28 C° pendant 24h, par la suite on a mesuré la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre, est cela après chaque 24h pendant une semaine.

### **IV. Caractérisation biochimique des isolats**

#### **1- La coloration de Gram**

Afin d'identifier les bactéries isolées, on a procédé à une coloration Gram qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Le principe de cette méthode consiste en la fixation de la solution bactérienne à la chaleur à environ 40°C puis à la réalisation d'une série de colorations (Coloration par le violet de gentiane (1 min); mordantage au lugol (20 sec); décoloration à l'alcool (20 sec); et recoloration à la fuchsine (1 min). Enfin l'observation du frottis au microscope (grossissement 1000) a permis de différencier entre les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> est cela selon la couleur de la paroi.

La forme cellulaire a été observée au microscope optique par la technique de la coloration de Gram.

## **2- Solubilisation du phosphate**

Le test de la solubilisation du phosphate inorganique a été effectué sur le milieu YED-P solide (Peix et *al.*, 2001) (Annexe 2). Les boîtes de Pétri ont été inoculées avec la suspension bactérienne issue d'une préculture fraîche puis incubées à 28°C ; on note que le nombre de répétition est de 3. La lecture des résultats a été faite après 7 jours d'incubation et la solubilisation a été révélée par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne.

## **V. Analyses statistiques**

L'ensemble des mesures réalisées dans les essais d'évaluation a fait l'objet d'une analyse par EXCEL (Erreur Standard) et analyse de la variance (ANOVA) (Annexe 4).

## Résultats

Dans ce chapitre, on s'intéresse à l'étudier de la diversité morphologique et physiologique des souches isolées, d'étudier d'une part le comportement des bactéries observé sur le milieu de culture YEM pendant leur purification, et d'autre part la croissance des bactéries dans des conditions de milieu variables.

### 1- Description des isolats

#### 1.1 Caractéristiques observées

L'isolement, des bactéries à partir des racines et des nodules de certaine légumineuses maraîchères collectées, a permis de constituer une collection de 24 isolats.

La caractérisation morphologique de ces 24 isolats, a montré une grandes diversité phénotypique (Figure 7) et de comparer ces résultats au caractéristiques habituelles des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*..



**Figure 7:** Exemple d'isolats bactériens purifiés sur milieu de culture YEM.

Ces isolats ont formé sur le milieu YEM solide, après 5 jours d'incubation à 28°C des colonies circulaires à ovoïdes de diamètre variable et d'aspect différents. Le tableau 2 montre certaines caractéristiques morphologiques des souches étudiées.

La vitesse de prolifération est variable et les premières colonies apparaissent au bout de 24h. Un mucus de consistance coulante et d'aspect translucide a été observé chez les souches

à croissance rapide; alors que celles à croissance plus lente avaient développé une consistance épaisse et Visqueuse avec une teinte blanchâtre (Tableau 1).

La majorité des isolats sélectionnés forment des colonies convexes circulaires, de couleur crème claire, un aspect humide, brillant, opaque à travers la lumière et de consistance muqueuse (Tableau 1). Aucun isolat n'a eu la capacité de produire des pigments dans le milieu de culture. Cette morphologie correspond à une des caractéristiques habituelles des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984).

**Tableau 1 :** Caractéristiques morphologiques d'isolats bactériens purifiés.

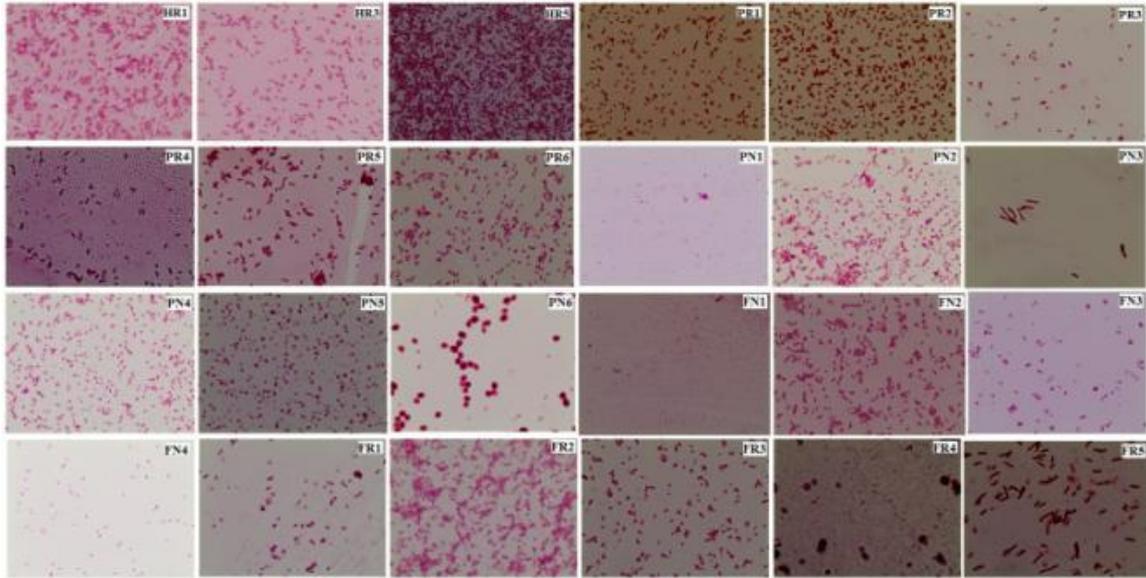
Souche	Forme des colonies	Couleur	Aspect	Vitesse de prolifération	
End HR1	Bacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	+	24h
End HR3	Bacilles	Jeune claire/ crèmeu	Opaque, brillant	+++	24h
End HR5	Bacilles	Jaune foncé	Opaque	-	48h
End PR1	Bacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	++	24h
End PR2	Bacilles	Blanche	Transparent, Visqueux, brillant	+	24h
End PR3	Bacilles fusiformes	Jeune claire	Opaque, brillant	++	24h
End PR4	Diplobacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant ressemble au coton	-	48h
End PR5	Bacilles	Blanche	Opaque, Visqueux		24h
End PR6	Coques	Jeune claire	Opaque, brillant	+	24h
End PN1	Cocci	Blanche	Opaque, Granuleux	-	48h
End PN2	Cocci en amas	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	++	24h
End PN3	Streptobacilles	Jeune claire	Opaque	+	24h
End PN4	Cocci	Jaune foncé	Opaque	+	24h
End PN5	Cocci en amas	Rose claire	Opaque, Visqueux, brillant	-	48h
End PN6	Cocci en chaine	Blanche	Opaque	+	24h
End FN1	Cocci	Blanche	Opaque, Granuleux	-	48h
End FN2	Bacilles	Jeune claire	Opaque, brillant	++	48h
End FN3	Bacilles fusiformes	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	-	48h
End FN4	Bacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	+	24h
End FR1	Bacilles	Rose claire	Opaque, Visqueux, brillant	-	48h
End FR2	Cocci	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	++	24h
End FR3	Bacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	+++	24h
End FR4	Cocci	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant ressemble au coton	-	48h
End FR5	Diplobacilles	Blanche	Opaque, Visqueux, brillant	+	24h

+ : croissance faible, ++ : croissance moyenne, +++ : croissance rapide, - pas de croissance

## 1.2 Coloration de Gram

Les isolats obtenus ont fait l'objet du test de Gram et ont été identifiés comme étant des bacilles Gram négatifs (Figure 8).

Le test Gram a révélé l'absence des souches Gram<sup>+</sup> parmi l'ensemble des isolats testés. Tous les isolats rasélectionnés sont des Gram<sup>-</sup> en forme de bacilles, cocci, streptobacilles...

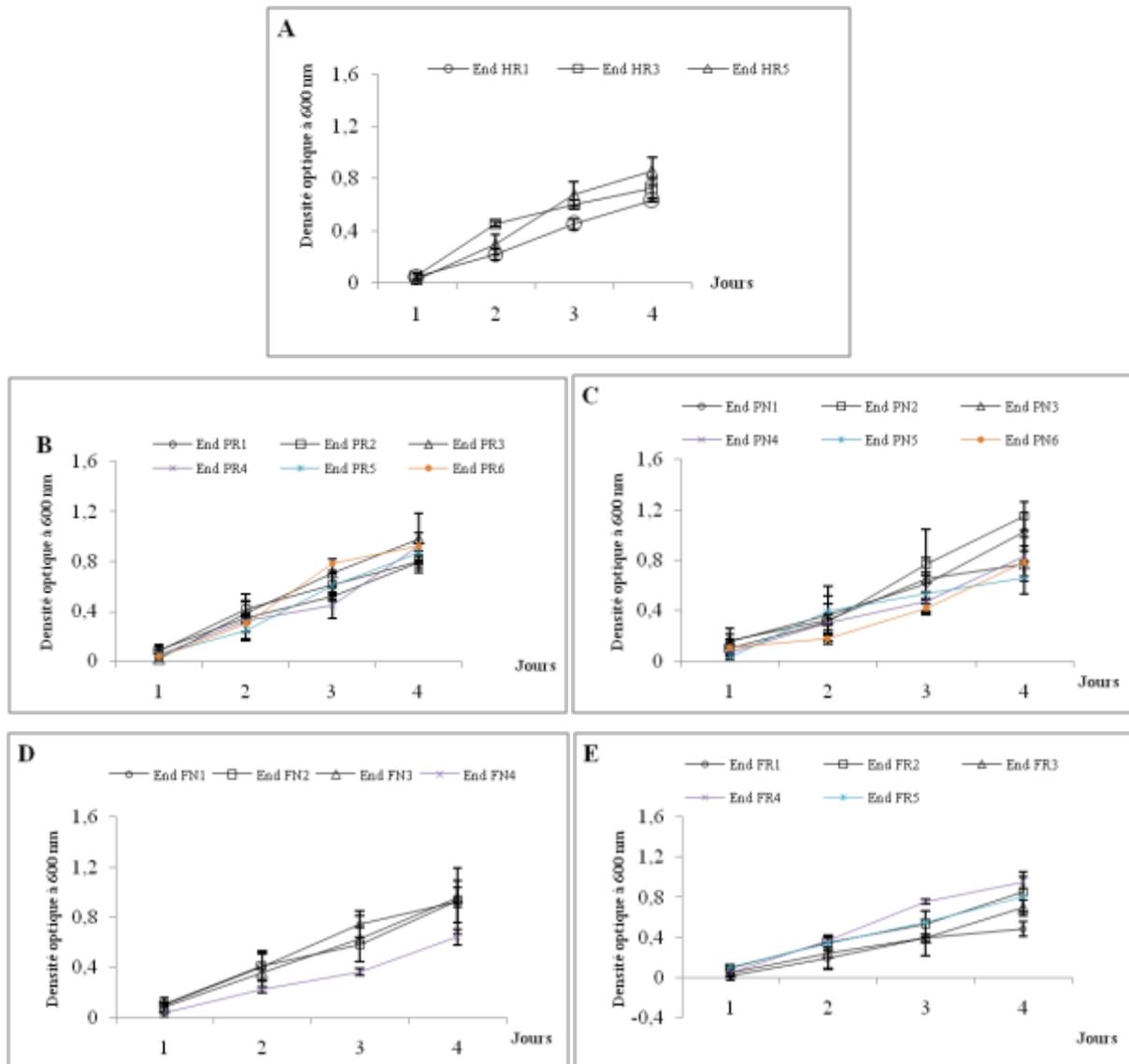


**Figure 8:** Observation sous microscope (Gx100) des souches isolées Gram<sup>-</sup>.

## 2- Caractérisation phénotypique et biochimique

### 2.1 Test de croissance

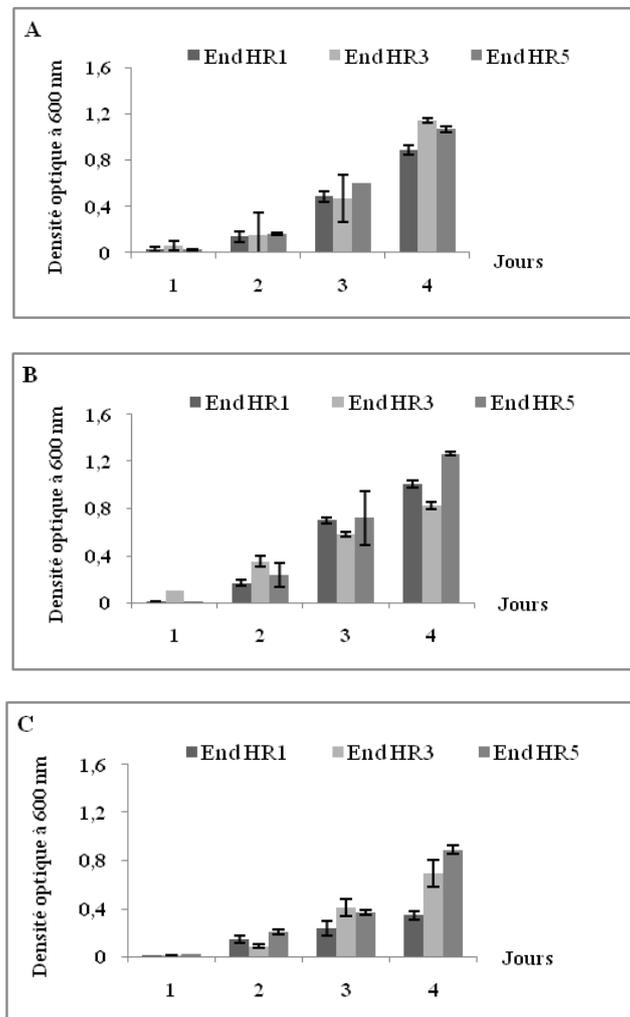
Les résultats du test de croissance montrent que les souches étudiées sont capables de se développer dans ce milieu, la température optimale de croissance des rhizobia est 28°C et toutes les souches étudiées présentent une bonne croissance à cette température mais nous avons observé que la vitesse de croissance varie d'une souche à l'autre. Au bout de 4 jours les meilleurs résultats ont été marqués chez Les souches PN2, PN3, PR6, FN3 et FR3. Par contre, le taux de croissance le plus faible a été observé chez les souches HR1, PN5, FN5 et FR1 (Figure 9).



**Figure 9** : Croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire et nodulaire de certains légumineuses maraichères (A : haricot ; B, C : pois chiche ; D, E : fève) dans des conditions optimales  $pH \approx 7$  et  $T = 28^\circ$ .

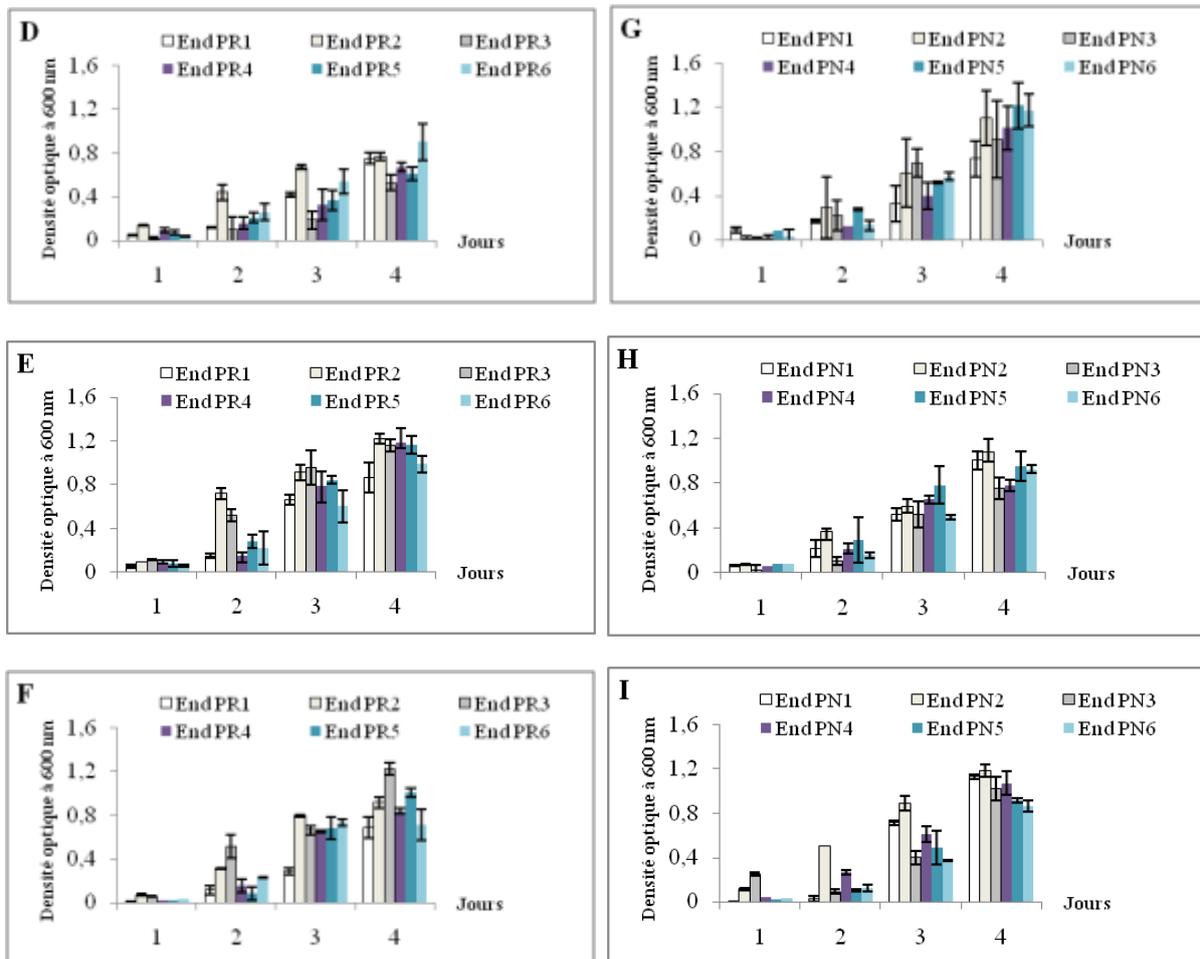
## 2.2 Tolérance à la salinité

La figure 10 présente les résultats de l'étude de l'effet du NaCl, en fonction du temps, sur la croissance de souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot, cette évolution diffère d'une souche à l'autre. Dans le premier jour, la variation du taux de croissance est variable pour les trois conditions choisies ; la meilleure croissance est observée pour le milieu à NaCl 0,5% puis le milieu à NaCl 1,5% et pour le milieu à NaCl 2,5%, la croissance est presque nulle (figure 10). Pour les autres jours, une augmentation progressive de la croissance bactérienne se traduit pour les différentes souches avec une valeur maximale chez la souche HR5 dans le milieu à NaCl 0,5% ; et tous jours les résultats dans le milieu à faible concentration de NaCl est plus grande, ce qui montre que la croissance dans ce milieu est mieux que dans les milieux à grande concentration de NaCl (Figure 10).



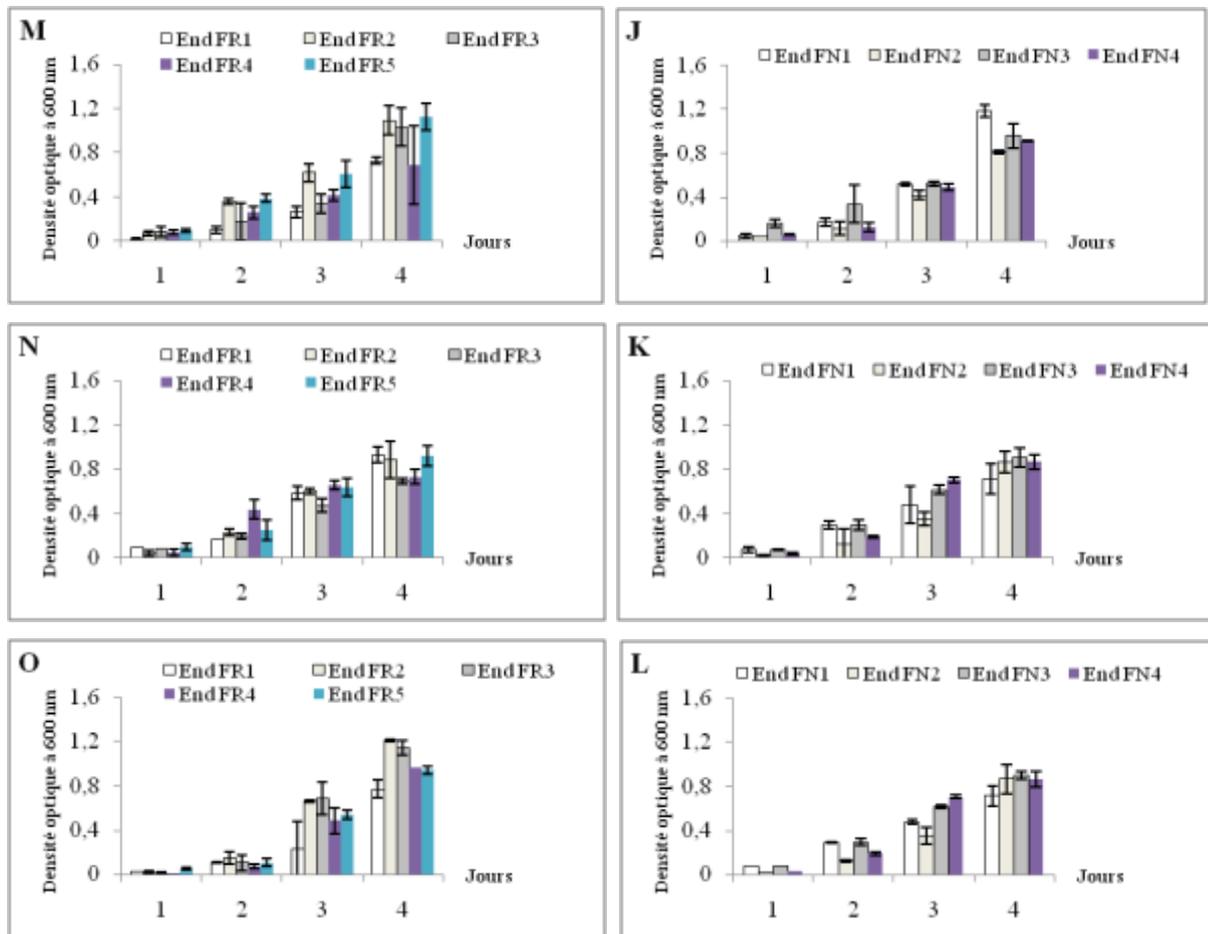
**Figure 10 :** Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot (A : NaCl 0,5% ; B : NaCl 1,5% ; C : NaCl 2,5%) en fonction du temps.

Les graphes de la figure 11 présentent les résultats de la croissance bactérienne dans les milieux à différentes concentrations de NaCl chez le pois chiche. La comparaison entre les souches racinaires et nodulaire montre qu'il n'existe pas une différence entre la croissance pour ces souches. En générale, et comme chez l'haricot dans la figure précédente, plus que la concentration de NaCl est faible plus que la croissance est grande. Nous avons remarqué aussi que la vitesse de croissance est variable selon les souches et que les meilleures valeurs sont remarqué pour les souches PR3 et PN5. Alors que le plus faible taux de croissance est observé pour la souche PN1 (Figure 11).



**Figure 11 :** Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir la partie racinaire (D, E, F) et nodulaire (G, H, I) du pois chiche (D, G : NaCl 0,5% ; E, H : NaCl 1,5% ; F, I : NaCl 2,5%) en fonction du temps.

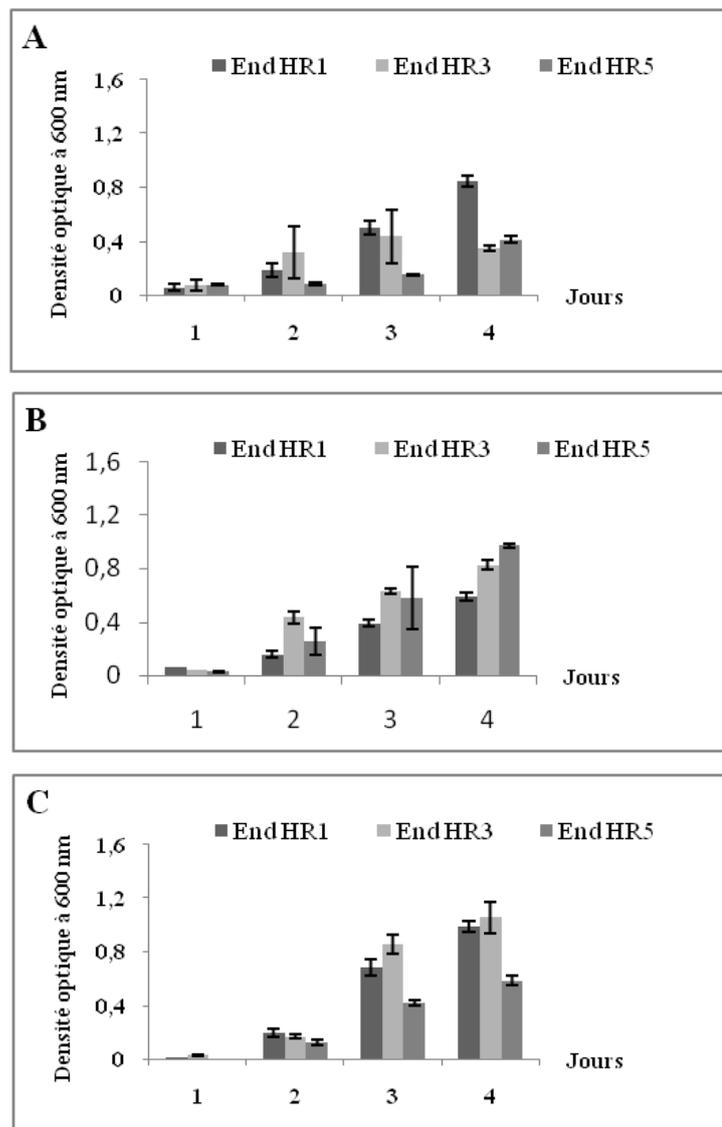
La figure 12 présente les résultats de la croissance bactérienne dans les milieux à différentes concentrations de NaCl chez la fève. La comparaison entre les souches racinaires et nodulaire montre qu'il n'y a pas une grande différence de croissance. Nous avons observé que plus la concentration de NaCl est faible plus la croissance est grande. Nous avons remarqué aussi que la vitesse de croissance est variable selon les souches et que les meilleures valeurs sont remarquées pour les souches FR2 et FN4. Alors que le plus faible taux de croissance est observé pour la souche FR1 (Figure 12).



**Figure 12:** Effet de NaCl sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir la partie racinaire (M, N, O) et nodulaire (J, K, L) de la fève (M, J : NaCl 0,5% ; N, K : NaCl 1,5% ; O, L : NaCl 2,5% pH9) en fonction du temps

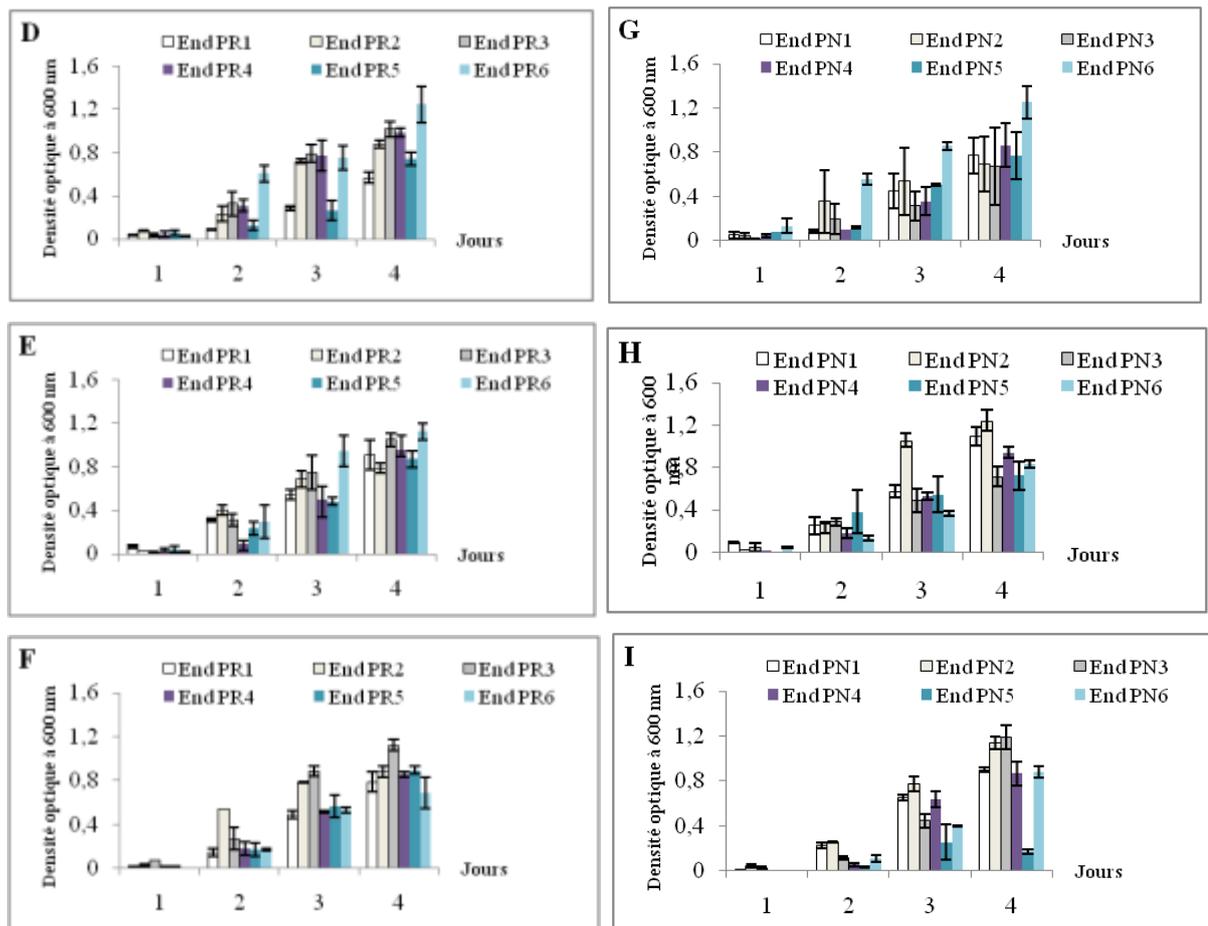
### 2.3 Tolérance au différents pH

La figure 13 présente l'effet de pH, en fonction du temps, sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une différence au niveau des souches. Dans le premier jour, la variation du taux de croissance est variable pour les trois conditions choisies. La meilleure croissance est observée dans le milieu à pH=7, puis le milieu à pH=4 et pour le milieu à pH=9. Nous avons remarqué que la croissance est presque nulle (Figure 13). Durant le reste des jours, une augmentation progressive de la croissance bactérienne se traduit pour les différentes souches avec une valeur maximale chez la souche HR5 dans les trois milieux (Figure 13).



**Figure 13 :** Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir de la partie racinaire de l'haricot (A : pH4 ; B : pH7 ; C : pH9) en fonction du temps.

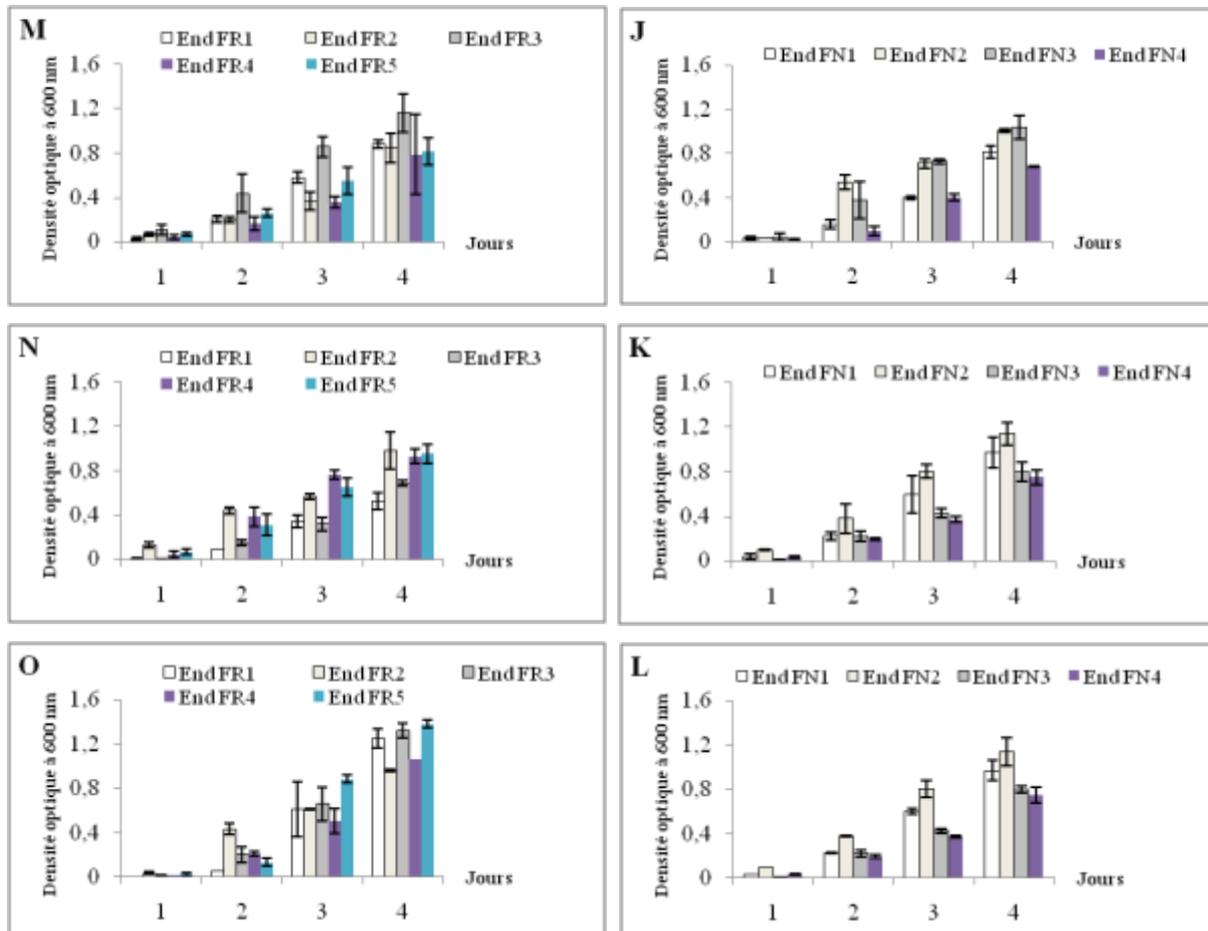
Les graphes de la figure 14 présentent les résultats de la croissance bactérienne dans des milieux à différentes pH chez le pois chiche. La comparaison entre les souches racinaires et nodulaires montre qu'il n'y a pas une grande différence de croissance. Nous avons observé que les souches se développent dans les 3 milieux. On remarque aussi que la vitesse de croissance est variable selon les souches et que la croissance maximale est observée chez les souches PR6 et PN2. Alors que le plus faible taux de croissance est observé chez la souche PN2 (Figure 14).



**Figure 14 :** Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir la partie racinaire (D, E, F) et nodulaire (G, H, I) du pois chiche (D, G : pH4 ; E, H : pH7 ; F, I : pH9) en fonction du temps.

La figure 15 présente les résultats de la croissance bactérienne dans des milieux à différentes pH chez la fève. La comparaison entre les souches racinaires et nodulaire montre qu'il n'y a pas une grande différence de croissance. Nous avons observé que les souches se développent dans les trois milieux. Nous avons remarqué aussi que la vitesse de croissance est variable selon les souches et que le taux de croissance le plus élevé est observé chez les

souches FR5 et FN3. Alors que le plus faible taux de croissance est observé chez la souche FN4 (Figure 15



**Figure 15 :** Effet du pH sur la croissance de certaines souches bactériennes isolées à partir la partie racinaire (M, N, O) et nodulaire (J, K, L) de la fève (M, J : pH4 ; N, K : pH7 ; O, L : pH9) en fonction du temps.

## 2.4 Solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate inorganique est révélée par la présence ou l'absence d'un halo dû à la croissance bactérienne. La présence ou l'absence de ce halo ou bien le taux de la croissance bactérienne montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate entre les souches testées (Figure 16).

Dans ce test, les 24 souches étudiées ont été examinées sur la base de leur solubilisation du phosphate tricalcique inorganique et insoluble sur le milieu YED-P (Annex 2). Afin d'évaluer l'habilité de ces isolats à solubiliser le phosphate.

Nous avons remarque d'après les résultats de ce test que seulement 6 par les 24 souches arrivent à solubilisé le phosphate inorganique (Tableau 2), ce la montre que la capacité à solubilisé le phosphate inorganique n'est pas la même chez les endophytes des légumineuses, et montre aussi qu'il existe une diversité au niveau de ces bactéries (Figure 16).



**Figure 16 :** Solubilisation du phosphate inorganique par les souches isolées.

**Tableau 2 :** Résultats de la solubilisation du phosphate inorganique

Souches	Solubilisation du phosphate
End HR1	-
End HR3	-
End HR5	-
End PR1	-
End PR2	-
End PR3	-
End PR4	+
End PR5	-
End PR6	-
End PN1	-
End PN2	+
End PN3	+
End PN4	-
End PN5	-
End PN6	-
End FN1	-
End FN2	-
End FN3	+
End FN4	-
End FR1	-
End FR2	+
End FR3	-
End FR4	-
End FR5	+

+ : solubilisation, - : pas de solubilisation

## Discussion

Plusieurs travaux ont été réalisés pour isoler et purifier ainsi que caractériser les bactéries symbiotiques plus spécifiquement les rhizobia (Faghire et al., 2012). Vu que la plupart des bactéries isolées dans cette présente étude, ressemblent dans leurs caractéristiques morphologiques aux rhizobia, on peut déduire que les rhizobia semblent les bactéries les plus existantes en symbiose avec les légumineuses.

L'analyse des résultats du temps d'apparition des colonies sur le milieu YEM solide (de 1 à 3 jours) et leurs caractéristiques morphologiques, concordent parfaitement avec ce qui est décrit par Jordan (1984) pour les souches à croissance rapide de la famille des *Rhizobiaceae*. Cette constatation a été donc confirmée par le temps de génération rapide des souches.

Dans cette étude, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis des principaux facteurs de stress, en l'occurrence la salinité et principalement le NaCl qui représente le sel le plus répandu au Maroc, le pH à différentes valeurs et la solubilisation de phosphate inorganique.

Les résultats obtenus, montrent que la majorité des souches présentent une tolérance à la salinité avec une grande variation de la vitesse de croissance observée entre les différentes souches étudiées. On note que les souches à croissance rapide ont la capacité de se développer rapidement. Donc l'évaluation de la tolérance des souches à la salinité sur milieu liquide a montré que la totalité des isolats bactériens présente une croissance similaire à la croissance dans les conditions normales, la majorité des isolats arrivent à se développer même si dans le milieu à une grande teneur en NaCl. Reva et al. 2002 ; Tilak et al. 2005 et Faghire et al. 2011, ont montré que les endophytes symbiotiques peuvent tolérer et survivre en présence d'une salinité élevée, que ce soit en culture pure ou dans le sol, supérieure à celle de la plante hôte et c'est le cas des bactéries symbiotiques du haricot où la plante tolère de faibles concentrations de NaCl (Faghire et al. 2011) tandis que les bactéries qui leur sont associées peuvent tolérer de concentrations élevées de NaCl. Bouhmouch et al. (2001) qui ont travaillé sur la région de Rabat, ont trouvé aussi que 30 souches de 150 souches isolées de rhizobia, sont osmotolérantes et peuvent se développer à des concentrations de NaCl supérieures à 20 g/l de NaCl.

Les résultats obtenus lors de notre travail ont permis de déceler que nos souches peuvent tolérer des pH acides allant jusqu'à 4 et des pH alcalins allant jusqu'à 9. De manière générale, ces résultats obtenus concordent parfaitement avec ce qui a été rapporté par Jordan (1984) qui a constaté que les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, endophytes

symbiotiques, tolèrent parfaitement les pHs allant de 4.5 à 9. Le mode d'action du pH sur la survie bactérienne n'est pas toujours très bien éclairci. Booth (1985) s'est limité de rapporter que le pH extracellulaire est l'un des facteurs critiques dans le métabolisme et la croissance cellulaire. Toutefois, on peut dire que l'action des pH alcalins sur les bactéries peut se manifester soit par une ionisation des molécules, ce qui ralentit leur passage dans le cytoplasme (Tungan et Martin, 1985), soit en modifiant la solubilité des gaz ou la disponibilité des substances nutritives vis-à-vis des cellules bactériennes (Schwartzbord, 1985), soit en inactivant certaines enzymes indispensables au métabolisme bactérien. Parker (2002) qui a travaillé sur l'effet des pH acides sur le développement des bactéries, a constaté que l'acidité fait diminuer leur croissance.

Le test de solubilisation du phosphate montre que seulement 6 parmi les 24 bactéries endophytes des légumineuses étudiées, qui sont des Gram négatif, ont été capables de solubiliser le phosphate inorganique sous forme tricalcique. Les bactéries Gram négatif sont souvent plus efficaces dans la solubilisation du phosphate minéral grâce à leur capacité de produire de l'acide gluconique impliqué dans ce phénomène (Rashid et al. 2004). Des travaux antérieurs ont montré la capacité des bactéries rhizosphériques et symbiotique avec d'autres plantes telles que les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* de solubiliser les phosphates inorganiques. (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma et al. 2001).

## Conclusion et perspectives

L'étude des bactéries symbiotiques des plantes légumineuses constituent un domaine très riche qui mérite d'être développé surtout dans les pays à climat aride qui portent un grand intérêt au développement de leur agriculture tel que le Maroc.

L'amélioration de la production agricole nécessite la sélection préalable de souches bactériennes efficaces à effets PGPR, adaptées aux conditions environnementales stressantes.

Notre présente étude consistée à initier l'évaluation de la biodiversité des bactéries symbiotique dans le cadre de l'amélioration de la productivité des légumineuses par l'optimisation de la fixation azotée. L'étude des caractéristiques phénotypiques a permis, d'une part, de déterminer le niveau de variabilité morphologique entre les 24 souches isolées à partir la partie racinaire et nodulaire de certaines légumineuses et d'autre part, d'évaluer le comportement de la croissance bactérienne de ces 24 isolats aux différentes conditions environnementales.

Au terme de cette étude, on retiendra que :

- Les souches isolées présentent une grande diversité morphologique et physiologique sur le milieu de culture YEM.
- 24 souches ont été isolées avec une domination des souches développant des colonies denses et bien identifiables en 24 heures d'incubation.
- Une large tolérance au NaCl, et au pH a été notée pour l'ensemble de la collection.
- Toutes ces souches isolées sont des Gram<sup>-</sup>.
- Seul 6 souches parmi les bactéries isolées sont capable de solubilisé le phosphate organique.

Dans une étape ultérieure, Le renforcement de notre collection initiale des souches symbiotiques testées sous de nouvelles formes de stress biotique (champignons telluriques) ou abiotique (température, stress hydrique, étude symbiotique et moléculaire) serait particulièrement intéressante dans une conjoncture de changement climatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguirreolea J. and Sanchez-Dyáz M. 1989. CO<sub>2</sub> evolution by nodulated roots in *Medicago sativa* L. under water stress. *J Plant Physiol.* 134: 598-602.
- Allen, O. N., Allen, E. K. (1981). *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation.*
- Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Kuster H., Liebe C., Puhler A., Weidner S., Batut J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 292-303.
- Ben Jeddi F. 2005. *Hedysarum coronarium* L. : Variation génétique, création variétale et place dans les rotations tunisiennes. Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées. Faculté des sciences en bio-ingénierie. Université de Gen Belgique. 216 p.
- Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current opinion in neurobiology*, 13(6), 696-706.
- Blake, P., Brimicombe, P. D., Nair, R. R., Booth, T. J., Jiang, D., Schedin, F., ... & Novoselov, K. S. (2008). Graphene-based liquid crystal device. *Nano letters*, 8(6), 1704-1708.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M. F., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 65(2), 135-172.
- Booth I.R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49, 359-378.
- Bordeleau L. M., and D. Prévost. 1994. Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant and Soil.* 161, 115-135.
- Bouhmouch I., Berrada F., Filali-Maltouf A. & Amal Aurag, 2001. Selection of osmotolerant and effective strains of rhizobiaceae for inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Moroccan saline soils. *Agronomie*, 21: 591-599, INRA, EDP Sciences.
- Bourbouze, A. (1980). Utilisation d'un parcours forestier pâturé par des caprins: Fourrages, 82. 121-143.
- Broughton, W. J., S. Jabbouri, and X. Perret. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182, 5641-5652.
- Chiej, R. (1983). *Guía de plantas medicinales*, 1<sup>a</sup> edn. Barcelona: Grijalbo.
- Collavino M., Riccillo P.M., Grasso D.H., Crespi M., Aguilar OM. 2005. GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti* - Alfalfa symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:742-750.
- Coventry D. R., Hirth J. R., Reeves T. G. and Jones H. R. 1985. Development of populations of *Rhizobium trifolii* and nodulation of subterranean clover following the cropping phase in crop-pasture rotation in southeastern Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 17-22.
- Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylonenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettnick D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B., Kersters K. and Gillis M.. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia:

- emendation of the genus *Sinorhizobium meliloti* comb.nov. *S. Saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 715-733
- Deakin, W. J., & Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 312-320.
- Deakin, W. J., & Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 312-320.
- D'Haese, W., Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12, 79R-105R.
- Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C, 2011. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.
- Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C, 2011. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.
- Faghire M, Mandri B, Oufdou K, Bargaz A, Ghoulam C, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Peix A, 2012. Identification at species and symbiovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech (Morocco) and analysis of *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology Journal*, 35:156-164.
- Faghire M, Mandri B, Oufdou K, Bargaz A, Ghoulam C, Ramírez-Bahena, MH, Velázquez E, Peix A, 2012. Identification at species and biovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 35:156-164.
- Farrand, S. K., P. B. van Berkum, and P. Oger. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 1681-1687.
- Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A. and Chanway C.P. 2008 b. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187-1193.
- fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21, 541-554.
- Foucher F. and Kondorosi E. 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.
- Frank, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsc. Bot. Ges.* 7, 332-346.
- Gage D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.
- Gage D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., Deley D.J., Jarvis B.D.W., RoslyCcky E.B., Strijdom B.W. and Young J.P.W. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 582-587. growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33, 103-110.
- Guignard J.L., Dupont F., 2005. *Botanique*. 13ème Edition Masson.Sprent : 164-179.
- Hartmann, A. et Bashan, Y. (2009). Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) – Special Issue *Eur J Plant Pathol* 45:1-2.

- Howse, J. R., Jones, R. A., Ryan, A. J., Gough, T., Vafabakhsh, R., & Golestanian, R. (2007). Self-motile colloidal particles: from directed propulsion to random walk. *Physical review letters*, 99(4), 048102.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
- Jordan D. C. (1984). Genus I, *Rhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. ed. Holt, J.G. & Kreig, N. R. pp. 235- 242. London; Williams & Wilkins Co.
- Jordan DC, 1984. Family III. Rhizobiaceae, p. 234-242. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md.
- Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Ahemad M. and Oves M. 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds). pp 105-132. *Microbial strategies for crop improvement*. Springer, Germany.
- Kinkema, M., Scott, P. T., & Gresshoff, P. M. (2006). Legume nodulation: successful symbiosis through short-and long-distance signalling. *Functional Plant Biology*, 33(8), 707-721.
- Klimek S., Richter G., Kemmermann A., Hofmann M. and Isselstein J. 2007. Plant species richness and composition in managed grasslands: The relative importance of field management and environmental factors. *Biological Conservation* 134(4): 559-570.
- Larpent, J. P., & Larpent-Gourgaud, M. (1985). @ WEI@ Wement de microbiologie. Enseignement des sciences.
- Le Houerou, H. N. (1980). L'impact de l'homme et de ses animaux sur la forêt méditerranéenne. *For. Med. Legume Symbiosis with Rhizobium-Leguminosarum*. *Plant Journal* 2, 385-395.
- Legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4: 336-342.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302(5645), 630-633.
- Madison, Wisconsin, U.S.A.: University of Wisconsin Press.
- Marie C., Broughton W.J. and Deakin W.J. 2001. *Rhizobium* type III secretion systems:
- Munns R, Termaat A, 1986. Whole plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 13:143-160.
- Munns, D. N. (1977). Mineral nutrition and the legume symbiosis [*Rhizobium*]. *Treatise on dinitrogen fixation*.
- Nap, J. P., & Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science*, 250(4983), 948.
- Oldroyd, B., Wossler, T., & Ratnieks, F. (2001). Regulation of ovary activation in worker honey-bees (*Apis mellifera*): larval signal production and adult response thresholds differ between anarchistic and wild-type bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(4), 366-370.
- Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. and Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 234: 201-62.222.
- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W. and Borthakur D. 2006. Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain BL3. *Symbiosis* 41: 47-51.
- Peix, A., Boyero, A. A. R., Mateos, P. F., Barrueco, C. R., Molina, E. M., Velazquez, E. (2001). *Growth*
- Pelmont J., (1995). *Bactérie et environnement*. Vol 2. Office des Publication Universitaire. Grenoble.
- Perry J.J., Stalex J.T. et Lory S. 2004. *Microbiologie cours et questions de revision*. Edition Dunod. Paris. France.

- promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under.
- Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C. et Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321:341-361.
- Raaymakers, B. W., Lagendijk, J. J. W., Overweg, J., Kok, J. G. M., Raaijmakers, A. J. E., Kerkhof, E. M., ... & Brown, K. J. (2009). Integrating a 1.5 T MRI scanner with a 6 MV accelerator: proof of concept. *Physics in medicine and biology*, 54(12), N229.
- Rae, A. L., Bonfantefasolo, P., Brewin, N. J. (1992). *Structure and Growth of Infection Threads in the*
- Rao DLN, Giller K.E., Yeo A.R. and Flowers T.J. 2002. The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563-570.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.
- Rasanen L. 2002. 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. 220p.
- Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S. and Latif F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biotechnol. Sci.* 7: 187- 196.
- Raven P. H., Evert R. F. et Eichlorn S. E. 2000. *Biologie végétale*. 6ème Edition de boeck, Paris.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen
- Reva O. N., Smirnov V. V., Petterson B. and Priest F. G. (2002). *Bacillus endophyticus* sp. nov. Isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 101- 107.
- Rodriguez H. and Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319- 339.
- Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE (eds) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Springer, The Netherlands, pp 89-112.
- Santos M.A., Nicola's M.F. and Hungria M. 2006. Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* and soybean. *Pesq. Agrop. Bras.* 41: 67-75.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Schwartzbord J. 1985. Bactériologie des milieux aquatiques, aspects écologiques et sanitaires, In Martin G., point sur l'épuration des effluents : Eau-Air, 2.2, 47-113.
- Sharma KK, Lavanya M, 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report* 23:61-73.
- Slattery J. F., Coventry D. R. and Slattery W. J. 2001. Rhizobial ecology as affected by soil environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 289-298.
- Somers, E. et Vanderleyden, J. (2004). Rhizosphere bacterial signaling: a love paradigm beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205-240.

- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30(4), 205-240.
- Sprent J.I., 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem* 27: 401-407.
- Stoeva, S., Klabunde, K. J., Sorensen, C. M., & Dragieva, I. (2002). Gram-scale synthesis of monodisperse gold colloids by the solvated metal atom dispersion method and digestive ripening and their organization into two- and three-dimensional structures. *Journal of the American Chemical Society*, 124(10), 2305-2311.
- Stringi L. et Amato G. 1998. La Sulla nell'ambiente siciliano: utilizzazione e prospettive di valorizzazione. I Georgofili, Firenze.
- Sturz A.V., Carter M.R. and Johnston A.W. 1997. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil Till. Res.* 41: 169-189.
- Taubert, P. H. W. (1894). *Leguminosae*.
- Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., de R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K. and Johri B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136- 150. tome II, n°2: 155-174.
- Tungan E.U. & Martin S.E. 1985. Effect of pH, temperature and potassium sorbate and amino acid uptake in *Salmonella typhimurium* 1736. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 505-508.
- Verma S. C., Ladha J. K. and Tripathi A. K. (2001). Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127- 141.
- Vincent JM, 1970. The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In: Vincent, J.M. (Ed.). *A manual for the practical study of root-nodule*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1-13.
- Werner D. 1992. *Symbiosis of plants and microbes*. Edition Chapman and Hall, Germany. Burton 1985.
- Zablutowicz R. M. and D. D. Focht. 1981. Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 679-685.
- Zahran HH, Sprent JI, 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*, *Planta* 167:303-309.
- Zaidi A., Khan M.S, Ahemad M. and Oves M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56: 263-284.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Milieu YEM

Composition	Concentration (g)
Extrait de levure	0.1 g
Manitol	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05 g
MgSO <sub>4</sub>	0.02 g
NaCl	0.01 g
Agar	1.5 g
Eau distillée	100 qsp

### Annexe 2 : Milieu YED-P

Composition	Concentration (g)
Glucose	10 g/
Extrait de levure	15.0 g/l
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2.0 g
Agar	15 g/l
Dissoudre les ingrédients dans 1,0 l d'eau distillée et ajuster le pH à pH 6.8. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.	

### Annexe 3: Coloration de Gram

➤ Réactifs et colorants

- Cristal violet
- Fuchsine basique
- Lugol
- Alcool-Acétone

➤ Technique :

1- Un frottis a été préparé à partir d'une colonie bactérienne qui a été étalée sur une lame de microscope avec une goutte d'eau, séchée et fixée à la chaleur.

Recouvrir le frottis de Cristal violet

2- et laisser agir 1 min. Rincer à l'eau déminéralisée pour éliminer l'excédent de colorant.

3- Recouvrir le frottis de la solution de lugol et laisser agir 1 min. Rincer à l'eau déminéralisée pour éliminer l'excédent de lugol.

4- Verser quelques gouttes d'alcool-acétone sur le frottis tenu verticalement jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (15 – 30 s).

Recouvrir le frottis de la solution de F uchsine basique et laisser 1 min. Rincer avec un jet de pissette d'eau déminéralisée et laisser sécher et passer à l'obsécration microscopique

## Annexe 4 : Analyse des variances (ANOVA)

### 1- Pour le test de la croissance

Analysis of Variance

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
ESP	2,709	23	0,118	3,426	0
JR	51,68	4	12,92	375,778	0
ESP*JR	2,442	92	0,027	0,772	0,924
Error	8,252	240	0,034		

### 2- Pour le test de la tolérance à la salinité

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRAI	0,676	2	0,338	13,985	0
JR	100,263	3	33,421	1 382,150	0
ESP	3,089	23	0,134	5,555	0
TRAI*JR	0,817	6	0,136	5,628	0
TRAI*ESP	4,974	46	0,108	4,472	0
JR*ESP	2,32	69	0,034	1,391	0,025
TRAI*JR*ESP	5,716	138	0,041	1,713	0
Error	13,928	576	0,024		

Tukey's Honestly-Significant-Difference Test

TRAI(i)	TRAI(j)	Difference	p-value	95,0% Confidence Interval	
				Lower	Upper
1	2	-0,065	0	-0,096	-0,035
1	3	-0,014	0,511	-0,045	0,016
2	3	0,051	0	0,021	0,081

### 3- Pour le test de la tolérance au différents pH

Analysis of Variance

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRAI	0,115	2	0,057	2,761	0,064
JR	92,303	3	30,768	1 479,455	0
ESP	4,076	23	0,177	8,522	0
TRAI*JR	0,946	6	0,158	7,579	0
TRAI*ESP	7,984	46	0,174	8,346	0
JR*ESP	3,45	69	0,05	2,404	0
TRAI*JR*ESP	6,147	138	0,045	2,142	0
Error	11,979	576	0,021		

Tukey's Honestly-Significant-Difference Test

TRAI(i)	TRAI(j)	Difference	p-value	95,0% Confidence Interval	
				Lower	Upper
1	2	-0,025	0,088	-0,053	0,003
1	3	-0,023	0,124	-0,052	0,005
2	3	0,002	0,987	-0,026	0,03