

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEE



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Isolement et caractérisation des rhizobactéries piégées par la légumineuse *Lathyrus ochrus* L. cultivée sur substrat enrichi en minéral de fer : Etude de leurs résistances aux métaux lourds et à la solubilisation des phosphates inorganiques

Présentée par : LEMBOUB Chama

Directeur de thèse : Pr. CHEKIREB Djamel

Université d'Annaba

Membres de Jury :

Présidente : Pr. GACEMI-KIRANE Djamila

Université d'Annaba

Examineurs : Pr. AOUN Leila

Université d'El-Tarf

Pr. BEDDIAR Arifa

Université d'Annaba

Pr. DJERIBI Ryad

Université d'Annaba

Année universitaire : 2018/2019

DÉDICACE

JE DÉDIE CE TRAVAIL À MES CHERS PARENTS :

A CELLE QUI M'A DONNÉ LA NAISSANCE, L'AMOUR, LE SOUTIEN ET L'ENCOURAGEMENT, TU ÉTAIS TOUJOURS LÀ POUR M'AIDER MAMAN, TU ME PRENDRE PAR LA MAIN, ET TU ME MONTRE LE CHEMIN, TU M'APPORTES TON SOUTIEN, ET CONSOLES MES CHAGRINS, AUJOURD'HUI JE VOULAIS TE DIRE QUE JE T'AIME MAMAN « WASSILA ».

A CELUI QUI M'A TOUJOURS SOUTENU, AUJOURD'HUI JE T'EXPRIME PAPA MON AMOUR, MON RESPECT ET MA RECONNAISSANCE POUR TOUS CE QUE TU FAIS POUR MOI QUE DIEU TE GARDE MON PAPA « DJELLOUL ».

A MON ÉPOUX « SEDRATI REDA », TU RESTERAS TOUJOURS LA MEILLEURE RÉUSSITE QUE JE N'AURAI JAMAIS ACCOMPLIE. LE PLUS BEAU SOURIRE DE TOUS MES SOUVENIRS. LA PLUS BELLE HISTOIRE QUE J'AURAI RACONTÉE, MAIS SURTOUT, LE MEILLEUR HOMME DANS CETTE VIE, TU M'A TOUJOURS SOUTENU, COMPRIS ET RÉCONFORTÉ JE T'AIME MON ANGE.

A MES AMOURS MOHAMED ET ISMAIL, ON M'A DIT UN JOUR QUE L'AMOUR QU'UNE MÈRE PORTE À SON ENFANT EST UN AMOUR PLUS QUE NATURE. MES PETITS, MON BONHEUR ET MA JOIE DE VIVRE, VOUS ÊTES L'ESPOIR ET LA LUMIÈRE DE MA VIE, JE VOUS AIME.

A MES SŒURS HANA ET MINA ET MON FRÈRE ABDEL-KADER, À MON BÉBÉ D'AMOUR MA NIÈCE ISRAA ET À MA GRANDE FAMILLE PATERNELLE LEMBOUB, ET MATERNELLE RAHLI ET MA BELLE FAMILLE SEDRATI.

MERCI

CHAMA

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus profonds sont d'abord à "ALLAH" le tout puissant, je le remercie pour toute l'aide et le courage qu'il m'a donné, qui m'a aidé à surmonter toutes les difficultés et l'endurance qu'il m'a fourni pour terminer ce travail.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon Directeur de thèse Monsieur **CHEKIREB Djamel**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba. Tout au long de ce travail, il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines.

Je tiens vivement à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à Madame **GACEMI-KIRANE Djamil**a, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Ma profonde reconnaissance et gratitude à Madame **AOUN Leila**, Professeur à l'Université d'El-Tarf, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements vont aussi à Madame **BEDDIAR Arifa** Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens aussi à remercier Monsieur **DJERIBI Ryad**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également mes collègues, les techniciens et les techniciennes du département de Biochimie, ainsi que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	I
LISTE DES FIGURES	II
LISTE DES TABLEAUX	III
RESUME	IV
INTRODUCTION GENERALE	1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES LEGUMINEUSES ET LE GENRE *LATHYRUS*

1. Généralités sur les légumineuses.....	4
2. Associations légumineuses-rhizobia	5
3. La légumineuse <i>Lathyrus</i>	8
3.1. Généralités.....	8
3.2. Phylogénie du genre <i>Lathyrus</i>	9
3.3. Phylogénie des rhizobia symbiotiques du genre <i>Lathyrus</i>	11
3.4. L'espèce <i>Lathyrus ochrus</i> L.....	12
3.4.1. Caractéristiques morphologiques de l'espèce <i>Lathyrus ochrus</i> L.....	12
3.4.2. Classification botanique de l'espèce <i>Lathyrus ochrus</i> L.....	14

CHAPITRE II : LES PHOSPHATES

1. Le phosphate dans le sol.....	15
----------------------------------	----

2. Les bactéries solubilisatrices du phosphate (BSP)	16
3. Mécanismes d'action de la solubilisation/minéralisation des phosphates	17
3.1. Solubilisation des phosphates inorganiques	18
3.1.1. Par la production d'acides organiques (AO)	18
3.1.2. Par la production de dioxyde de carbone (CO ₂)	18
3.2. Minéralisation biologique des phosphates organiques	19
3.2.1. Les phosphatases	19
3.2.2. Les phytases	19
3.2.3. Les C-P lyases	19
4. Le phosphate roche (PR)	19
4.1. Mécanismes de solubilisation du PR	20
4.1.1. Excrétion des protons H ⁺	20
4.1.2. Production des acides organiques	20
4.1.2.1. Par acidification	20
4.1.2.2. Par chélation	20
4.1.2.3. Par réaction d'échange de ligands	21

**CHAPITRE III : RHIZOBACTERIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES
PLANTES**

1. La rhizosphère	22
2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP)	23
3. Les activités RFCP des BSP	28
3.1. La fixation symbiotique de l'azote	28
3.1.1. Pré-infection	28
3.1.2. Infection	30

3.1.3. Fixation biologique de l'azote	31
3.2. La résistance des bactéries aux métaux lourds	32
3.2.1. Généralités	32
3.2.2. Mécanismes de résistance aux métaux lourds	33
3.2.2.1. Perméabilité membranaire	34
3.2.2.2. Séquestration intra et extracellulaire	34
3.2.2.3. Transport actif	34
3.2.3. Production de sidérophores	34
3.2.4. Production de l'acide indolacétique (IAA).....	35
3.2.5. Production d'ACC	35
3.3. Les bio-fertilisants.....	36

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : PIEGEAGE DES RHIZOBACTERIES SUR SUBSTRAT SOL-MINERAI DE FER

1. But du piégeage	38
2. Protocole de piégeage des rhizobia	38

CHAPITRE II : ISOLEMENT ET PURIFICATION DES RHIZOBACTERIES PIEGEES

1. Isolement sélectif des rhizobia à partir des nodules de <i>Lathyrus ochrus</i>	40
1.1. Milieux de culture pour isolement	40
1.2. Préparation des nodules.....	40

1.3. Croissance et purification des rhizobia piégés	41
---	----

CHAPITRE III : CARACTERISATION CULTURALE ET MORPHOLOGIQUE DES ISOLATS

1. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats	42
1.1. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de rouge Congo (RC)	42
1.2. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de bleu de Bromothymol (BBT)	42
1.3. Croissance des isolats sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)	42
1.4. Croissance des isolats sur milieu YMFP et milieu YEMA classique	43
1.5. Test au cétolactose	43
1.6. Coloration de Gram	43
1.7. Tests de la catalase et de l'oxydase	43

CHAPITRE IV : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ISOLATS

1. Identification phénotypique par les galeries Api 20 E	45
2. Identification phénotypique par les galeries Api 20 NE	45

CHAPITRE V : SOLUBILISATION DES PHOSPHATES INORGANIQUES PAR LES ISOLATS PIEGES

1. Tests de solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide	46
1.1. Test de solubilisation du phosphate tricalcique sur différents milieux solides	46
1.2. Solubilisation du Phosphate tricalcique, Phosphate monocalcique et Phosphate roche (PR)	47
1.3. Effets de la variation de la concentration en extrait de levure, glucose et MgCl ₂ ...	47
2. Tests de solubilisation du phosphate roche (PR) sur milieu liquide	47
2.1. Suivi de l'évolution des valeurs de pH durant la solubilisation	49

2.2. Dosage des phosphates.....	49
---------------------------------	----

CHAPITRE VI : ESSAIS DE NODULATION DE LA PLANTE HOTE

1. Germination des graines.....	53
2. Préparation des pots	53
3. Solution d'arrosage	55
4. Inoculation des plantes de <i>Lathyrus ochrus</i> et vérification de la nodulation	55
5. Détermination du poids sec de la partie végétative	55

CHAPITRE VII : LA RESISTANCE DES ISOLATS AUX STRESS METALLIQUE ET SALIN

1. Tests de résistance à différentes concentrations en métaux lourds	57
2. Tests de résistance à la salinité.....	58

CHAPITRE VIII : CARACTERISATION DE L'ISOLAT-LEVURE LNPF38

1. Etude morphologique et physiologique de l'isolat LnPF38.....	60
2. Test de sporulation	60
3. Tests de fermentation des glucides.....	60
4. Tests de résistance aux métaux lourds	61
4.1. Résistance aux métaux lourds sur milieu de culture solide.....	61
4.2. Résistance aux métaux lourds sur milieu de culture liquide	61
5. Solubilisation des phosphates inorganiques	62
5.1. Solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu de culture solide	62
5.2. Quantification du phosphate libéré par l'isolat LnPF38 sur milieu liquide	63

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : PIEGEAGE DES RHIZOBACTERIES SUR SUBSTRAT SOL-MINERAI DE FER

1. Région d'étude	65
2. Résultats du piégeage des rhizobactéries par la légumineuse <i>Lathyrus ochrus</i>	67
3. Discussion	69

CHAPITRE II : ISOLEMENT ET CARACTERISATION CULTURALE DES RHIZOBACTERIES PIEGEES

1. Résultats	70
1.1. Isolement des rhizobia nodulaires	70
1.2. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats	71
1.2.1. Temps de croissance	71
1.2.2. Observation macroscopique et microscopique des isolats	72
1.2.3. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de rouge Congo (RC)	75
1.2.4. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de bleu de Bromothymol (BBT)	78
1.2.5. Croissance des isolats sur milieu GPA	80
1.2.6. Croissance des isolats sur milieu YMFP et sur milieu YEMA	81
1.2.7. Test au cétolactose	82
1.2.8. Coloration de Gram et la recherche de la catalase et de l'oxydase	83
2. Discussion	83

CHAPITRE III : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ISOLATS

1. Résultats de l'identification phénotypique Api 20E.....	86
2. Résultats de l'identification phénotypique API 20NE	87
3. Discussion	89

CHAPITRE IV. SOLUBILISATION DES PHOSPHATES INORGANIQUES

1. Résultats	91
1.1. Solubilisation des phosphates sur milieu solide.....	91
1.1.1. Solubilisation du phosphate tricalcique sur différents milieux solides	91
1.1.2. Solubilisation du phosphate tricalcique, monocalcique et phosphate roche (PR).....	93
1.1.3. Effets de l'extrait de levure, glucose et MgCl ₂ sur la solubilisation du phosphate	94
1.1.3.1. Effet de l'ajout de l'extrait de levure	95
1.1.3.2. Effet de l'augmentation de la concentration de glucose et de MgCl ₂	96
1.2. Solubilisation du phosphate roche (PR) sur milieu liquide.....	101
1.2.1. Cinétiques de solubilisation du phosphate	101
1.2.2. Relation entre l'acidification du milieu et la solubilisation des phosphates	101
2. Discussion	106

CHAPITRE V : NODULATION DES ISOLATS SOLUBILISATEUR DE PHOSPHATE

1. Présentation des résultats	111
2. Discussion	115

CHAPITRE VI : ETUDE DE LA TOLERANCE DES ISOLATS AUX STRESS METALLIQUE ET SALIN

1. Résultats	117
1.1. Résistance aux métaux lourds	117
1.1.1. Résistance des isolats au Zinc (Zn^{++})	117
1.1.2. Résistance des isolats au Cuivre (Cu^{++})	118
1.1.3. Résistance des isolats au Cadmium (Cd^{++}).....	119
1.1.4. Résistance des isolats au Chrome (Cr^{VI+}).....	120
1.1.5. Résistance des isolats au Cobalt (Co^{++}).....	121
1.1.6. Résistance des isolats au Nickel (Ni^{++})	122
1.1.7. Résistance des isolats au Plomb (Pb^{++})	123
1.1.8. Résistance des isolats au Fer (Fe^{++}).....	125
1.1.9. Résistance des isolats au Mercure (Hg^{++}).....	127
1.2. Tolérance au stress salin.....	131
1.3 Relation entre résistance aux métaux lourds, solubilisation du PR et la tolérance à la salinité	133
2. Discussion	136

CHAPITRE VII : CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)

1. Présentation des résultats	139
2. Discussion	139

CHAPITRE VIII : L'ISOLAT-LEVURE LNPF38

1. Résultats	148
1.1. Isolement de LnPF38	148

1.2. Caractérisation culturale et morphologique de LnPF38	148
1.3. Caractéristiques biochimiques	151
1.4. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds	152
1.4.1. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds sur milieu solide	152
1.4.2. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds sur milieu liquide	154
1.5. Solubilisation des phosphates inorganiques par l'isolat LnPF38	159
1.5.1. Solubilisation sur milieu solide	159
1.5.2. Solubilisation sur milieu liquide	160
2. Discussion	161
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
ANNEXES	197

LISTE DES ABREVIATIONS

RFCP	Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes
BSP	Bactéries qui solubilisent le phosphate
PR	Phosphate roche
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).
AO	Acide organique
<i>nod A,B,C</i>	Gènes impliqués dans la nodulation
IAA	Acide indolacétique
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
PTC	Phosphate tri-calcique
PMC	Phosphate mono-calcique
PVK	Milieu Pikovskaya
SP	Milieu Sperber
NBRIP	Milieu Institut National de la Recherche Botanique
MNBRI	
MS	Milieu Murashige et Skoog
GPA	Gélose peptone agar
RC	Rouge Congo
BBT	Bleu de bromothymol
TA	Milieu Tryptone Agar
ACP	Analyse en composante principales

CHA	Classification hiérarchique agglomérative
CMT	Concentration maximale de tolérance
CMI	Concentration minimale inhibitrice

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les exsudats racinaires des plantes interviennent dans une multitude d'interactions rhizosphériques	6
Figure 2. Arbre phylogénétique basés sur les séquences de l'ADNr 16S des rhizobia appartenant aux sous classes α , β et δ -Protéobactéries	7
Figure 3. Photos de quelques espèces de <i>Lathyrus</i> ; a. <i>Lathyrus cicera</i> , b. <i>Lathyrus clymenum</i> et c. <i>Lathyrus latifolius</i>	9
Figure 4. Arbre de consensus de règle des gènes matK (séquences de la maturase chloroplastique K)	10
Figure 5. Arbre phylogénétique des bactéries nodulaires racinaires construit sur la base d'une analyse comparative de séquences de gènes d'ARNr 16S	11
Figure 6. La légumineuse <i>Lathyrus ochrus</i> ; a. Plante, b. Fleur et c. Gousses.....	13
Figure 7. Interaction des pools de phosphore du sol avec l'absorption de P par la culture... ..	16
Figure 8. Substances produites par BSP responsables de la solubilisation du phosphate dans les sols	17
Figure 9. Mécanismes d'action des RFCP	23
Figure 10. Interaction souterraines entre légumineuse-microorganismes.....	29
Figure 11. Mécanismes de tolérances des plantes aux métaux lourds	36
Figure 12. Minerai de fer ; a. Roche du minerai de fer utilisé pour le piégeage et b. Minerai de fer enrichi utilisé pour l'isolement.....	41
Figure 13. Minerai de phosphate ; a. Phosphate roche et b. Phosphate roche broyé utilisé pour l'isolement et les tests de solubilisation	41
Figure 14. Protocole expérimental de la solubilisation des phosphates inorganique sur milieu solide	48
Figure 15. Protocole expérimental du test de la solubilisation des phosphates sur milieu liquide	50

Figure 16. Protocole expérimental du dosage des phosphates libérés dans le milieu de culture	52
Figure 17. Protocole expérimental de la germination des graines de <i>Lathyrus ochrus</i>	54
Figure 18. Protocole expérimental du test de nodulation	56
Figure 19. Protocole expérimental du test de la résistance aux métaux lourds	59
Figure 20. Champ de prélèvements des graines de <i>Lathyrus ochrus</i>	65
Figure 21. La légumineuse <i>Lathyrus ochrus</i> ; a. Plant de <i>L.ochrus</i> in situ, b. fleur, c. racines avec nodules et d. graines	66
Figure 22. Plants de <i>L.ochrus</i> nodulés après piégeage des rhizobia	68
Figure 23. Isolats à croissance moyenne sur YEMA additionné de RC ; a. LnPF32, b. LnPF18 et c. LnPF19	76
Figure 24. Les isolats à croissance rapide sur milieu YEMA additionné de RC ; d. LnPF46, e. LnPG1, f. LnPF44, g. LnPF14 et h. LnPF13	77
Figure 25. Croissance des souches de référence sur YEMA additionné de RC, i. <i>Burkholderia</i> et j. <i>Cupriavidus</i>	78
Figure 26. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de BBT ; a. LnPF46, b. LnPG1, c. LnPF44, d. LnPF14, e. LnPF19 et f. LnPF13	79
Figure 27. Croissance des souches de références sur YEMA additionné de BBT ; g. <i>Burkholderia</i> sp et h. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58).....	80
Figure 28. Croissance de LnPF46 sur milieu GPA	81
Figure 29. Croissance de LnPF14 sur ; a. YMA et b. YMFP.....	81
Figure 30. Croissance de LnPF35 sur ; a. YMA et b. YMFP.....	82
Figure 31. Croissance de LnPF6 sur ; a. YMA et b. YMFP.....	82

Figure 32. Résultat du test de ; a. catalase positive pour la LnPG1 et b. oxydase positive pour tous les isolats qui ont solubilisé le PR sur milieu liquide	83
Figure 33. Solubilisation du phosphate tricalcique (PTC) par les isolats sur les milieux MNBRI, NBRIP et PVK	93
Figure 34. Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu NBRIP. DH : diamètre de l'halo de dissolution, DC : diamètre de la colonie	100
Figure 35. Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu MNBRI	101
Figure 36. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; a. LnPF14 et b. LnPF13 (isolats à solubilisation rapide).....	102
Figure 37. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; c. LnPF44 et d. LnPF46 (Isolats à solubilisation rapide).....	103
Figure 38. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; e. LnPG2, f. et LnPF18 et g. LnPFG1 (Isolats à solubilisation moyenne).....	104
Figure 39. Cinétique de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; h. LnPF32 et i. LnPF19. (Isolats à solubilisation lente)	105
Figure 40. Germination des graines de <i>Lathyrus ochrus</i> sur milieu Murashige et Skoog	112
Figure 41. Essais de nodulation de <i>Lathyrus ochrus</i> in vitro	112
Figure 42. Photos des nodules formées sur les racines de <i>Lathyrus ochrus</i> ; A. à partir du test de nodulation et B. à partir de la nature.....	113
Figure 43. Représentation graphique du poids sec en fonction du nombre de nodules	114
Figure 44. Résistance des isolats LnPG1 et LnPG2 au Zn ⁺⁺ ; a. 12mM, b. 16mM, c. 32mM.....	117
Figure 45. Résistance des isolats au Zn ⁺⁺ sur milieu solide	118
Figure 46. Résistance des isolats au Cu ⁺⁺ ; a. 1mM, b. 2mM.....	119
Figure 47. Résistance des isolats au Cu ⁺⁺ sur milieu solide.....	119
Figure 48. Résistance des isolats au Cd ⁺⁺ ; a. 0.8mM et b. 1mM.....	120

Figure 49. Résistance des isolats au Cd ⁺⁺ sur milieu solide	120
Figure 50. Résistance des isolats à 0.2mM du Cr ^{VI+}	121
Figure 51. Résistance des isolats au Cr ^{VI+}	121
Figure 52. Résistance de LnPG1 à 1mM de Co ⁺⁺	122
Figure 53. Résistance des isolats sur milieu solide au Co ⁺⁺	122
Figure 54. Résistance de l'isolat LnPG1 à 0.7mM de Ni ⁺⁺	123
Figure 55. Résistance des isolats au Ni ⁺⁺ sur milieu solide	123
Figure 56. Résistance des isolats au Pb ⁺⁺ , a. 0.7mM, b. 1mM et c. 3mM	124
Figure 57. Résistance des isolats au Pb ⁺⁺ sur milieu solide.....	125
Figure 58. Résistance des isolats au Fe ⁺⁺ ; a. 26.05mM, b. 36.6mM	125
Figure 59. Résistance des isolats au Fe ⁺⁺ ; c. 44.75mM	126
Figure 60. Résistance des isolats au Fe ⁺⁺ sur milieu solide	126
Figure 61. Résistance des isolats au Hg ⁺⁺ ; a. 8mM, b. 15mM et c. 20mM.....	127
Figure 62. Résistance des isolats au Hg ⁺⁺ sur milieu solide	128
Figure 63. Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance des isolats solubilisateurs de phosphate aux 9 métaux lourds.....	130
Figure 64. Tolérance des isolats solubilisateur du PR à la salinité, a. 2% de NaCl sur TA, b. 5% de NaCl.....	133
Figure 65. Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance aux métaux lourds, solubilisation du PR et la tolérance à la salinité.....	134
Figure 66. CAH dendrogramme des caractères phénotypiques des neufs isolats qui solubilisent PRA et leur genre d'appartenance	140
Figure 67. Observation microscopique de l'isolat LnPF13 (G ×100).....	141
Figure 68. Observation microscopique de l'isolat LnPF19 (G ×100).....	141

Figure 69. Observation microscopique de l'isolat LnPF44 (G ×100).....	142
Figure 70. Observation microscopique de l'isolat LnPF46 (G ×100).....	142
Figure 71. Observation microscopique de l'isolat LnPG2 (G ×100)	143
Figure 72. Observation microscopique de l'isolat LnPF18 (G ×100).....	143
Figure 73. Observation microscopique de l'isolat LnPF38 (G ×100).....	144
Figure 74. Aspect macroscopique de l'isolat LnPF38.....	149
Figure 75. Coloration à la fushine des cellules de l'isolat LnPF38 (G×100).....	149
Figure 76. Coloration au Beu de méthylène des cellules de l'isolat LnPF38 (G×100).....	150
Figure 77. Les cellules de l'isolat LnPF38 à l'état frais sous microscope photonique (G×100)	150
Figure 78. Ascospores de la l'isolat sous microscope photonique (G× 40).....	151
Figure 79. Résistance de la levure LnPF38 ; a. Co ⁺⁺ (1mM), b. Cu ⁺⁺ (2mM), c. Ni ⁺⁺ (2.5mM), d. Pb ⁺⁺ (3mM), e. Fe ⁺⁺ (44.75mM) et f. Hg ⁺⁺ (20mM)	153
Figure 80. La résistance de la levure LnPF38 aux métaux lourds sur milieu solide.....	155
Figure 81. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Cr ^{VI+}	156
Figure 82. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Ni ⁺⁺	157
Figure 83. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Pb ⁺⁺	157
Figure 84. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Zn ⁺⁺	158
Figure 85. Courbes de résistance de la LnPF38 au Cd ⁺⁺	158
Figure 86. Différence entre les CMT sur milieu liquide et solide de cinq métaux lourds (Cr ^{VI+} , Ni ⁺⁺ , Pb ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ et Cd ⁺⁺)	159
Figure 87. Zone claire autour de la colonie de l'isolat LnPF38 sur milieu NBRIP solide....	160
Figure 88. Solubilisation de PMC et PTC par la levure LnPF38	16

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques morphologiques de l'espèce <i>Lathyrus ochrus</i>	14
Tableau 2. Substances favorisant la croissance libérées par RFCP	24
Tableau 3. Variation de la concentration de certains ingrédients des milieux MNBRI et NBRIP	47
Tableau 4. Les différentes concentrations utilisées pour tester la résistance des isolats aux métaux lourds	57
Tableau 5. Le nombre moyen de nodules pour chaque pot	67
Tableau 6. Isolats obtenus sur chaque milieu d'isolement.....	70
Tableau 7. Temps de croissance des isolats.....	71
Tableau 8. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (bâtonnets).....	72
Tableau 9. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (courts bâtonnets)	73
Tableau 10. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (cocci)	74
Tableau 11. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (petits et gros cocci).....	75
Tableau 12. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de RC	76
Tableau 13. Croissance des isolats sur YEMA additionné de BBT	78
Tableau 14. Croissance des isolats sur milieu GPA.....	80
Tableau 15. Les résultats des isolats de l'Api 20E.....	86
Tableau 16. Résultats des tests sur API20NE	87
Tableau 17. Assimilation des substrats de l'API 20NE	88
Tableau 18. Solubilisation des phosphates inorganiques sur milieux solides.....	92
Tableau 19. Solubilisation de trois formes de phosphates inorganiques par les isolats.....	94

Tableau 20. Effet de l'extrait de levure sur la solubilisation	95
Tableau 21. Effet de la variation de l'augmentation de la concentration de glucose et le MgCl ₂	97
Tableau 22. Test ANOVA de la solubilisation du P inorganique (PTC, CHP, PR) sur milieu.....	98
Tableau 23. Concentrations de P libéré dans le milieu de culture liquide en fonction du temp.....	106
Tableau 24. Concentration maximale de tolérance (CMT) of Zn ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Cr ^{VI+} , Co ⁺⁺ , Cd ⁺⁺ , Ni ⁺⁺ , Pb ⁺⁺ , Hg ⁺⁺ and Fe ⁺⁺ en (mM) pour les isolats qui ont solubilisé le PR.....	129
Tableau 25. Corrélation entre les variables (Test de Pearson).....	131
Tableau 26. Tolérance à la salinité des isolats solubilisateurs du PR	132
Tableau 27. Corrélation entre les variables (Test de Pearson).....	135
Tableau 28. Caractéristiques morphologiques et culturaux de LnPF38	148
Tableau 29. Assimilation et fermentation des glucides.....	151
Tableau 30. La concentration maximale de tolérance de l'isolat LnPF38 pour chaque métal testé	152
Tableau 31. La concentration maximale de tolérance de la LnPF38 pour les métaux.....	156

RESUME

Une quarantaine de plants de la légumineuse *Lathyrus ochrus* L. sont cultivés sur substrat constitué de sol prélevé de la localité de Sidi Amar près du Complexe Sidérurgique « Sider El-Hadjar » et additionné de minerai de fer.

Les nodules obtenus à partir des racines de la légumineuse *Lathyrus ochrus* développée sur ce mélange de sol pollué et de minerai de fer ont servi pour isoler un total de 51 rhizobactéries et une levure. L'isolement est réalisé sur trois milieux différents ; milieu YMFP (Yeast extract Mannitol additionné des deux minerais fer et phosphate de la roche), milieu de la gélose acétamide (GA) et milieu *Bosea* Culture Medium 115 (BCM115).

Ces microorganismes piégés ont été testé pour leur capacité à solubiliser les phosphates inorganiques y compris le phosphate roche (PR) sur différents milieux solides et l'ensemble de 26 isolats ont été sélectionné comme des rhizobactéries solubilisatrice du phosphate, mais aucun isolat n'a pu solubiliser le PR sur milieu solide. Ce test a été suivi par le test de solubilisation du PR sur milieu liquide.

Seuls neuf isolats ont solubilisé le phosphate roche sur milieu liquide avec des valeurs allant de 36.69mg/l jusqu'à 206.98mg/l.

Les tests d'infectivité ont montré que 57% des rhizobactéries peuvent induire des nodules dans leur plante hôte, et tous les nodules formés sont de couleur blanche.

L'étude de la tolérance aux stress métallique et salin a montré que la majorité des isolats ont bien résisté aux métaux lourds testés selon l'ordre suivant : Fe^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} > Cr^{VI+} > Cu^{++} > Ni^{++} > Cd^{++} > Zn^{++} > Co^{++} . Les isolats qui ont bien résisté aux métaux lourds sont souvent ceux qui ont toléré jusqu'à 5% de NaCl.

En se basant sur les caractéristiques phénotypiques, symbiotiques et biochimiques, ces rhizobactéries appartiendraient à la classe des Béta-Protéobactéries (*Burkholderia* sp et *Cupriavidus* sp) et Gamma-Protéobactéries (*Pseudomonas* sp).

Mots clés : *Lathyrus ochrus* L., rhizobactéries, phosphates inorganiques, métaux lourds, fixation d'azote.

ABSTRACT

About forty plants of the legume *Lathyrus ochrus* L. are grown on soil compound of soil taken from the locality of Sidi Amar near the steel complex Sider El-Hadjar and supplemented with iron ore.

Nodules obtained from the roots of the legume *Lathyrus ochrus* grown on this mixture of polluted soil and iron ore were used to isolate a total of 51 rhizobacteria and one yeast. The isolation is carried out on three different media; YMFP medium (Yeast extract Mannitol supplemented with the two iron ores and phosphate rock), acetamide agar medium and *Bosea* Culture Medium 115 (BCM115).

These microorganisms trapped were tested for their ability to solubilize inorganic phosphates including rock phosphate (RP) on different solid media and the set of 26 isolates were selected as rhizobacteria solubilizing phosphate, but no isolate was able to solubilize the RP on solid medium. This test was followed by the solubilization test of PR on liquid medium.

Only nine isolates solubilized rock phosphate on liquid medium with values ranging from 36.69mg/l to 206.98mg/l.

Infectivity tests have shown that 57% of rhizobacteria can induce nodules in their host plant, and all nodules formed are white.

The study of tolerance metal and saline stress showed that the majority of isolates were resistant to heavy metals tested in the following order: Fe ++, Hg ++, Pb ++> CrVI +> Cu ++> Ni ++> Cd ++> Zn ++> Co ++. Isolates that have been resistant to heavy metals are often those that have tolerated up to 5% NaCl.

Based on the phenotypic, symbiotic and biochemical characteristics, these rhizobacteria belong to the class of Beta-*Proteobacteria* (*Burkholderia* sp and *Cupriavidus* sp) and Gamma-*Proteobacteria* (*Pseudomonas* sp).

Keywords: *Lathyrus ochrus* L., rhizobacteria, inorganic phosphate, heavy metals, nitrogen fixation.

ملخص

حوالي 40 نبتة من البقوليات *Lathyrus ochrus* L تم زرعها على ركيزة تتكون من تربة مأخوذة من منطقة سيدي عمار بالقرب من مجمع سيدار الحجار للحديد والصلب مضاف إليها معدن الحديد.

تم استخدام العقيدات المتحصل عليها من جذور البقوليات *Lathyrus ochrus* L التي نمت في هذا المزيج من التربة الملوثة وخام الحديد لعزل 51 ريزوبكتيريا وخميرة. تم العزل باستعمال ثلاثة اوساط مختلفة؛ YMFP (مضاف إليه اثنين من المعادن الحديد والفسفات) و gélose acétamide و *Bosea culture medium* (BMC115).

تم اختبار هذه الكائنات الحية الدقيقة لقدرتها على إذابة الفوسفات غير العضوي بما في ذلك الفوسفات الصخري (PR) باستعمال اوساط صلبة مختلفة وتم اختيار مجموعة مكونة من 26 عزلة على أنها ريزوبكتيريا قابلة لاذابة الفوسفات، لكن لم تتمكن أي عزلة من اذابة صخرة الفوسفات في الاوساط الصلبة. أستكمل هذا الاختبار باختبار إذابة صخرة الفوسات في وسط سائل.

تسع عزلات فقط اثبتت قدرتها على اذابة صخرة الفوسات في وسط سائل بقيمة تتراوح من 36.69 ملغم / لتر إلى 206.98 ملغم / لتر.

لقد أظهرت اختبارات قدرة العزلات على تشكيل عقيدات في جذور نبتتها المضيفة على أن 57 % من البكتيريا لديها هذه الخاصية، وجميع العقيدات التي تكونت بيضاء اللون.

ان دراسة مقاومة الاجهاد اللاحيوي أظهر أن غالبية العزلات قاوموا المعادن الثقيلة بشكل جيد وهذا بحسب الترتيب التالي: الحديد والزنك والرصاص < كروم < النحاس < نيكال < الكادميوم < الزنك < الكوبالت وغالباً ما تكون العزلات المقاومة للمعادن الثقيلة هي تلك التي تتحمل نسبة تصل إلى 5% من كلوريد الصوديوم.

استناداً إلى الخصائص المظهرية والتكافلية والكيميائية الحيوية، تنتمي هذه البكتيريا إلى فئة البكتيريا -Béta Protéobactéries و *Cupriavidus* sp و *Burkholderia* sp و *Gamma-Protéobactéries* (*Pseudomonas*)

الكلمات المفتاحية: *Lathyrus ochrus* L ، ريزوبكتيريا، الفوسفات الغير عضوي، المعادن الثقيلة، تثبيت النروجين.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les préoccupations majeures du monde moderne sont la durabilité des systèmes agricoles et la conservation de la qualité de l'environnement (Khalid et al, 2009). La demande croissante en engrais chimiques et pesticides et la sensibilisation aux dommages environnementaux et humains causés par leur surexploitation, ont permis de développer différentes méthodes de lutte biologique (Beauchamp, 1993 ; Gamalero et Glick, 2012).

L'une des principales solutions est l'utilisation dans les pratiques agricoles d'espèces bactériennes associées à la rhizosphère de la plante ; appelées "Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes" (RFCP) (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Vafadar et al, 2014) et ce afin de réduire l'utilisation d'engrais chimiques et soutenir une production agricole durable et respectueuse de l'environnement (Hayat et al, 2012).

Les RFCP stimulent la croissance des plantes par plusieurs mécanismes : **(a)** la solubilisation du phosphate inorganique et la minéralisation du phosphate organique ; **(b)** la fixation de l'azote atmosphérique ; **(c)** la bioremédiation des sols pollués en séquestrant les métaux lourds toxiques ; **(d)** la production de sidérophores et d'enzymes et **(e)** la production de phytohormones (Jha et al, 2017, Ahemad et Kibret, 2013 ; Wekesa et al, 2016).

Le phosphate (P) est le deuxième engrais minéral indispensable au développement et à la croissance des plantes (Hameeda et al, 2008), il intervient dans la majorité des processus métaboliques de la plante, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la respiration et la biosynthèse macromoléculaire (Gupta et al, 2015).

Les bactéries qui solubilisent les phosphates (BSP) transforment le phosphate inorganique en formes solubles (Mohammadi et Sohrabi, 2012), et sont donc des alternatives écologiques uniques qui pourraient offrir une nutrition en P durable et supprimer également les effets néfastes des excès d'engrais phosphatés sur la santé des écosystèmes (Arif et al, 2017).

Les genres bactériens les plus utilisés comme BSP sont : *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* et *Serratia* (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Barreto et al, 2010 ; Dey et al, 2014).

Les BSP utilisent plusieurs mécanismes de solubilisation de P : **(a)** la libération de composés de dissolution tels que les acides citrique, lactique, gluconique, 2-cétogluconique, oxalique, tartarique et acétique (Ivanova et al, 2006), **(b)** la libération d'enzymes extracellulaires (minéralisation phosphatée biochimique) et **(c)** la libération de phosphate pendant la dégradation du substrat (minéralisation biologique du phosphate) (Sharma et al, 2013).

En ce qui concerne la bioremédiation, il faut noter que les métaux lourds sont des composants naturels de la croûte terrestre, cependant les activités industrielles comme l'extraction des minerais et l'irrigation par les eaux usées ont considérablement accru les concentrations en métaux lourds dans le sol. En raison de leur nature non dégradable, les métaux lourds peuvent contaminer les plantes, s'infiltrer dans les eaux souterraines, compromettant ainsi la santé humaine (Yuan et al, 2017).

La présence de métaux lourds à des concentrations élevées dans l'environnement provoque leur absorption via les racines des plantes où elles les transfèrent vers les pousses et les feuilles, causant ainsi un stress qui perturbe le métabolisme, réduit la croissance et même la mort de la plante (Shinwari et al, 2015). La bioamplification des métaux lourds à travers la chaîne alimentaire constitue une menace persistante pour notre santé, où la contamination par les métaux lourds a été associée à des malformations congénitales, au cancer, à des lésions cutanées, des difficultés d'apprentissage et beaucoup d'autres maladies (Meliani et Bensoltane, 2016).

Par conséquent l'application de RFCP capables d'adsorber les ions métalliques (Patel et al, 2016), et réduire leur mobilité et leur disponibilité par plusieurs mécanismes tels que l'acidification, les changements redox, la production de chélateurs et de sidérophores (Zhuang et al, 2007 ; Jha et al, 2017).

La fixation biologique de l'azote constitue le complément le plus prometteur pour remplacer les engrais chimiques azotés, elle fait l'objet de nombreuses études portant sur la fixation associative, libre et symbiotique de l'azote par la microflore rhizosphérique des légumineuses (Ramachandran et al, 2003).

Les espèces de *Lathyrus* jouent un rôle important dans l'écosystème naturel et elles établissent une relation symbiotique avec les rhizobia du sol fixatrices d'azote (XinHua et al, 2009).

L'adaptabilité des espèces de *Lathyrus* à tous types de sols ainsi qu'aux conditions climatiques défavorables et aux environnements à faible teneur en eau ; est à l'origine de leur diversité d'habitats (Campbell, 1997). La plupart d'entre elles peuvent être utilisées dans l'alimentation humaine, comme fourrage (Badr et al, 2009) et engrais vert et aussi comme plantes de couverture pour la conservation du sol et de l'eau.

Récemment, l'absorption des métaux lourds par des espèces de *Lathyrus* spp. a également été étudiée et donc comme conséquence leur utilisation en tant que solutions alternatives dans la bioremédiation des métaux lourds (XinHua et al, 2009 ; Piergiovanni et Damascelli, 2011).

En Algérie, *Lathyrus sativus* connue sous le nom de « *Guerfala* » est l'espèce cultivée par les populations locales pour la nutrition humaine (2^{ème} National Report, 2006).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la légumineuse *Lathyrus ochrus* L. qui pousse naturellement sur sol pollué du Campus de l'Université Badji Mokhtar de Annaba et d'étudier les potentialités des rhizobactéries associées à cette espèce.

L'objectif de ce travail est l'étude des rhizobactéries présentes dans les nodules racinaires de la légumineuse de *Lathyrus ochrus* L. afin de sélectionner les rhizobactéries solubilisatrices de phosphates inorganiques et résistantes à des concentrations élevées en métaux lourds et en sel (NaCl).

Une caractérisation des isolats basée sur l'étude de leurs capacités à solubiliser les phosphates inorganiques, y compris le phosphate roche de la mine de Kef Essennoun Djebel Onk (Wilaya de Tébessa).

Ce travail s'articule autour de trois grandes parties :

- *Une première partie* constituée de trois chapitres qui décrivent les légumineuses et particulièrement le genre *Lathyrus* ; des généralités sur les phosphates et le mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes.
- *Une deuxième partie* constituée de huit chapitres ; décrivant les matériels et méthodes utilisés pour le piégeage, l'isolement et la caractérisation morphologique et biochimique des microorganismes piégés par la légumineuse *Lathyrus ochrus* L..
- *Une troisième partie* inclut huit chapitres qui présentent les résultats obtenus et leurs discussions.
- Enfin, les conclusions tirées de ce travail et les perspectives pour des études ultérieures.

PARTIE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES LÉGUMINEUSES ET LE GENRE *LATHYRUS*

1. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones dont les fruits sont des gousses et elles forment une grande famille appelée Fabaceae ou Leguminosae qui contient trois sous famille : les Faboideae (ou Papilionoideae), Mimosoideae et Caealpinioideae. C'est la troisième plus grande famille d'angiosperme qui comprend environ 20000 espèces et 750 genres, où seulement un nombre réduit d'espèces est utilisé dans l'alimentation humaine et animale (Mega Rusydi et al, 2011 ; Peix et al, 2015).

La morphologie, l'habitat et l'écologie des légumineuses sont très diversifiés, allant des annuels arctiques aux arbres tropicaux (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Leurs productions et utilisations remontent à d'anciennes cultures en Asie, au Moyen-Orient, en Amérique du Sud et en Afrique du Nord (Annor et al, 2014). Une large gamme de légumineuses est cultivée dans le monde entier et même dans les climats tempérés pour la production de graines et la récolte de pousse entière (Fustec et al, 2009 ; Schuster-Gajzágó, 1998).

Depuis le début de l'histoire de l'humanité les légumineuses sont une excellente source de protéines (deux à trois fois plus que les céréales), de glucides complexes. Aussi les légumineuses constituent une bonne source de vitamines (thiamine, riboflavine, niacine, vitamine B6 et acide folique), de certains minéraux tels que : Ca, Fe, Cu, Zn, P, K et Mg et d'acides gras polyinsaturés.

Elles sont également riches en composés protecteurs de la santé (composés phénoliques, inositol phosphates et oligosaccharides) (Reyes-Moreno et al, 1993 ; Schuster-Gajzágó, 1998 ; Annor et al, 2014). Leurs graines contiennent entre 390-510g/Kg d'amidon et entre 200-250g/Kg de protéines et leur teneur importante en fibres alimentaires est un facteur très important du point de vue nutritionnel (Schuster-Gajzágó, 1998).

Plusieurs études suggèrent qu'une consommation accrue de légumineuses pourrait offrir une protection contre certaines maladies entre autre : les maladies cardio-vasculaires, le cancer,

-CHAPITRE I-

le diabète, l'ostéoporose (Hu, 2003 ; Pihlanto et Korhonen, 2003 ; Tharanathan et Mahadevamma, 2003).

Les légumineuses constituent donc un apport nutritionnel riche pour l'alimentation humaine avec un rôle croissant comme fourrage produisant de haute qualité de viande et de lait, participant ainsi à la sécurité alimentaire ; car en raison de la croissance démographique et la taille croissante des villes la quantité des terres disponibles pour cultiver des aliments diminue ce qui augmentera les coûts de l'agriculture, les engrais artificiels et autres produits chimiques (Nieuwenhuis et Nieuwelink, 2005 ; Rubiales et Mikic 2015).

En plus de leur rôle clé pour l'alimentation, les légumineuses sont connues pour leur fixation biologique de l'azote atmosphérique, réduisant les coûts énergétiques, améliorant les conditions physiques du sol et la biodiversité (Rubiales et Mikic 2014).

La culture des légumineuses constitue la solution de nos problèmes actuels et contribue à l'équilibre des systèmes agroécologiques (Shneider et Huyghe, 2015).

Parmi les légumineuses on trouve la vesce chypriote (*Lathyrus ochrus*), les féveroles (*Vicia faba*), les lentilles (*Lens culinaris*), le soja (*Glycine max*), le lupin (*Lupinus spp.*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la gesse (*Lathyrus sativus*) et aussi la luzerne (*Medicago sativa*), les trèfles (*Trifolium spp.*), le sainfoin (*Onobrychis*), le lotier (*Lotus spp.*), la vesce (*Vicia sativa*), le pois fourager (*Pisum spp.*) et (Shneider et Huyghe, 2015).

2. Association légumineuses-rhizobia

Les légumineuses établissent une association bénéfique avec un groupe de bactéries appelé rhizobia (Fig 1) et cette relation est connue depuis plus d'un siècle quand Beijerinck (1888) a obtenu la première culture bactérienne pure à partir d'un nodule de légumineuse responsable de la fixation de l'azote, un an plus tard Frank nommait cette bactérie *Rhizobium leguminosarum* et à partir de cette date les bactéries qui forment des nodosités chez les légumineuses sont appelées Rhizobiums ou rhizobia (Peix et al, 2015).

Pendant plus d'un siècle les rhizobiums ont été considérés comme les bactéries uniques capables de produire des nodosités chez les légumineuses. Cependant le fait le plus important à partir de l'année 2000 était la découverte de genre non rhizobiens capables de produire des nodosités chez les légumineuses et c'est en 2001, les rapports de deux bactéries atypiques appartenant aux genres *Methylobacterium* et *Burkholderia* capable de noduler les légumineuses

et fixer l'azote ouvrent de nouvelles pistes de recherche des bactéries non-rhizobiales (Moulin et al, 2001 ; Sy et al, 2001).

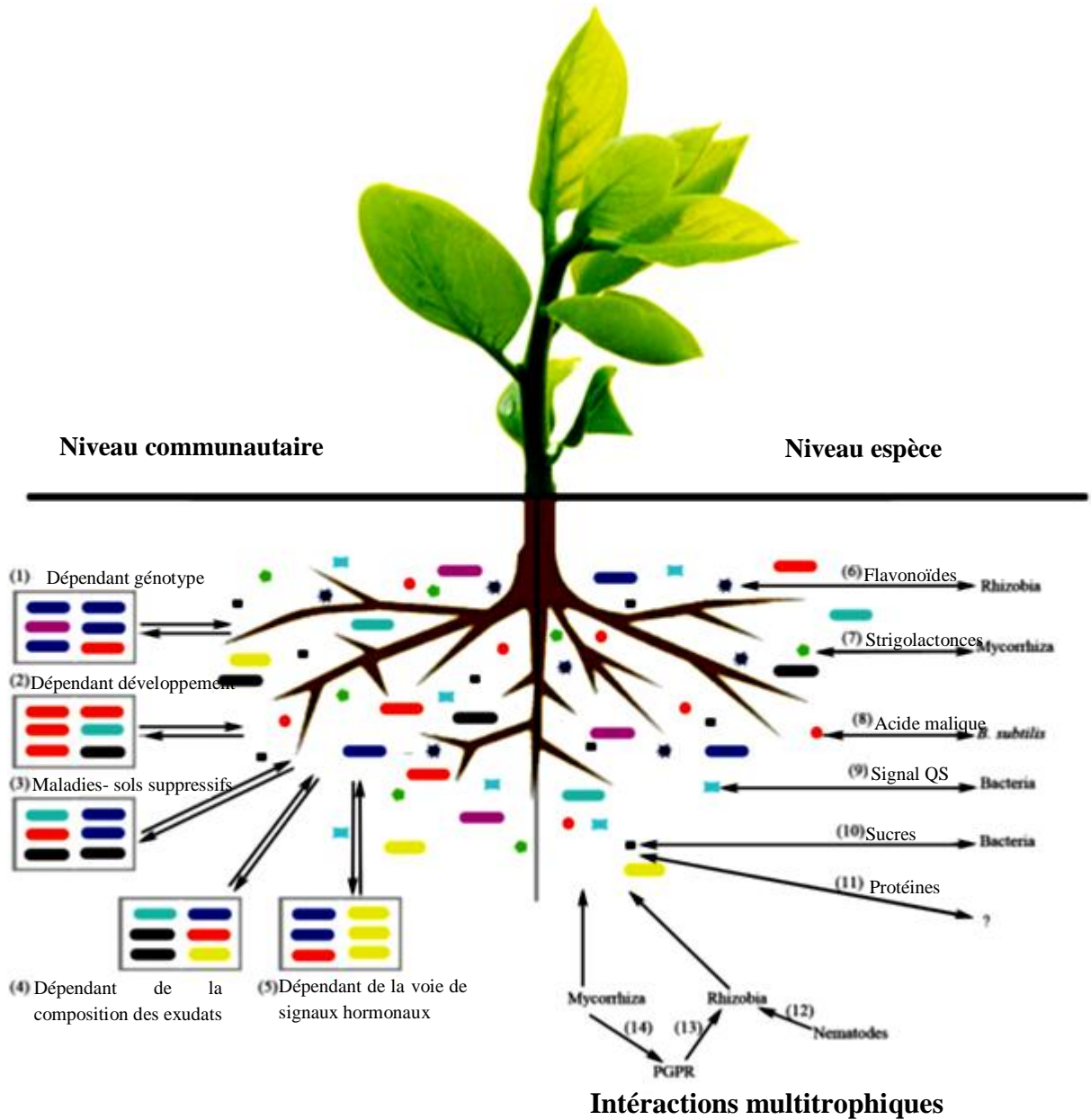


Fig 1. Les exudats racinaires des plantes interviennent dans une multitude d'interactions rhizosphériques ; au niveau de l'espèce (à droite), aux interactions multitrophiques (en bas) et au niveau de la communauté (à gauche) (Huang et al, 2014).

La présence de gènes de nodulation *nod* ABC phylogénétiquement liés à ceux trouvés dans les rhizobies classiques dans *Burkholderia*, soutient l'hypothèse du transfert de gène latéral

-CHAPITRE I-

dans la rhizosphère traversant les frontières entre alpha et bêta-protéobactéria (Moulin et al, 2001 ; Bontemps et al, 2010) (Fig 2).

La capacité d'induire des nodules chez les légumineuses a également été démontrée chez plusieurs espèces du genre : *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, *Aminobacter* et *Microvirga* (Peix et al, 2015).

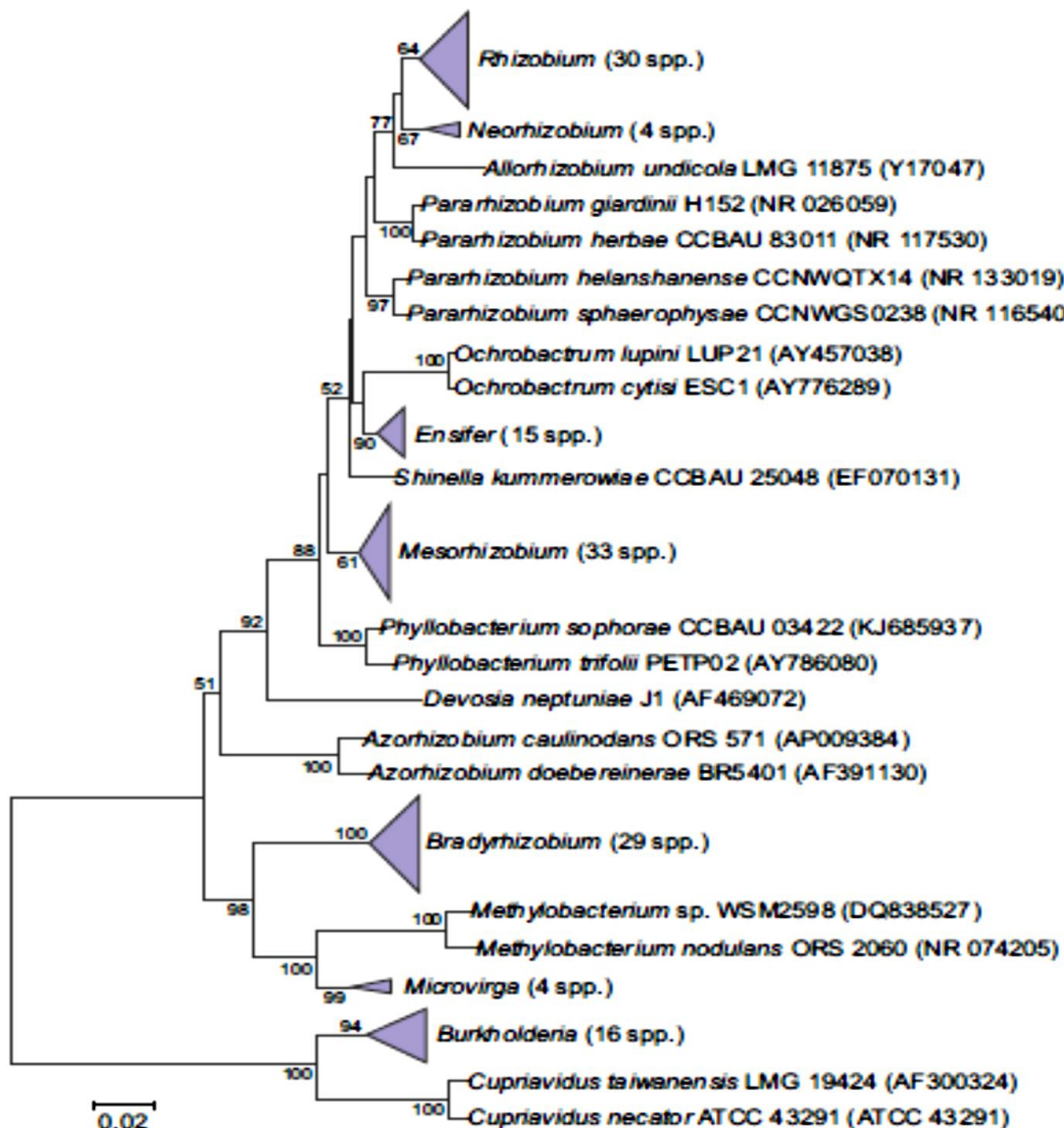


Fig 2. Arbre phylogénétique montrant les relations des genres et espèces actuellement décrits des rhizobia alpha et bêta-Proteobacteria, basé sur séquences alignées du gène de l'ARNr 16S (région interne de 1341 pb) (Sprent et al, 2016).

3. La légumineuse *Lathyrus*

3.1. Généralités

Le genre *Lathyrus* appartient à la famille Fabaceae (synonyme de Viciae) avec *Vicia*, *Lens*, *Pisum* et *Vavilovia* (Patto et Rubiales, 2014). C'est le plus grand genre au sein de cette famille (Sammour et al, 2007) avec environ 187 espèces et sous espèces (Mclutchan, 2003).

Les espèces du genre *Lathyrus* sont réparties dans les régions tempérées dans tout l'hémisphère Nord avec une disjonction en Amérique du Nord et du Sud (Kahraman et al, 2012). Son principal centre de diversité est dans les régions méditerranéennes (Patto et Rubiales, 2014) où il s'étend en Algérie, Syrie, Liban, Egypte, Libye, Maroc, France et en Espagne (Sammour et al, 2007).

De nombreuses espèces de *Lathyrus* sont des mésophytes à port dressé, grimpant ou tentaculaire et préférant les forêts ouvertes, les lisières forestières, les bordures de routes et les habitats littoraux (Kahraman et al, 2012).

Les espèces de *Lathyrus* sont utilisées pour la couverture du sol, comme engrais vert, contrôle de l'érosion et la réhabilitation des terres incultes et brûlées (Drouin et al, 1996).

En Algérie, le genre *Lathyrus* est cultivé principalement pour la production de grains (aliments) et est également utilisé comme fourrage par les agriculteurs marginaux (Boukecha et al, 2017). En raison de la résistance des espèces de *Lathyrus* à la sécheresse, la résistance des graines aux ravageurs, l'adaptabilité à presque tous les types de sol ainsi que les conditions climatiques défavorables (Sammour et al, 2007), le *Lathyrus* peut jouer un rôle important dans les immenses défis agricoles actuels.

Les membres du genre *Lathyrus* comprennent des cultures vivrières et fourragères, les plantes ornementales, les nitrifiants du sol, les stabilisateurs de dunes, les plantes agricoles importantes, les mauvaises herbes et les organismes modèles pour la recherche génétique et écologique (Patto et Rubiales, 2014), entre autre *Lathyrus sativus* est largement cultivée comme culture vivrière, tandis que d'autres espèces sont cultivées dans une moindre mesure pour la nourriture et le fourrage.

Ces espèces comprennent *L. ochrus*, *L. cicera* et *L. clymenum* pour la consommation de leurs graines mais principalement pour la production de fourrage ; *L. tingitanus*, *L. latifolius*

-CHAPITRE I-

et *L. sylvestris* en tant qu'espèces fourragères ; *L. odoratus* à des fins ornementales (Fig 3). Aussi l'espèce *Lathyrus amphicarpus*, se trouve actuellement au Moyen Orient et a le potentiel de devenir importante en tant qu'espèces fourragères auto-ensemencées (Campbell, 1997).



Fig 3. Photos de quelques espèces du genre *Lathyrus* ; a. *L. japonicus*, b. *L. sativus*, c. *L. cicera* d. *L. latifolius*.

3.2. Phylogénie du genre *Lathyrus*

L'arbre phylogénétique de la légumineuse du genre *Lathyrus* est représenté ci-dessous pour évaluer les relations au sein du genre *Lathyrus*, tant au niveau de la section que de l'espèce (Oskoueiyani et al, 2015) (Fig 4).

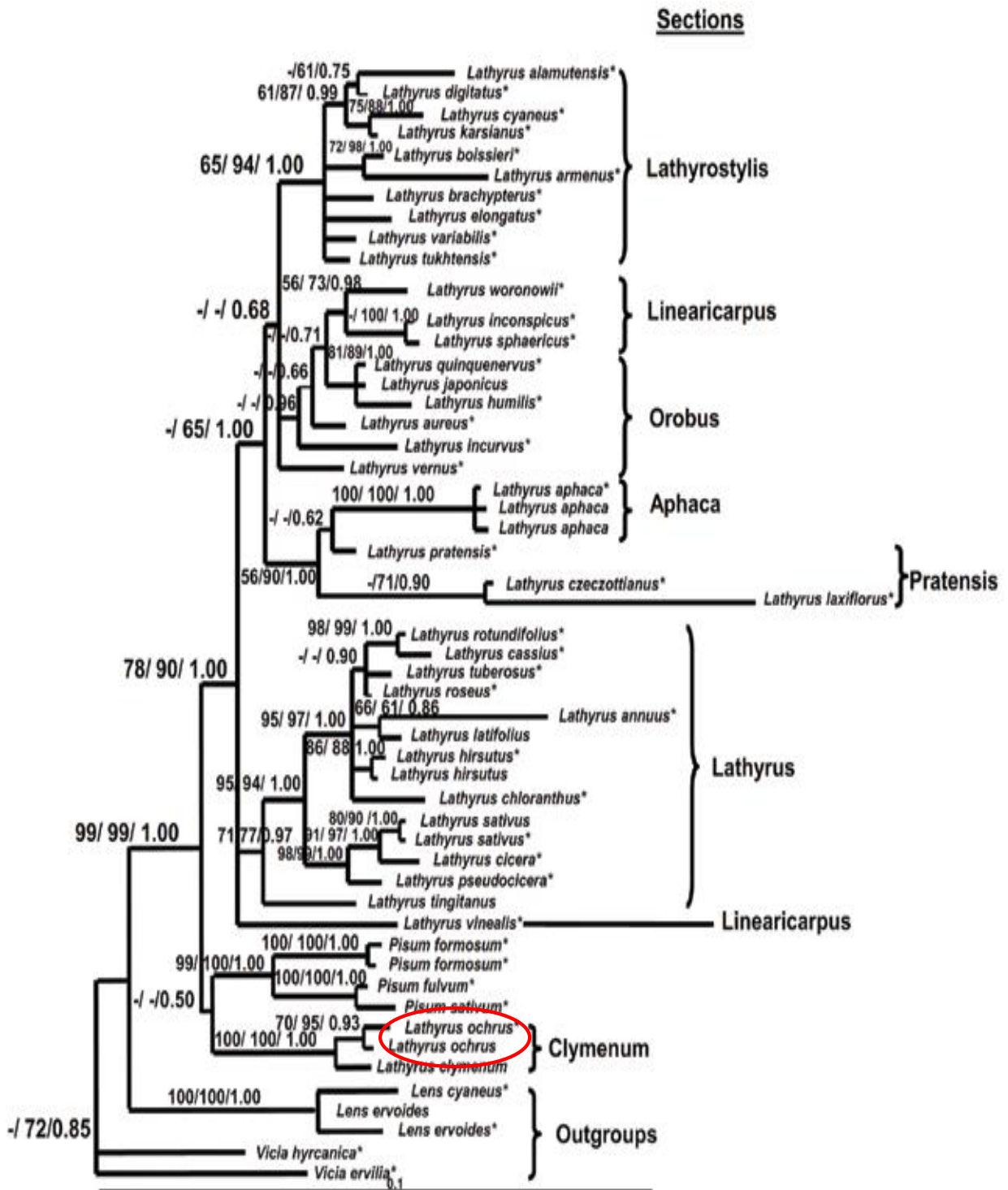


Fig 4. Arbre de consensus de règle des gènes matK (séquence de la maturase chloroplastique K) (Oskoueian et al, 2015)

3.3. Phylogénie des rhizobia symbiotiques du genre *Lathyrus*

L'analyse phylogénétique des rhizobactéries nodulaires de l'espèce *Lathyrus vernus* L. est représentée dans la fig 5.

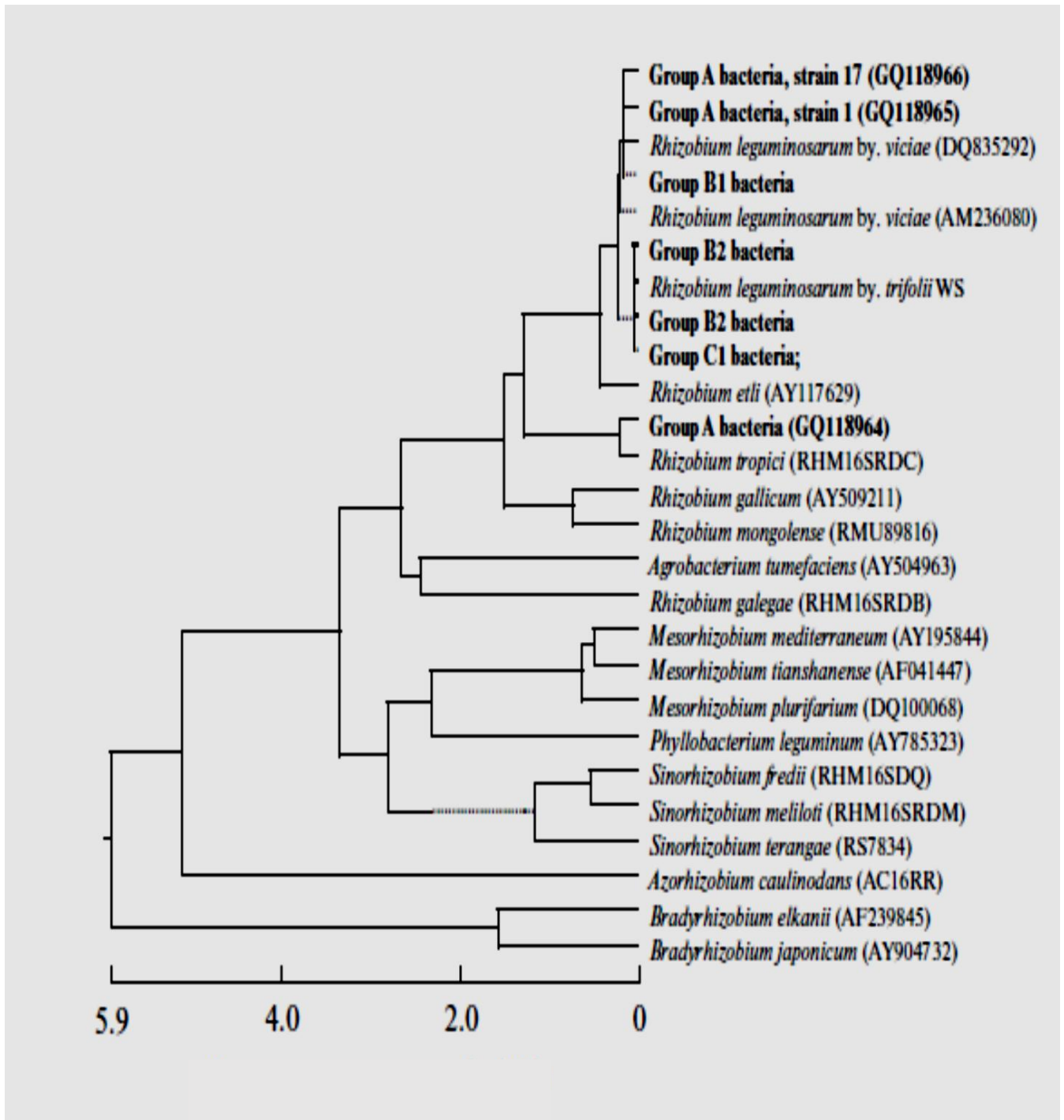


Fig 5. Arbre phylogénétique basé sur le gène ARNr 16S chez *Lathyrus vernus* L. (Baymiev et al, 2012)

3.4. L'espèce *Lathyrus ochrus* L.

Lathyrus ochrus est une légumineuse étalée à tiges ailées atteignant une hauteur de 20-70cm avec des fleurs solitaires ou paires de gousses glabres, de couleur fauve à maturité avec des lamines longitudinales, chaque gousse contenant 4-8 rondes noir (ou vert, brun, crème), souvent de la taille d'un pois (Fig 6). Elle est distribuée en Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Libye et Maroc, en Europe méditerranéenne : Portugal, Espagne, Sud de la France, Corse, Sardaigne, Italie, Sicile, Malte, Yougoslavie, Grèce. Aussi en Crimée, Îles Égéennes, Chypre, Syrie, Liban, Palestine, Turquie. Cette légumineuse est connue localement sous le nom de «fava» et a été utilisée pour la consommation humaine (Campbell, 1997).

Les graines de variétés locales de *Lathyrus ochrus* sont riches en protéines avec une teneur moyenne de 295g/kg de matière sèche et positivement corrélée avec l'activité inhibitrice de la trypsine (Aletor et al, 1994). Les populations sauvages de *Lathyrus ochrus* ont des teneurs plus élevées en vitamine : C, K1, lutéine B-carotène, Y tocophérol et polyphénol total dans la biomasse aérienne que dans les espèces cultivées (De La Rosa et Martin, 1995).

Dans une expérience réalisée sur des moutons en Australie du Sud, une race locale de *Lathyrus ochrus* a montré de bonnes performances par rapport à huit autres légumineuses avec un coefficient de digestibilité de la matière sèche de 66.7%, une teneur en azote de 4.9% dans les graines et 1.1% dans les résidus de récolte et un gain de poids chez les moutons de 9.8kg pendant douze semaines de l'expérience entière (Mikic et Mihailović, 2014). Aussi selon Sillero et al (2005), ont trouvés des niveaux élevés de résistance de *Lathyrus ochrus* à *Orobanche crenata*, et le principal mécanisme de résistance semble être un obstacle précoce à l'établissement de l'*O.crenata* car aucun ou peu de tubercules de l'Orobanche ont été observés dans des conditions naturelles.

Ces bienfaits de cette espèce s'ajoutent à son rôle clé en transformant l'azote atmosphérique en ammoniac, en association avec les rhizobia ; participant ainsi à la fertilité des sols et la préservation de l'environnement.

3.4.1. Caractéristiques morphologiques de l'espèce *Lathyrus ochrus* L.

Le tableau 1 décrit quelques caractéristiques morphologiques de l'espèce *Lathyrus ochrus* (Quezel et Santa, 1962 ; Lapeyronie, 1982 ; Yamamoto et al, 1984 ; Benbrahim et al, 2001 ; Badr, 2007).



Fig 6. La légumineuse *Lathyrus ochrus* ; a. Plante, b. Fleur, c. Gousses.

Tableau 1. Caractéristiques morphologiques de l'espèce *Lathyrus ochrus*

Noms communs	Gesse ochre, gesse ocre ou moret d'Espagne
Cycle de vie	Annuel
Régime de reproduction	Autogame
Nombre de chromosomes	14
Tiges	Longues, faibles, droites, glabres, ailées, grimpantes
Feuilles	Inférieures et moyennes simples, ovales oblongues. Supérieures à 1-2 paires de folioles ovales, vrilles rameuses
Fleurs	Grandes, solitaires
Gousses	Linéaire comprimée, ailée, veinée, glabre
Graines	Sphériques

3.4.2. Classification botanique de l'espèce *Lathyrus ochrus* L.

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous famille : Faboideae

CHAPITRE II : LES PHOSPHATES

1. Le phosphate dans le sol

Le phosphate est le nutriment majeur limitant la croissance et le développement des plantes terrestres après l'azote (Viruel et al, 2014 ; Shakeela et al, 2017). Il est essentiel à toutes les formes de vie connue et s'implique dans plusieurs processus physiologiques et biochimiques clés tels que : le métabolisme énergétique (ATP), la photosynthèse, la dégradation des glucides, la respiration, la fixation d'N, la régulation des enzymes, le mouvement des nutriments dans la plante et le transport des caractéristiques génétiques d'une génération à la suivante (Johnston et Steén, 2000 ; Viruel et al, 2014).

Le phosphate est également l'élément majeur de la matière organique du sol et des écosystèmes terrestres naturels, il provient de l'altération des roches mères (Lajtha et al, 1999), des apports de P sous forme d'engrais, de résidus végétaux, de déchets agricoles et/ou biosolides (Mullins, 2009).

Les sols peuvent contenir de grandes réserves de phosphate total (entre 400 et 1200mg/kg de sol), mais les quantités disponibles pour les plantes ne représentent habituellement qu'une infime proportion de ce total (Glick, 2012 ; Apostu et al, 2010), parce qu'il est facilement converti en complexes insolubles tels que les oxydes de fer et d'aluminium et les complexes de phosphates de calcium (Sandilya et al, 2016).

Le P se trouve dans les sols sous différentes formes (Fig 7) physico-chimiques (Lajtha et al, 1999) y compris le phosphate inorganique et organique. Ces formes de P diffèrent par leur comportement et leur devenir dans les sols (Shen et al, 2011).

Selon le FAO (2005) le phosphate se trouve dans le sol sous trois formes :

- Une forme accessible : lié au complexe argilo-humique par le calcium et le magnésium ;
- Une forme combinée : immobilisé en partie par les hydroxydes d'aluminium et de fer dans les sols acides ;
- Une forme insoluble : en sol calcaire sous forme de phosphates de calcium.

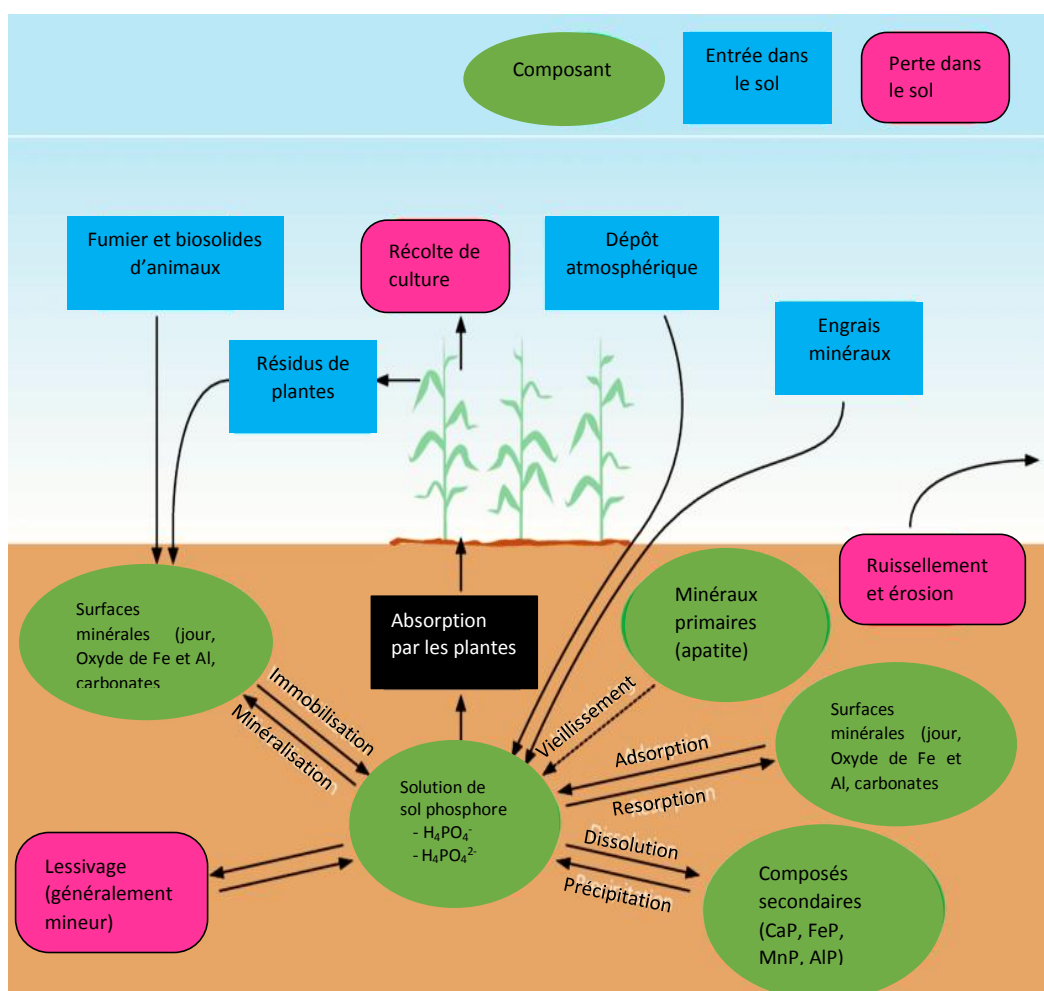


Fig 7. Interaction des pools de phosphate du sol avec l'absorption de P par la culture (Meyer, 2013)

2. Les bactéries solubilisatrices du phosphate (BSP)

Ce sont des bactéries hétérotrophes qui jouent un rôle primordial dans la dynamique du P dans les sols et la disponibilité subséquente de phosphate pour les plantes (Shakeela et al, 2017), en convertissant les P insolubles en formes solubles (Walpola et Yoon, 2013). Les plantes ne peuvent absorber le P que sous deux formes solubles, l'anion orthophosphate primaire (H_2PO_4) et de plus petite quantité de l'orthophosphate secondaire (HPO_4^{2-}) (Mullins, 2009).

Les BSP appartiennent à plusieurs genres y compris : *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* (Apostu et al, 2010), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Sandilya et al, 2016), *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Peanibacillus* (Viruel et al, 2014), *Beijerinckia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* (Gupta et al, 2015).

Ces PSB solubilisent les P inorganiques par acidification, chélation, réactions d'échange et par la production d'acides organiques (A.O) (Viruel et al, 2014).

3. Mécanismes d'action de la solubilisation/minéralisation des phosphates

La plupart des sols contiennent des réserves considérables de phosphate total, qui est considéré comme l'élément clé pour la croissance des plantes, mais une grande partie de ce phosphate reste relativement immobile et seulement moins de 10% du phosphore du sol entre dans le cycle végétal-animal (Jain et Singh, 2015). Plusieurs mécanismes sont utilisés par les BSP pour rendre le phosphate du sol assimilable et disponible par les plantes (Fig 8).

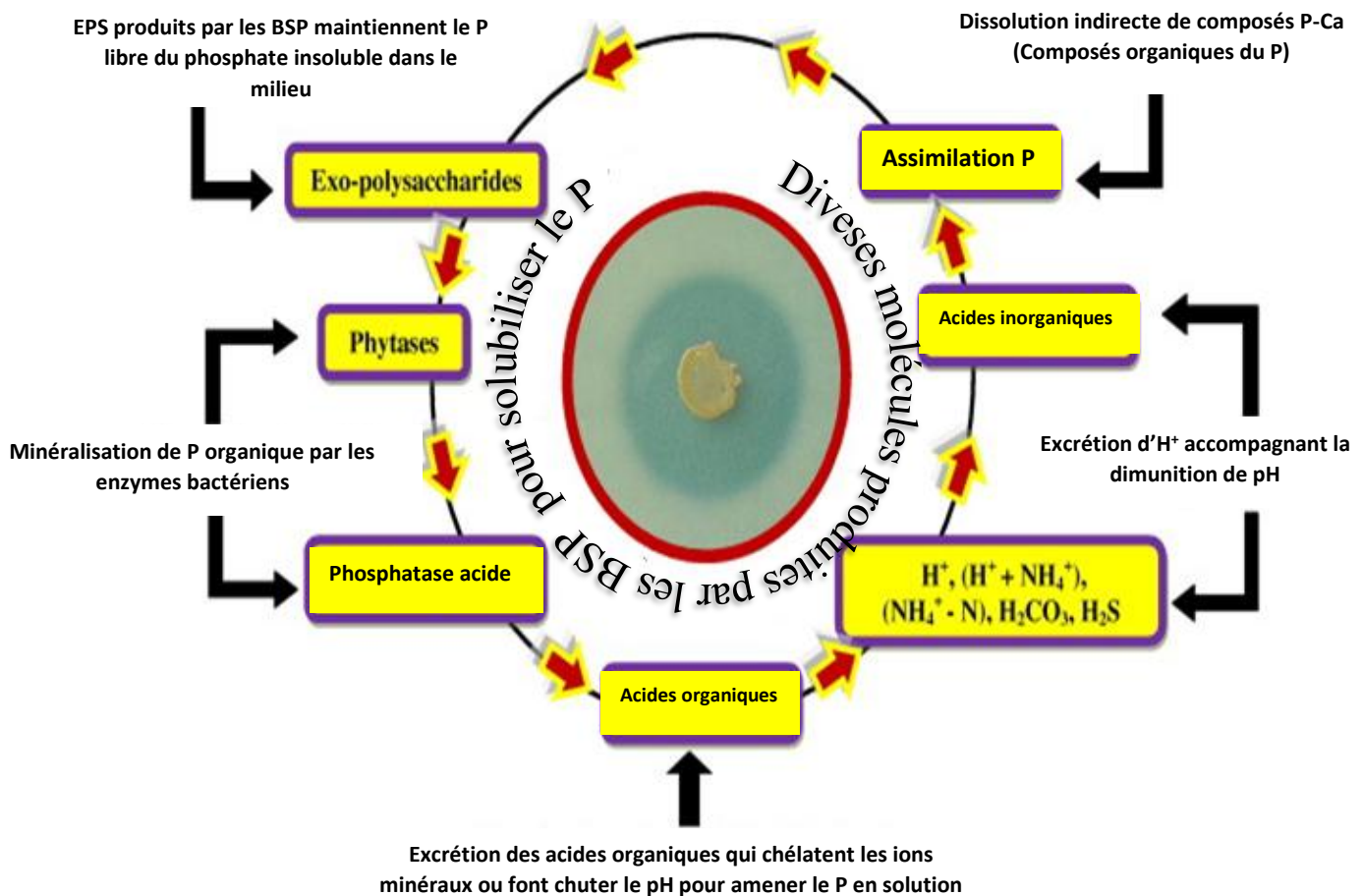


Fig 8. Substances produites par BSP responsables de la solubilisation du phosphate dans les sols (Ahemad et Kibrat, 2013)

3.1. Solubilisation des phosphates inorganiques

Le P inorganique représente 35 à 70% du P total dans les sols (Shen et al, 2011). Les BSP utilisent plusieurs mécanismes pour rendre le phosphate présent dans la rhizosphère utilisable par la plante. Le principal mécanisme de solubilisation de phosphate est la production de composés de complexation ou de dissolution minérale tels que : les acides organiques (AO), sidérophores, protons, les ions hydroxydes et le CO₂ (Alori et al, 2017 ; Ingle et Padole, 2017).

3.1.1. Par la production d'acides organiques (AO)

Parmi les diverses stratégies adoptées par les bactéries, l'implication des AO de faibles poids moléculaire sécrétés par les BSP a été une théorie bien reconnue et largement acceptée comme le principal moyen de solubilisation de P, et plusieurs études ont identifié et quantifié les AO et confirmer leurs rôles dans le processus de solubilisation (Khan et al, 2014).

Les AO sont produits dans l'espace périplasmique et sont le produit du métabolisme microbien principalement par la respiration oxydative ou par la fermentation de source de carbone organique (Sharma et al, 2013 ; Alori et al, 2017). Plusieurs AO sont impliqués dans la solubilisation des phosphates inorganiques y compris : fumarique, lactique, citrique, glycolique, malonique, tartrique et succinique (Thakur et al, 2014). Plusieurs études ont déterminé que : *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Azotobacter*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus megaterium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia marcescens*, *Delftia*, *Chryseobacterium*, *Phyllobacterium myrsinacearum* produisent des acides organiques pour solubiliser les phosphates inorganiques (Khan et al, 2014).

L'excrétion de ces AO s'accompagne :

(1) une baisse de pH, (2) par réaction de chélation de cations liés au P, (3) en rivalisant avec P pour les sites d'adsorption sur le sol (Ingle et Padole, 2017).

L'abaissement du pH rhizosphérique dissocie les formes liées de P comme Ca₃(PO₄)₂. Aussi cette acidification libère le P de l'apatite par substitution/excrétion d'H⁺ ou libération de Ca²⁺ (Thakur et al, 2014).

3.1.2. Par la production de dioxyde de carbone (CO₂)

Le dioxyde de carbone est également responsable de la solubilisation de P inorganique et augmente ainsi la disponibilité de phosphore pour les plantes en abaissant le pH dû à la

formation d'acide carboxylique dans la rhizosphère (Thakur et al, 2014). Ce type d'acidification a été observé dans la solubilisation des P de calcium (Walpolo et Yoon, 2013).

3.2. Minéralisation biologique des phosphates organiques

Le phosphate organique peut constituer 30 à 65% du P total du sol (shen et al, 2011), la forme organique des composés phosphatés est transformée en une forme utilisable par les BSP via un processus de minéralisation médié par les enzymes en particulier les phosphatases et les phytases (Khan et al, 2014).

3.2.1. Les phosphatases

Il existe deux types de phosphatases ; acide et alcaline, qui sont libérées à l'extérieur de la cellule. Les phosphatases acides sont de nature non spécifique et utilisent le P organique comme substrat pour le transformer en P inorganique, en déphosphorylant les liaisons phosphorester et/ou phosphoanhydride dans la matière organique (Khan et al, 2014 ; Dash et Dangar, 2017).

3.2.2. Les phytases

Ces enzymes libèrent le phosphore à partir de l'acide phytique.

3.2.3. Les C-P lyases

Les lyases séparent les liaisons C-P chez les organophosphonates entraînant la production de formes phosphatées solubles (Khan et al, 2014 ; Dash et Dangar, 2017).

4. Le phosphate roche (PR)

Le développement de la notion de l'agriculture durable et les préoccupations environnementales, emmène les efforts de la recherche à se concentrer sur l'élaboration de techniques agricoles impliquant l'utilisation de sources de nutriments végétaux moins coûteuse, comme l'application du PR (Vassilev et al, 2006), qui est l'une des matières premières de base nécessaires à la fabrication d'engrais phosphatés comme le superphosphate, le phosphate diammonique et les phosphates nitrés....etc.

Les PR sont répartis d'une manière inéquitable géographiquement. L'Afrique en contient environ 41%, les Etat Unis 21%, l'ancienne URSS 13%, le moyen orient 10%, l'Asie 8%, le

sud d'Amérique 3%, tandis que l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Océanie ne représentent ensemble que 2% et l'Europe entière moins de 1% (Kumari et Phogat, 2008).

En Algérie la production de phosphates naturels est considérée comme moyenne où elle occupe la 15^{ème} classe mondialement, et selon les nouvelles statistiques de l'USGS (2016) ; l'Algérie produit 1,2 million de tonne/an et ses réserves/ressources sont considérables atteignant 2,2 milliards de tonnes en 2015.

L'Algérie continue toujours ses efforts pour améliorer la production des phosphates naturels et rejoindre les premières classes pour les prochaines années. La composition du minerai de phosphate de Kef Essennoun (Djebel Onk- Tébessa en Algérie) est notée dans le tableau 3 en annexe II.

En conjugaison avec les BSP, la roche phosphatée procure une source moins chère de fertilisants phosphatés pour les cultures (Zaidi et al, 2006).

4.1. Mécanismes de solubilisation du PR

4.1.1. Excrétion des protons H⁺

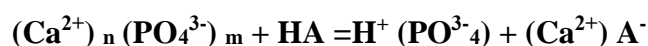
Les légumineuses qui fixent l'azote atmosphérique prélèvent plus de cations que d'anions contribuant à la libération de protons (Hinsinger et al, 2010), l'excrétion d'H⁺ par les microorganismes se produit en réponse à l'assimilation des cations, principalement liée à la source d'azote.

Selon Whitelaw et al (1999), qui ont utilisé des milieux de laboratoire et ont observé que le PR est plus solubilisé quand on utilise une source d'NH₄⁺ plutôt qu'une source de NO₃. Durant l'assimilation d'NH₄⁺, les racines des plantes libèrent des protons ce qui entraîne une diminution du pH (Arcand et Schneider, 2006).

4.1.2. Production des acides organiques

4.1.2.1. Par acidification

Les acides organiques contribuent à la diminution du pH de la solution du sol représentée par l'équation suivante (Arcand et Schneider, 2006) :



4.1.2.2. Par chélation

La chélation implique la formation de deux ou plusieurs liaisons de coordination entre une molécule anionique ou polaire et un cation, résultant en un complexe de structure en anneau (Arcand et Schneider, 2006). Les acides organiques portent des charges négatives, cette charge permet la complexation des cations métalliques en solution et le déplacement des anions de la matrice du sol induisant la capacité de former des complexes stables avec les cations tels que : Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{2+} . Le taux de dissolution des phosphates peut être considérablement accéléré, conduisant à des concentrations de P de 10 à 1000 fois plus élevée selon le type de sol, la spéciation et la concentration des acides organiques libérés (Kumari et Phogat, 2008 ; Khan et al, 2009).

4.1.2.3. Par réaction d'échange de ligands

Dans le sol, le citrate peut mobiliser le phosphate lorsqu'il est adsorbé à des teneurs supérieures à 10 moles/g de sol (Arcand et Schneider, 2006).

CHAPITRE III : RHIZOBACTERIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES

1. La rhizosphère

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste allemand Hiltner en 1904, et qui est dérivé du mot grec « rhiza » qui signifie racine et « sphère » qui veut dire champs d'influence (Cregut, 2009 ; Hinsinger, 2010 ; Prashar et al, 2013). Cependant, au fil du temps le mot rhizosphère a été redéfini plusieurs fois pour inclure le volume de sol situé autour des racines vivantes et interagissent avec elles (Hinsinger, 2010).

La rhizosphère a été largement subdivisée en trois zones :

- a. Endorhizosphère : qui consiste en tissu de la racine comprenant l'endoderme et les couches corticales.
- b. Rhizoplane : est la surface de la racine où les particules du sol et les microbes adhèrent. Il se compose d'épiderme, de cortex et de couches de polysaccharides mucilagineux.
- c. Ectorhizosphère : elle consiste en un sol immédiatement adjacent à la racine (Prashar et al, 2013).

La rhizosphère est une zone riche en nutriments en raison de l'accumulation d'une variété des exsudats végétaux, tel que les acides aminés, les acides organiques, les hydrates de carbone, les sucres, les vitamines, le mucilage et les protéines (Ahemad et Kibret, 2013 ; Lines-Kelly, 2005). Ces exsudats jouent le rôle de messenger qui stimule les interactions biologiques et physiques entre les racines et les micro-organismes du sol (Lines-Kelly, 2005), notamment les bactéries qui peuvent représenter jusqu'à 15% de la surface radriculaire totale (Goswami et al, 2016). Les genres de bactéries les plus communs qui ont été signalés dans la rhizosphère sont : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, rhizobia, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Flavobacter*, *Cellulomonas* et *Micrococcus* (Prashar et al, 2013).

2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP)

Ce sont des espèces de bactéries qui colonisent la rhizosphère et qui poussent sur ou autour les tissus végétaux exactement au niveau du rhizoplane, stimulant la croissance des plantes par une multiplicité de mécanismes (Fig 9) (Ahemad et Kibret, 2014 ; Beneduzi et al, 2012). Les RFCP se caractérisent par **(a)** leur compétence pour coloniser la surface de la racine **(b)** ils doivent survivre, se multiplier et rivaliser avec d'autres microbiota au moins pour le temps nécessaire pour exprimer leur croissance végétale ; activités de promotion / protection, et **(c)** ils doivent promouvoir la croissance des plantes (Tableau 2) (Kloepper, 1994).

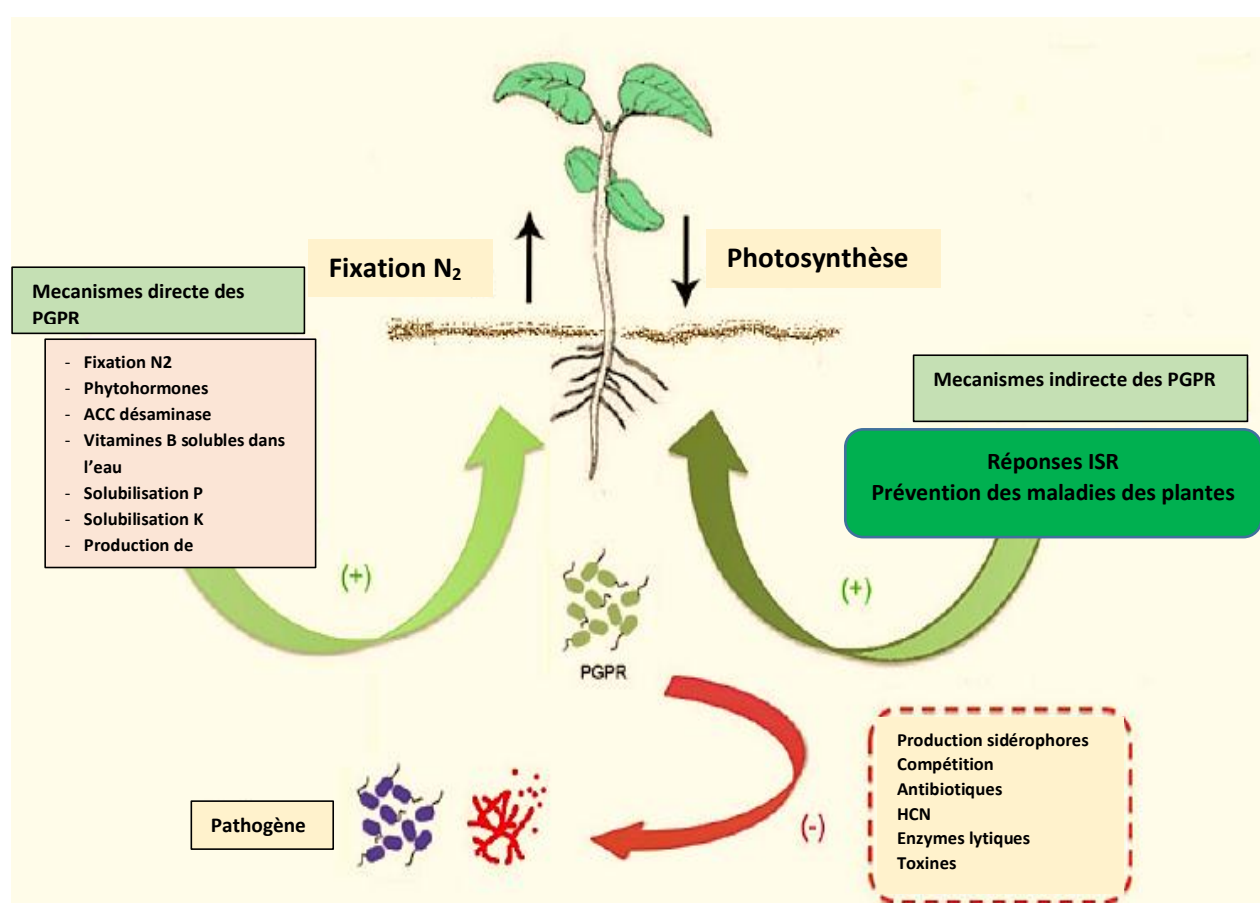


Fig 9. Mécanismes d'action des RFCP (Garcia-Fraile et al, 2015)

Les RFCP peuvent être classées en rhizobactéries favorisant la croissance des plantes extracellulaire (RFCPe) et en rhizobactéries favorisant la croissance des plantes intracellulaire (RFCPi). Les RFCPe peuvent exister dans la rhizosphère, sur le rhizoplane ou dans des espaces entre les cellules du cortex racinaire alors que les RFCPi se situent généralement à l'intérieur des structures nodulaires spécialisées des cellules racinaires (Gupta et al, 2015).

Tableau 2. Substances favorisant la croissance des plantes libérées par RFCP

RFCP	Les activités favorisant la croissance des plantes	Références
<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	HCN, sidérophore, IAA, solubilisation du phosphate	Deshwal et al. (2003)
<i>Rhizobium</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac	Wani et al. (2007a)
<i>Rhizobium</i> sp. (pea)	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides	Ahemad et Khan (2012a), Ahemad et Khan (2011a), Ahemad et Khan (2010a) et Ahemad et Khan (2009a)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Cytokinine	Noel et al. (1996)
<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	Solubilisation du phosphate	Abd-Alla (1994)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides	Ahemad et Khan (2012b), Ahemad et Khan (2010b,c) et Ahemad et Khan (2009b)
<i>Rhizobium</i> sp.(lentil)	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides	Ahemad et Khan (2011b,c) et Ahemad et Khan (2010d,e)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides	Ahemad et Khan (2012c) et Ahemad et Khan (2011d,e,f)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4EA <i>Bradyrhizobium</i> sp. 750, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum cytisi</i>	Sidérophores Mobilisation des métaux lourds	Naik et Dubey (2011) Dary et al. (2010)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	IAA	Zahir et al. (2010)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Activité nitrogénase, solubilisation du phosphate, IAA, ACC désaminase	Mehnaz et al. (2010)
<i>Rahnella aquatilis</i>	Solubilisation du phosphate, IAA, ACC désaminase	Mehnaz et al. (2010)
<i>Proteus vulgaris</i>	Sidérophores	Rani et al. (2009)

Suite tableau 2.

RFCP	Les activités FCP	Références
<i>Azospirillum amazonense</i>	IAA, activité nitrégénase	Rodrigues et al. (2008)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac	Wani et al. (2008)
<i>Burkholderia</i>	ACC désaminase, IAA, sidérophore, mobilization des métaux lourds, solubilisation du phosphate	Jiang et al. (2008)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac	Wani et al. (2007b)
<i>Mesorhizobium ciceri</i> , <i>Azotobacter</i> ,	IAA, sidérophores	Wani et al. (2007c)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Solubilisation Zn	Saravanan et al. (2007)
<i>Brevibacillus</i> spp.	Résistance Zn, IAA	Vivas et al. (2006)
<i>Bacillus</i> sp.	Solubilisation du phosphate	Canbolat et al. (2006)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	IAA	Shaharoon et al. (2006)
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum amazonense</i>	IAA, solubilisation du phosphate, activité nitrégénase, résistance aux antibiotiques	Thakuria et al. (2004)
<i>Mesorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp.	Sidérophore	Khan et al. (2002)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Gibbérelline, kinétine, IAA	Verma et al. (2001)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Solubilisation du phosphate	Kumar et al. (2001)
<i>Rhizobium meliloti</i>	Sidérophore	Arora et al. (2001)
<i>Kluyvera ascorbata</i>	ACC désaminase, sidérophores, résistance aux métaux	Genrich et al. (1998)
<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>	Sidérophore	Duhan et al. (1998)
<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>	IAA	Antoun et al. (1998)
<i>Rhizobium ciceri</i>	Sidérophore	Berraho et al. (1997)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Sidérophore	Wittenberg et al. (1996)

Suite tableau 2.

RFCP	Les activités FCP	Références
<i>Pseudomonas</i> sp. A3R3	IAA, sidérophores	Ma et al. (2011a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4EA	Sidérophores	Naik and Dubey (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Solubilisation du phosphate, IAA, sidérophore, HCN, potentiels de biocontrôle	Tank and Saraf (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	ACC désaminase, IAA, sidérophore	Poonguzhali et al. (2008)
<i>Serratia marcescens</i>	IAA, sidérophore, HCN	Selvakumar et al. (2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ACC désaminase, solubilisation du phosphate	Shaharoon et al. (2008)
<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	ACC désaminase, IAA, activité antifongique, fixation de N ₂ , solubilisation du phosphate	Indiragandhi et al. (2008)
<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	ACC désaminase, IAA, activité antifongique, fixation de N ₂ , solubilisation du phosphate	Indiragandhi et al. (2008)
<i>Enterobacter</i> sp.	ACC désaminase, IAA, sidérophore, solubilisation du phosphate	Kumar et al. (2008)
<i>Pseudomonas jessenii</i>	ACC désaminase, IAA, sidérophore, résistance aux métaux lourds, solubilisation du phosphate	Rajkumar and Freitas (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ACC déaminase, IAA, sidérophore, Solubilisation du phosphate	Ganesan (2008)
<i>Pseudomonas</i> sp.	ACC désaminase, IAA, sidérophore, mobilisation des métaux lourds, solubilisation du phosphate	Rajkumar and Freitas (2008)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	IAA, solubilisation du phosphate, activité nitrogénase	Jha and Kumar (2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Résistance systémique induite, activité antifongique	Saravanakumara et al. (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	IAA, sidérophore, solubilisation du phosphate	Rajkumar et al. (2006)
<i>Pseudomonas putida</i>	Activité antifongique, sidérophore, HCN, solubilisation du phosphate	Pandey et al. (2006)

Suite tableau 2.

RFPC	Les activités FCP	Références
<i>Pseudomonas putida</i>	Sidérophores, résistance aux Pb et Cd	Tripathi et al. (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PRS9, <i>Pseudomonas fluorescens</i> GRS1	IAA, sidérophores, solubilisation du phosphate	Gupta et al. (2005)
<i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Flavobacterium</i>	IAA et sidérophores	Belimov et al. (2005)
<i>Sphingomonas</i> sp, <i>Mycobacterium</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Rhodococcus</i> sp, <i>Cellulomonas</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp.	IAA	Tsavkelova et al. (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAA, sidérophores, activité antifongique	Dey et al. (2004)
<i>Klebsiella</i> sp.	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides, solubilisation du phosphate	Ahemad and Khan (2011g,h,i)
<i>Enterobacter asburiae</i>	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac, exo-polysaccharides, solubilisation du phosphate	Ahemad and Khan (2010f,g)
<i>Acinetobacter</i> spp.	IAA, solubilisation du phosphate, sidérophores	Rokhbakhsh-Zamin et al. (2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAA, solubilisation du phosphate	Jeon et al. (2003)
<i>Psychrobacter</i> sp.	Mobilisation des métaux lourds	Ma et al. (2011b)
<i>Bacillus</i> sp PSB10	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac	Wani and Khan (2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	IAA, sidérophores	Phi et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	Solubilization du phosphate, IAA et sidérophores	Wani et al. (2007c)

3. Les activités RFCP des BSP

3.1. La fixation symbiotique de l'azote

L'azote est un élément vital pour toutes les formes de vie, c'est le nutriment le plus important pour la croissance et la productivité des plantes (Kenneth, 2017).

Bien que l'azote représente 78% de l'atmosphère, il reste indisponible pour les plantes. Malheureusement aucune espèce végétale n'est capable de fixer le diazote atmosphérique, et le transformé en ammoniac et de le dépenser directement pour sa croissance (Gupta, 2015).

Il y'a plus de 150 ans que les chercheurs ont constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexplicée, le rôle des microorganismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Mellirigel et Wilfart en constatant que les légumineuses non nodulées étaient incapable d'incorporer l'azote moléculaire (Roger et al, 1996).

Les souches bactérienne possédant la capacité à fixer l'N sont classées en deux catégories : **(1)** Les bactéries symbiotiques qui possèdent la spécificité à infecter les racines des légumineuses produisant ainsi un nodule comme les rhizobia ; **(2)** Les fixateurs d'azote vivant en liberté et qui n'ont pas de spécificité aux plantes appelé les diazototrophes libres entre autres : *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbasprillum*, *Bacillus* et *Paenibacillus* (Goswami et al, 2016) (Fig 10).

Les bactéries fixent l'azote atmosphérique d'une manière symbiotique en différentes étapes ;

3.1.1. Pré-infection

Le mode de reconnaissance entre la plante et les bactéries fixatrices d'azote est un processus complexe, et la progression vers l'état symbiotique entre ces deux partenaires initialement indépendant et libres est régie par la génération et la perception réciproque du signal, qui a été décrit comme « dialogue moléculaire », ce qui conduit à une différenciation et à un ajustement progressif et coordonné de la physiologie et du métabolisme chez les deux partenaires. Cette relation symbiotique est initiée en attractant les bactéries par des acides aminés, des sucres et des acides carboxyliques mais aussi des concentrations micro et nano-molaires de flavonoïdes ou d'isoflavonoïdes dans les exsudats racinaires sécrétés par la plante (Grag, 2007 ; Tombozara, 2014). Les bactéries fixatrices d'azote répondent par chimiotactisme

positif à ces signaux émis par la plante et après une phase de multiplication active dans la rhizosphère ces bactéries se trouvent en contact avec la plante hôte (Doye, 1992 ; Tombozara, 2014).

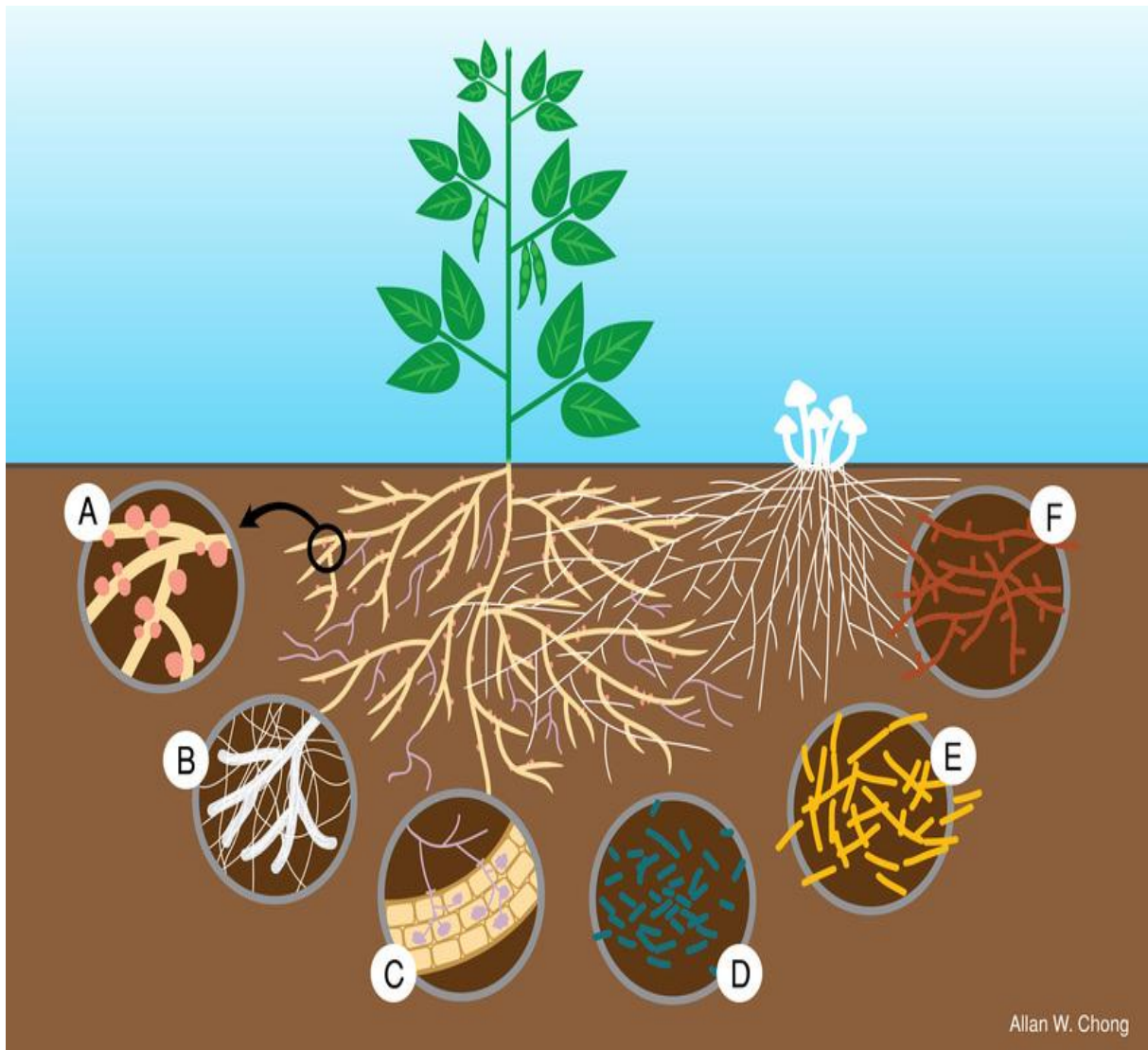


Fig 10. Interactions souterraines entre légumineuse-microorganismes ; **A**, Les nodules fixateurs d'azote sur les racines de la légumineuse. Des associations **B**, ectomycorhiziennes sont souvent établies avec des racines de légumineuses, mais les champignons restent externes. **C**, les champignons mycorhiziens arbusculaires interagissent avec les racines des légumineuses en utilisant la même voie symbiotique que celle utilisée par *Rhizobium*. **D**, bactéries à Gram négatif dans le sol, telles que *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *Ochrobactrum* spp. sont présent dans la rhizosphère et certaines espèces peuvent même noduler des légumineuses. **E**, les microorganismes à Gram positif, y compris *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinobacillus* et d'autres se trouvent dans la rhizosphère et également dans les nodules. **F**, les actinomycètes, par exemple *Micromonospora*, *Streptomyces* et *Frankia* qui sont des fixateurs d'azote et améliorent la croissance des plantes (Martinez-Hidalgo, 2017).

3.1.2. Infection

La perception des flavonoïdes attire les bactéries à la racine et active l'expression des gènes *nod*, menant à la production et à la sécrétion de lipo-chito-oligosaccharides spécifiques à la souche, également appelés facteurs nodaux qui sont responsables de l'initiation de la cascade d'événements de l'hôte qui conduit à l'organogénèse des nodules (Verma, 1992 ; Ferguson et al, 2010).

Cependant, chaque espèce de rhizobia contient à la fois des gènes *nod* communs tels que, *nodA*, *nodB* et *nodC*, ainsi que d'autres gènes *nod* spécifiques à l'espèce. Les gènes *nod* communs sont responsables de la synthèse et de la structure du squelette des facteurs Nod, tandis que les gènes *nod* spécifiques à l'espèce sont responsables de la modification de cette structure, en particulier la chaîne latérale de l'oligosaccharide. Ces modifications spécifiques à l'espèce sont nécessaires pour la divergence des structures de divers facteurs Nod, ce qui est indispensable dans l'interaction spécifique hôte-rhizobia. La sécrétion de ces facteurs Nod demande de l'énergie et l'implication de plusieurs gènes ; *nod I*, *nod J*, *nod T*, et le *nod* FGHI (Sugiyama et Yazaki, 2012).

L'infection réelle commence par une hydrolyse très localisée de la paroi cellulaire de la plante dans la boucle de *root hair*. Au site de l'hydrolyse, les bactéries pénètrent dans la cellule capillaire racinaire par invagination de la membrane plasmique. Autour de cette membrane invaginée, la plante forme un fil d'infection en forme de tube par dépôt d'un matériau ressemblant à une paroi cellulaire. Au fur et à mesure que le fil d'infection pénètre dans la racine des poils, les bactéries prolifèrent à l'intérieur du fil et sont entourées d'une matrice de mucopolysaccharides (Nap et Bisseling, 1990 ; Yoro et al, 2014).

Les fils d'infection transportent les bactéries des poils de la racine vers les primordia nodulaires formés dans les cellules corticales de la plante (Ferguson et al, 2010).

Tandis que les fils d'infection pénètrent dans les cellules racinaires et se déplacent vers l'intérieur, les cellules différenciées finalement dans le cortex racinaire sont réactivées et commencent à se diviser, formant ainsi le primordium nodulaire (Nap et Bisseling, 1990 ; Rival, 2013).

3.1.3. Fixation biologique de l'azote

Le processus de la fixation de l'azote nécessite l'utilisation d'un système enzymatique complexe connue sous le nom de nitrogénase (Gupta et al, 2015). Ce complexe enzymatique est contrôlé par l'interaction coordonnée de deux grandes classes de gènes ; les gènes *nif* et les gènes *fix* (Shamseldin, 2013).

La structure de la nitrogénase a été élucidée comme une métallo-enzyme à deux composants (1) dinitrogénase réductase qui est une protéine de fer et (2) dinitrogénase ; constitué d'un cofacteur métallique où la dinitrogénase réductase fournit des électrons avec un pouvoir réducteur élevé tandis que la dinitrogénase utilise ces électrons pour réduire l' N_2 en NH_3 (Kundan et al, 2015).

Les gènes de la nitrogénase (*nif*) qui codent pour la nitrogénase comprenant les gènes structuraux, les gènes impliqués dans l'activation de la protéine de fer, la biosynthèse du cofacteur de molybdène de fer, le don d'électrons et les gènes régulateurs nécessaires à la synthèse et la formation de l'enzyme (Glick, 2012). La nitrogénase est très sensible à l'oxygène alors que l'énergie requise pour la fixation de l'azote nécessite une activité respiratoire aérobie chez les bactéroïdes, ce paradoxe est régulé par la formation d'une molécule propre à la symbiose, la légghémoglobine qui en se liant à l'oxygène ; celle-ci en diminue considérablement la concentration d'oxygène dans le nodule mais cette concentration reste constante. Ce qui permettra d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d' O_2 indispensable à ces bactéries aérobies (Gobat et al, 2010). Aussi le nodule peut assurer un niveau très bas d' O_2 par d'autres mécanismes : les chaînes respiratoires, les enzymes de détoxification des formes toxiques de l' O_2 et la barrière physique corticale (cortex nodulaire) dont la conductance à la diffusion de l' O_2 est variable (Bargaz, 2012), ainsi la nitrogénase peut jouer son rôle de réduction d' N_2 en NH_3 .

La réduction de N_2 nécessite le transfert de 8 électrons et l'hydrolyse de 16 molécules d'ATP selon l'équation universelle suivante (Biswas et Gresshoff, 2014) :



3.2. La résistance des bactéries aux métaux lourds

3.2.1. Généralités

Les métaux lourds jouent un rôle important dans les processus de vie de microorganismes. Certains métaux servent de micronutriments et sont utilisés pour les procédés redox, stabiliser les molécules grâce à des interactions électrostatiques, tant que composants de diverses enzymes comme les protéinases, les déshydrogénases, et les peptidases et pour la régulation de la pression osmotique (Ahmad et al, 2012 ; Olaniran et al, 2013). Aussi ils jouent le rôle d'oligo-éléments dans des réactions biochimiques sophistiqués (Olaniran et al, 2013). Ils sont en plus des composants naturels dans le sol, dont certains métaux sont requis pour les plantes tant que micronutriments nécessaires pour la croissance normale à la fois végétal et animale (Bharti et al, 2014).

Parmi la large gamme de contaminants organiques et inorganiques (Bharti et al, 2014), les métaux lourds sont les principaux contaminants inorganiques accumulés dans l'environnement en raison de leur nature persistante et non biodégradable. Leur effet toxique sur l'environnement provoquera la contamination de la chaîne alimentaire. Cette nature rends les métaux les contaminants les plus dangereux pour l'activité, la structure et la composition microbienne des sols ainsi que les plantes cultivées (Saif et Khan, 2017 ; Handsa et al, 2014).

Selon l'OMS le Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Ni, Hg et le Zn sont les métaux les plus dangereux (Saif et Khan, 2017).

Bien que de nombreux métaux sont essentiels, mais tous les métaux sont toxiques à des concentrations plus élevées car ces ions de métaux lourds forment des composés complexes non spécifiques à l'intérieur de la cellule ce qui entraîne un stress oxydatif par formation de radicaux libres provoquant des effets toxiques et les rends trop dangereux pour toute fonction physiologique. Cette toxicité des métaux non essentiels se produit par le déplacement des métaux essentiels de leurs sites de liaison natifs ou par des interactions ligand (Olaniran et al, 2013 ; Bharti et al, 2014).

Dans le sol, lorsqu'un seul métal ou un mélange de métaux pénètre dans les tissus des plantes et est ensuite transporté dans divers organes végétaux, il peut interagir directement avec les composants cellulaires et perturber les activités métaboliques causant des lésions cellulaires et dans certains cas, la mort de la plante (Ahmad et al, 2012).

Les métaux lourds affectent même les communautés microbiennes du sol en réduisant leur biomasse totale, leur activité, ou modifier la structure de la communauté microbienne. Par conséquent à des concentrations élevées, soit les ions de métaux lourds inhibent complètement la population microbienne en inhibant ses diverses activités métaboliques, soit ces organismes peuvent développer une résistance ou une tolérance à de telle concentrations élevées (Tak et al, 2013).

La recherche a prouvé que de nombreuses rhizobactéries tolèrent et résistent aux métaux lourds (Fig 11) et jouent un rôle important dans la mobilisation et l'immobilisation des métaux lourds (Naees et al, 2011).

Ledin (2000), a expliquer la différence entre la tolérance microbienne et la résistance, il définit la tolérance comme la capacité à faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques des microorganismes, tandis que la résistance est la capacité des microorganismes à détoxifier les métaux lourds en tant activée en réponse directe aux concentrations élevées de métaux lourds.

Abou-Shanab (2005), ont testé les profils de tolérance des métaux lourds dans 107 isolats de rhizobactéries à des concentrations de 1mmol/l et ont trouvé que toutes les souches rhizobactérienne étaient tolérantes à de multiples ions métalliques. Donc, les résistances métalliques multiples dans les bactéries semblent la règle plutôt que l'exception.

Ces rhizobactéries peuvent exsuder des acides hydrocyanique, acide indolacétique (IAA), des sidérophores, solubilisent les phosphates et produire le 1-amino-cyclo-propane-1-carboxylase (ACC) qui augmentent la biodisponibilité et facilitent l'absorption des métaux lourds par les racines (Naees et al, 2011).

3.2.2. Mécanismes de résistance aux métaux lourds

Certaines rhizobactéries ont développé une gamme de mécanismes grâce auxquels elles peuvent mobiliser, immobiliser ou transformer les métaux lourds, les rendant ainsi inactifs (Tak et al, 2013).

Il existe six mécanismes possible de la résistance des bactéries aux métaux lourds : l'exclusion par la perméabilité de la membrane, séquestration intra et extra cellulaire, pompe d'efflux de transport actif, détoxification enzymatique et la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires (Olaniran et al, 2013).

3.2.2.1. Perméabilité membranaire

Les bactéries limitent l'entrée des métaux en modifiant la production des porines et maintiennent l'ion toxique hors de cellule (réduction de l'absorption).

3.2.2.2. Séquestration intra et extracellulaire

La Séquestration intracellulaire repose sur la production de protéines qui chélatent l'excès d'ions métalliques d'une part, et stocker ces ions dans la cellule d'autre part, ce qui permet à la cellule de protéger ses composants essentiels de leurs toxicité potentielle (Desaunay, 2011 ; Trepureau, 2011).

Tandis que, la séquestration intracellulaire consiste à chélater certains métaux, en les empêchant de pénétrer à l'intérieur dans le cytoplasme (Trepureau, 2011).

3.2.2.3. Transport actif

Il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extra cellulaire (Fereet, 2012). Ces pompes d'efflux peuvent être des ATPases ou des canaux chimiosmotiques (Habi, 2009).

3.2.3. Production de sidérophores

Les sidérophores jouent un rôle important dans la mobilisation et l'accumulation des métaux lourds (Tak et al, 2013), et sont donc des agents chélatant les métaux. Ils ont pour effet de piéger le Fe^{3+} et d'augmenter significativement la biodisponibilité lié au sol (Naees et al, 2011).

Les sidérophores peuvent former des complexes stables avec d'autres métaux préoccupant pour l'environnement tel que : l'Al, Cd, Cu, Cr, Pb, Zn (Pèrez-Montàno et al, 2014).

Braud et al (2009), ont montré que la présence de métaux lourds induits une production de sidérophores bactériens, car les plantes cultivées dans des sols contaminés par les métaux sont souvent carencées en fer et les bactéries peuvent aider les plantes à obtenir suffisamment de fer.

3.2.4. Production de l'acide indolacétique (IAA)

L'acide indolacétique induit la croissance des plantes et est responsable de l'absorption des métaux ainsi que l'activation de la défense des plantes contre le stress des métaux lourds (Fig 6) (Shinwari et al, 2015). Aussi, il augmente la surface et la longueur des racines, et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol. En outre l'IAA libère les parois cellulaires végétales et par conséquent facilite l'exsudation des racines qui fournit des nutriments supplémentaires pour soutenir la croissance des bactéries de la rhizosphère (Ahemad et Kibrat, 2013).

3.2.5. Production d'ACC

L'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, synthétisées par un large éventail de bactéries rhizosphériques, cet enzyme améliore la croissance des plantes dans des conditions environnementales défavorables telles que : les inondations, les métaux lourds (Fig 6), les phytopathogènes, sécheresse et haute teneur en sel. Bien que l'éthylène soit essentiel à la croissance des plantes, il peut être nocif à de fortes concentrations, car il induit une défoliation et d'autres processus cellulaires qui peuvent réduire les performances des cultures voire même la mort des plantes dans des conditions stressantes. Les PGPR contenant l'ACC désaminase peuvent détourner l'ACC de la voie de biosynthèse de l'éthylène et hydrolyse l'ACC en F-cétobutarate et en ammoniac et favorise ainsi la croissance des plantes (Rai et Nabti, 2017 ; Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Sahran et Nehra, 2011).

Selon une étude réalisée par Jing et al (2007) le Cd dans le sol induit la synthèse d'éthylène par les plantes et contribue probablement à l'accumulation de l'ACC dans les racines, l'ACC désaminase réduit la production d'éthylène dans les conditions de stress au Cd. Il existe un certain nombre d'études qui ont mentionné les microorganismes rhizosphériques productrices d'ACC désaminase telles que : *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sinorhizobium*, *Kluyvera*, *Varovorax* et *Paradoxus* (Ghosh et al, 2003 ; Saleem et al 2007 ; Govindasamy et al, 2008 ; Duan et al, 2009, Hao et al, 2010 ; Toklikishvili et al, 2010 ; Barnawal et al, 2012 ; Glick, 2014).

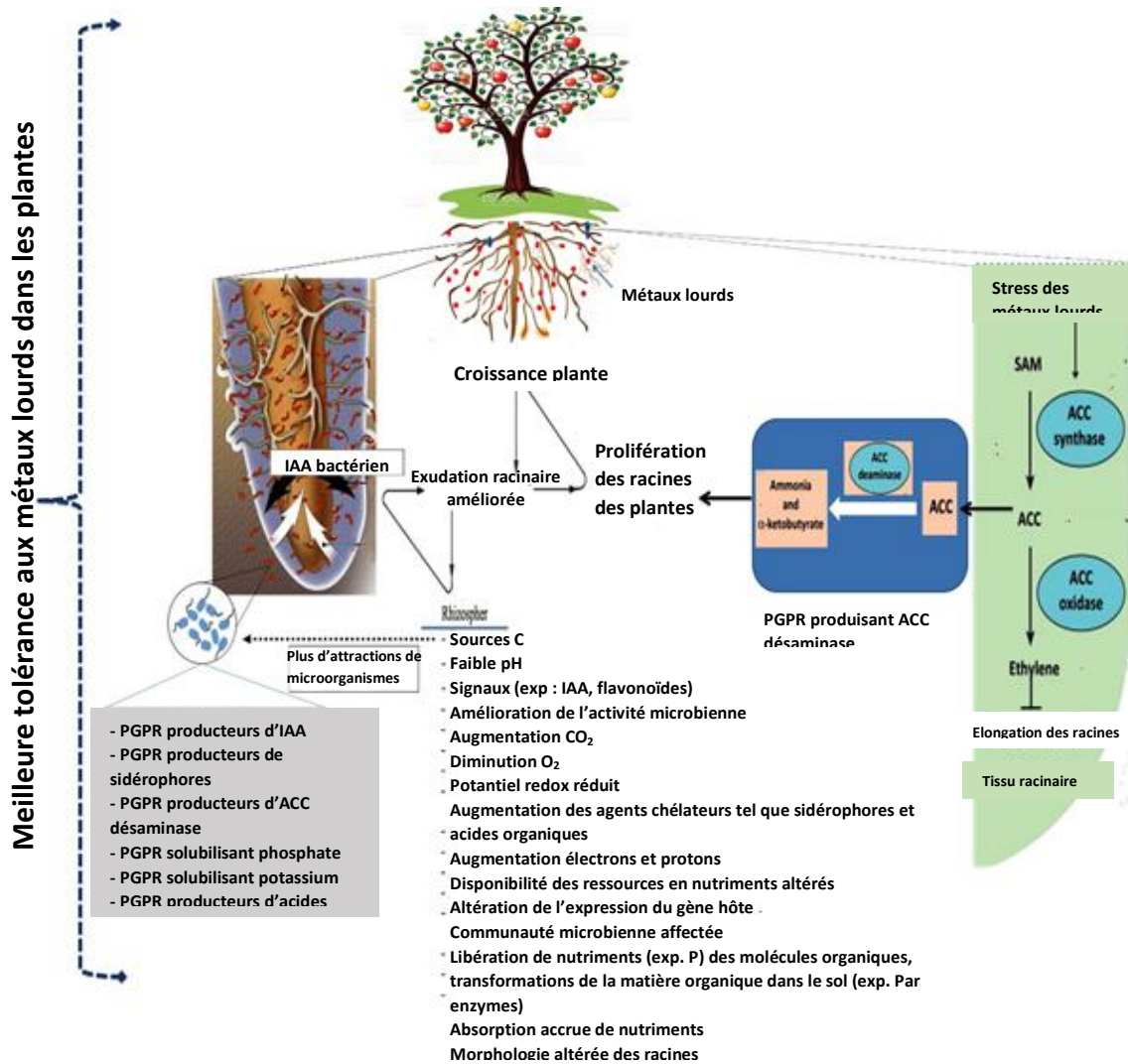


Fig 11. Mécanismes de tolérances des plantes aux métaux lourds

3.3. Les biofertilisants

Les biofertilisants jouent un rôle crucial dans l'agriculture biologique et sont un acteur majeur de l'économie et de la production agricole générale à l'échelle mondiale (Vejan et al, 2016). Ce sont des substances préparées à partir de microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont appliqués sur les graines ou sur les surfaces végétales adjacentes au sol, peuvent coloniser la rhizosphère ou les parties intérieures des plantes et favoriser la disponibilité des éléments nutritifs et la croissance des plantes (Battacharyya et Jha, 2012).

Malusá et Vassilev (2014), ont défini le biofertilisant comme produit formulé contenant un ou plusieurs microorganismes qui améliorent l'état nutritionnel des plantes soit pour remplacer les nutriments du sol et/ou augmenter l'accès des plantes aux nutriments.

Les RFCP peuvent être classées comme biofertilisants lorsqu'ils agissent comme source d'alimentation et d'enrichissement des plantes qui reconstituent le cycle des nutriments entre le sol, les racines des plantes et les microorganismes présents (Vejan et al, 2016).

Parmi les RFCP connu pour leur puissante capacité à agir comme biofertilisant : *Allospirillum*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium* (Battacharyya et Jha, 2012).

Les RFCP-biofertilisants ont la capacité à solubiliser les phosphates, augmenter l'efficacité de la fixation biologique de l'N, améliorer la disponibilité du Ca, K, Fe, Cu, Mn et de Zn et favoriser la croissance des racines et des pousses (Agrawal et al, 2014 ; Pérez-Montaño et al, 2014)

PARTIE II :
MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I : PIEGEAGE DES RHIZOBACTERIES SUR SUBSTRAT SOL-MINERAI DE FER

1. But du piégeage

Le but est de piéger des microorganismes rhizosphériques capables de solubiliser les phosphates inorganiques, fixer l'azote atmosphérique et résister aux métaux lourds et à la salinité. Ces microorganismes peuvent favoriser la croissance des plantes (MFCP) et améliorer la qualité des sols.

Le substrat utilisé est composé du sol prélevé de la commune de Sidi-Amar (Daira d'El-Hadjar, Wilaya d'Annaba) au Nord-Est de l'Algérie, auquel nous avons rajouté du minerai de fer.

La commune de Sidi Amar est très proche du Complexe Sidérurgique « Sider El-Hadjar » qui est l'une des principales origines de la pollution du sol et de l'environnement de la région d'Annaba. Nous supposons que ce sol et l'air sont contaminés par les poussières chargées en métaux, provenant du complexe sidérurgique (annexe II).

2. Protocole de piégeage des rhizobia

Nous avons préparé 20 pots contenant environ 1kg de sol, auquel nous avons rajouté 200g de minerai de fer (fourni par le complexe sidérurgique dont la composition est notée dans le tableau 4 en annexe II).

Les graines de *Lathyrus* ont été recueillies préalablement de la légumineuse *Lathyrus ochrus* qui pousse dans les environs de la commune de Sidi Amar. Dans chaque pot, nous avons semé deux graines de *Lathyrus ochrus*.

Les pots sont placés dans un endroit frais exposé au soleil et l'arrosage se fait quotidiennement en utilisant l'eau de robinet.

Après deux mois de croissance des plants, les racines avec les nodules ont été déterrées et rincées avec l'eau de robinet et sécher à l'air libre, puis elles étaient conservées dans des enveloppes en papier pour bien les protéger.

CHAPITRE II : ISOLEMENT ET PURIFICATION DES RHIZOBACTERIES PIEGEES

1. Isolement sélectif des rhizobia à partir des nodules de *Lathyrus ochrus*

1.1. Milieux de culture pour isolement

Nous avons utilisé trois milieux de culture ;

➔ Le milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (vincent, 1970) additionné des deux minerais fer (Fig 12) et phosphate (Fig 13) (YMFP) (annexe I).

➔ Le milieu Gélose à l'acétamide (GA) (Hedberg, 1969) ; utilisé pour isoler des bactéries du genre *Pseudomonas* ; qui sont souvent des endophytes connus pour leur grande capacité à solubiliser les phosphates inorganiques (annexe I).

➔ Le milieu (*Bosea* Culture Medium 115) BCM115 ; utilisé pour isoler les bactéries du genre *Bosea*, isolée récemment de la légumineuse *Lathyrus latifolius* (annexe I) (De Meyer et Willems, 2012).

Les trois milieux ont été préparés et autoclavés à 120°C pendant 30min, après refroidissement les milieux ont été coulés dans des boites de Pétri stériles.

1.2. Préparation des nodules

Les nodules détachés des racines de la légumineuse *Lathyrus ochrus*, sont désinfectés en utilisant une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 4min dans des tubes stériles puis rincés 5 à 6 fois avec de l'eau distillée stérile. Après rinçage ; chaque nodule est écrasé dans un tube à essai stérile avec une très petite quantité d'eau distillée stérile, à l'aide d'une tige stérile.

Les suspensions obtenues servent à l'ensemencement des boites de Pétri contenant les trois milieux d'isolement ; les boites sont ensuite incubées à 28°C.

1.3. Croissance et purification des rhizobia piégés

Nous avons observé les premières colonies après une à deux semaines de croissance et une série de purification est faite sur les mêmes milieux d'isolement. Chaque isolat est repiqué sur deux tubes inclinés et après croissance les isolats sont conservés au réfrigérateur à 6°C.

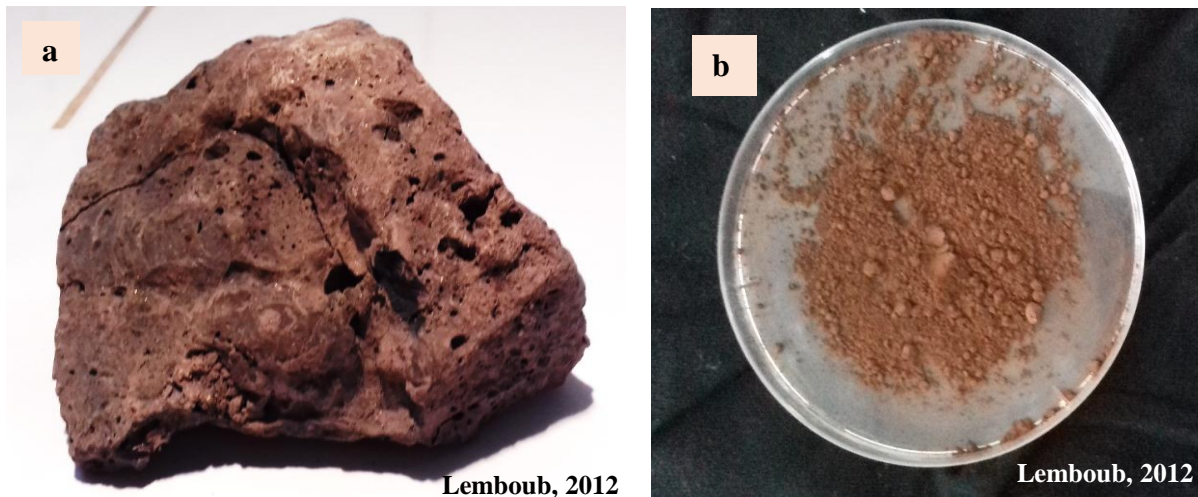


Fig 12. Minerai de fer ; **a.** Roche du minerai de fer utilisé pour le piégeage et **b.** Minerai de fer enrichi utilisé pour l'isolement

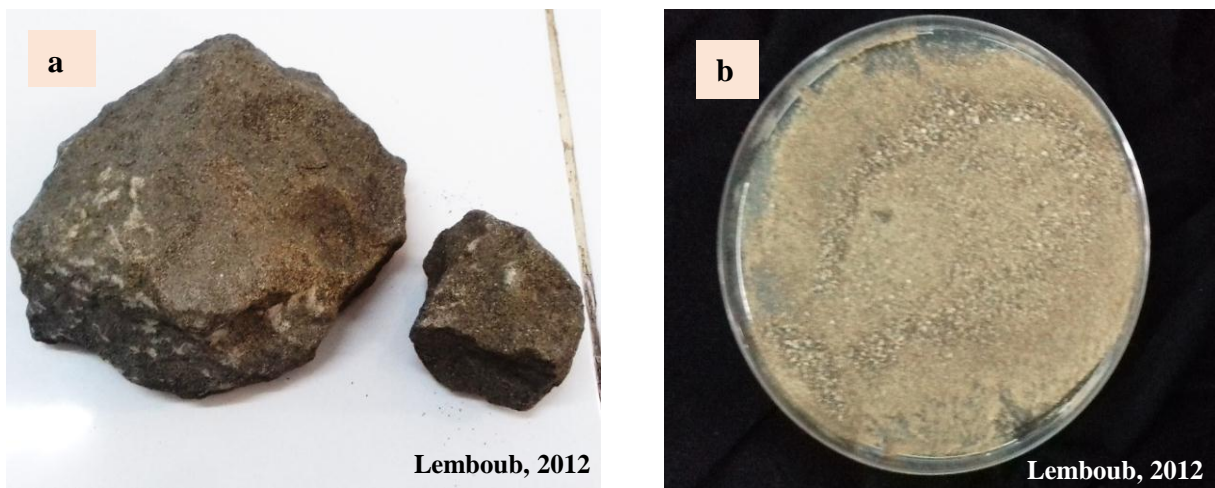


Fig 13. Minerai de phosphate ; **a.** Phosphate roche et **b.** Phosphate roche broyé utilisé pour l'isolement et les tests de solubilisation

CHAPITRE III : CARACTERISATION CULTURALE ET MORPHOLOGIQUE DES ISOLATS

1. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats

1.1. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de rouge Congo (RC)

Des suspensions provenant de cultures jeunes des isolats solubilisateur de PR sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA additionné de 0.0025% (P/V) de RC, et ce pour vérifier l'absorption ou non du RC par les isolats.

Les rhizobia (qui appartiennent à la classe des α -Protéobactéries) n'absorbent pas ou peu le RC (Somasegaran et Hoben, 1985). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours.

1.2. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de bleu de Bromothymol (BBT)

Le milieu YEMA est utilisé à pH 6,9 additionné de 0,0025% (P/V) de BBT. Des suspensions jeunes ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA additionné de BBT. Ce test permet de mettre en évidence la capacité des isolats à acidifier ou alcaliniser le milieu. L'acidification se traduit par un virage de la couleur du milieu au jaune et l'alcalinisation se traduit par un changement de la couleur du milieu en bleu foncé.

Les isolats qui acidifient le milieu sont à croissance rapide alors que les isolats qui alcalinisent le milieu sont à croissance lente (Somasegaran et Hoben, 1985). Les boîtes sont incubées à 28°C et la lecture se fait après 3-7 jours.

1.3. Croissance des isolats sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)

Des suspensions jeunes des isolats solubilisateur de PR sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu GPA. Le GPA est un milieu nutritif riche qui favorise la croissance de plusieurs genres de bactéries, mais les rhizobia ne poussent pas ou poussent faiblement sur ce milieu.

1.4. Croissance des isolats sur milieu YMFP et sur milieu YEMA classique

Nous avons préparé des cultures jeunes à partir des isolats que nous avons repiqué sur les deux milieux YMFP et YEMA et ce pour comparer la croissance sur les deux milieux testés.

1.5. Test au cétolactose

Ce test permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium*, en recherchant la présence ou l'absence de l'enzyme « 3-cétolactase » qui existe chez les *Agrobacterium* et qui est absente chez les rhizobia.

Le principe de ce test est basé sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides et la recherche de l'enzyme 3-cétolactase sur milieu lactosé (Bernaerts et De Ley, 1963).

Tous les isolats sontensemencés sur des tubes inclinés contenant le milieu Gélose Nutritive Agar (GNA) (annexe I) et incubés pendant 3jours à 28°C. Après trois jours ; des suspensions ont été préparées à partir des colonies cultivées sur GNA. A l'aide d'une micropipette nous avons prélevé 10µl de chaque suspension qui sont ensuite déposées sur des boites de Pétri de trois compartiments pour tester trois souches, sur le milieu Gélose au Lactose (GL) (annexe I). Les boites sont incubées à 28°C pendant 48 à 72 h.

Après incubation, nous avons appliqué une fine couche de réactif de Benedict sur chaque culture. Après 15 à 20 min, la formation d'un anneau jaune d'oxyde cuivreux autour de la colonie indique la présence de 3-cétolactose dans le milieu.

1.6. Coloration de Gram

La coloration de Gram est réalisée pour différencier les bactéries à Gram positif (cellules colorées en violet) et les bactéries à Gram négatif (cellules colorées en rose). Ce test nous permet également de déterminer la forme de cellules et la pureté de chaque isolat.

1.7. Tests de la catalase et de l'oxydase

La catalase est une enzyme présente chez les bactéries aérobies strictes et aéro/anaérobies facultatives. Nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre, sur laquelle nous avons ajouté une colonie de chaque isolat, le dégagement de l'O₂ indique la présence de la catalase, selon l'équation suivante :



-CHAPITRE III-

En ce qui concerne le test de l'oxydase ; qui permet de mettre en évidence une enzyme phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthyl paraphénylène diamine en produisant un produit coloré en violet. Nous avons mis un disque d'oxydase dans les suspensions rhizobiennes, l'apparition d'une couleur violette des disques indique la présence d'oxydase.

CHAPITRE IV : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ISOLATS

1. Identification phénotypique par les galeries Api 20E

Pour l'identification biochimique des isolats, nous avons utilisé la galerie biochimique Api 20E. Tous les isolats sont repiqués d'abord sur le milieu Tryptone Yeast Agar (TYA) (annexe I) pour limiter la production des polysaccharides.

Après la croissance des isolats sur ce milieu nous avons prélevé une ou deux colonies de chaque boîte de Pétri et on la dépose dans 5ml d'eau physiologique stérile et on agite jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

Nous prenons à l'aide d'une micropipette un volume de la suspension et on remplit tous les puits de la galerie, et on les incube dans une étuve à 28°C pendant 24, 48 et 72 heures et jusqu'à 7 jours pour les isolats qui n'ont pas montré trois tests positifs au bout de 72 heures et l'observation est faite tous les 24 heures.

Les souches *Agrobacterium tumefaciens* (C58), *Burkholderia spp.* et *Escherichia coli*, ont été utilisées comme souches de références.

2. Identification phénotypique par les galeries Api 20NE

Api 20NE (BioMérieux, France) sont des systèmes standardisés, combinant 20 tests utilisés pour l'identification des bâtonnets Gram négatif. L'inoculation a été pratiquée tel que recommandé par le fabricant. Après inoculation, les galeries ont été incubées à 28°C ; les résultats ont été notés tous les jours pendant 7 jours.

CHAPITRE V : SOLUBILISATION DES PHOSPHATES INORGANIQUES PAR LES ISOLATS PIÈGES

1. Tests de solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide

La solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide est un test qualitatif utilisé pour sélectionner les bactéries qui ont la capacité à solubiliser les phosphates (Fig 14) comme par exemple : *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Cupriavidus*etc.

1.1. Test de solubilisation du phosphate tricalcique sur différents milieux solides

Nous avons utilisé plusieurs milieux de différentes compositions, en utilisant comme seule source de phosphate le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PTC) et ce pour déterminer le milieu solide qui donne les résultats les plus fiables.

Pour cette raison nous avons préparé le milieu YEMA (Vincent, 1970) (annexe I), le milieu PVK (Pikovskaya, 1948) (annexe I), le milieu Sperber (Sperber, 1958) (annexe I) et enfin les deux milieux MNBRI et NBRIP (National Botanical Research Institute) (Nautiyal, 1999) (annexe I).

Nous avons préparé des boîtes de Pétri contenant les 5 milieux de culture, chaque boîte est divisée en 6 cadrans afin de pouvoir tester 6 souches dans chaque boîte.

Des suspensions bactériennes sont préparées à partir de cultures jeunes développées sur le milieu YMFP, sont utilisées pour repiquer les boîtes de Pétri contenant les 5 milieux de culture.

A l'aide d'une micropipette munie de cônes stériles, on dépose 7 μl de chaque suspension dans un cadran. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 15 jours.

L'observation est faite tous les trois jours, le halo (zone de solubilisation des phosphates) et le diamètre des colonies sont mesurés après 15 jours d'incubation et la taille de l'halo est calculée en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

1.2. Solubilisation du Phosphate tricalcique, Phosphate monocalcique et Phosphate roche (PR)

Les rhizobactéries piégées et isolées sont testées sur le milieu NBRIP additionné de 5g/l de : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PTC), CaHPO_4 (PMC) et le PR respectivement comme seule source de phosphate.

Le but est de montrer la capacité de nos isolats à solubiliser les différentes formes de phosphate inorganique. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat.

1.3. Effets de la variation de la concentration en extrait de levure, de glucose et en MgCl_2

L'étude de l'influence de la variation de la concentration en extrait de levure, glucose et en MgCl_2 sur la solubilisation des phosphates inorganiques a été réalisée sur deux milieux de cultures MNBRI et NBRIP, en utilisant le PMC comme seule source de phosphate (Tableau 3).

Tableau 3. Variation de la concentration de certains ingrédients des milieux MNBRI et NBRIP

Ingrédients (g/L)	Milieux		
	MNBRI	NBRIP (1)	NBRIP (2)
Glucose	20	10	10
MgCl_2	10	5	5
Extrait de levure	0.1	0.1	-

Le tableau ci-dessus montre la variation de la concentration de ces trois ingrédients pour chaque milieu. Trois répétitions sont effectuées pour chaque isolat.

2. Tests de solubilisation du phosphate roche (PR) sur milieu liquide

Le but est de déterminer les concentrations de phosphates solubilisés (Fig 15) par les 26 isolats sélectionnés sur milieu solide.

Dans des erlenmeyers stériles de 150ml, contenant chacun 50ml du milieu NBRIP liquide sans extrait de levure ou le milieu MNBRI, ces erlenmeyers sont inoculés avec des suspensions de 2ml provenant de cultures jeunes avec une DO de ($\approx 8.10^8$ UFC/ml).

Solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide

1

Une seule source de phosphate est le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

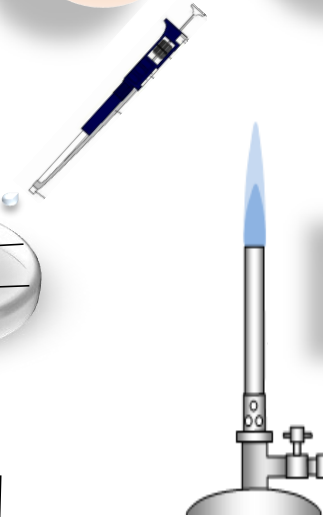
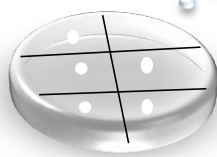
PVK

YEMA

SP

NBRIP

MNBRI



7 μL des suspensions d'isolats

2

Comparaison entre la composition des deux milieux

NBRIP

MNBRI

En utilisant comme seule source de phosphate le CaHPO_4

3

Utilisation de plusieurs sources de phosphate

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

CaHPO_4

Phosphate
roche

Fig 14. Protocole expérimental de solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide

Le PR est stérilisé séparément avant d'être ajouté en raison de 0.3g pour chaque erlenmeyer, et il a été utilisé comme seule source de phosphate. Les erlenmeyers non inoculés ont servi comme des contrôles (blanc).

Les erlenmeyers sont fermés à l'aide de coton stérile et ils sont ensuite placés dans un incubateur agitateur à 150tr/min à 28°C pendant une semaine.

Le premier jour, on prélève 1ml de chaque erlenmeyer juste après l'inoculation et nous allons le considérer comme t_0 . Ensuite chaque jour on fait deux prélèvements à un intervalle de 18h pour le deuxième prélèvement et de 6h pour le troisième et ainsi de suite jusqu'à une semaine. Chaque prélèvement est réalisé en utilisant une micropipette avec des cônes stériles ; et déposer dans des tubes avec le nom de chaque isolat et le temps correspondant.

Ces tubes sont ensuite centrifugés à 6000rpm pendant 20min, le surnageant est ainsi récupéré et conservé dans des tubes eppendorfs stériles de 1.5ml. Le test est répété trois fois pour chaque isolat.

2.1. Suivi de l'évolution des valeurs de pH durant la solubilisation

Après une semaine d'incubation, les erlenmeyers sont retirés de l'agitateur, et on mesure le pH de chaque culture à l'aide d'un pH-mètre.

2.2. Dosage des phosphates

La détermination du phosphate soluble s'effectue en deux étapes ; la première consiste en une hydrolyse acide des phosphates présents dans l'échantillon et dans la seconde étape, l'ion orthophosphate réagit avec l'ion molybdate pour former un complexe phosphomolybdate. Ce dernier est réduit avec l'acide ascorbique en milieu acide pour provoquer l'apparition du bleu de molybdène, dont l'absorbance à 820nm est proportionnelle à la concentration de l'ion orthophosphate présent dans l'échantillon.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Chen et al (1956), cette technique (Fig 16) nécessite de préparer trois solutions stocks :

- Solution d'acide ascorbique (vitamine C) à 10% (à préparer juste avant l'emploi ou se conserve maximum une semaine à l'obscurité à 4°C).
- Solution de molybdate d'ammonium à 2.5% $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$ (solution stable).

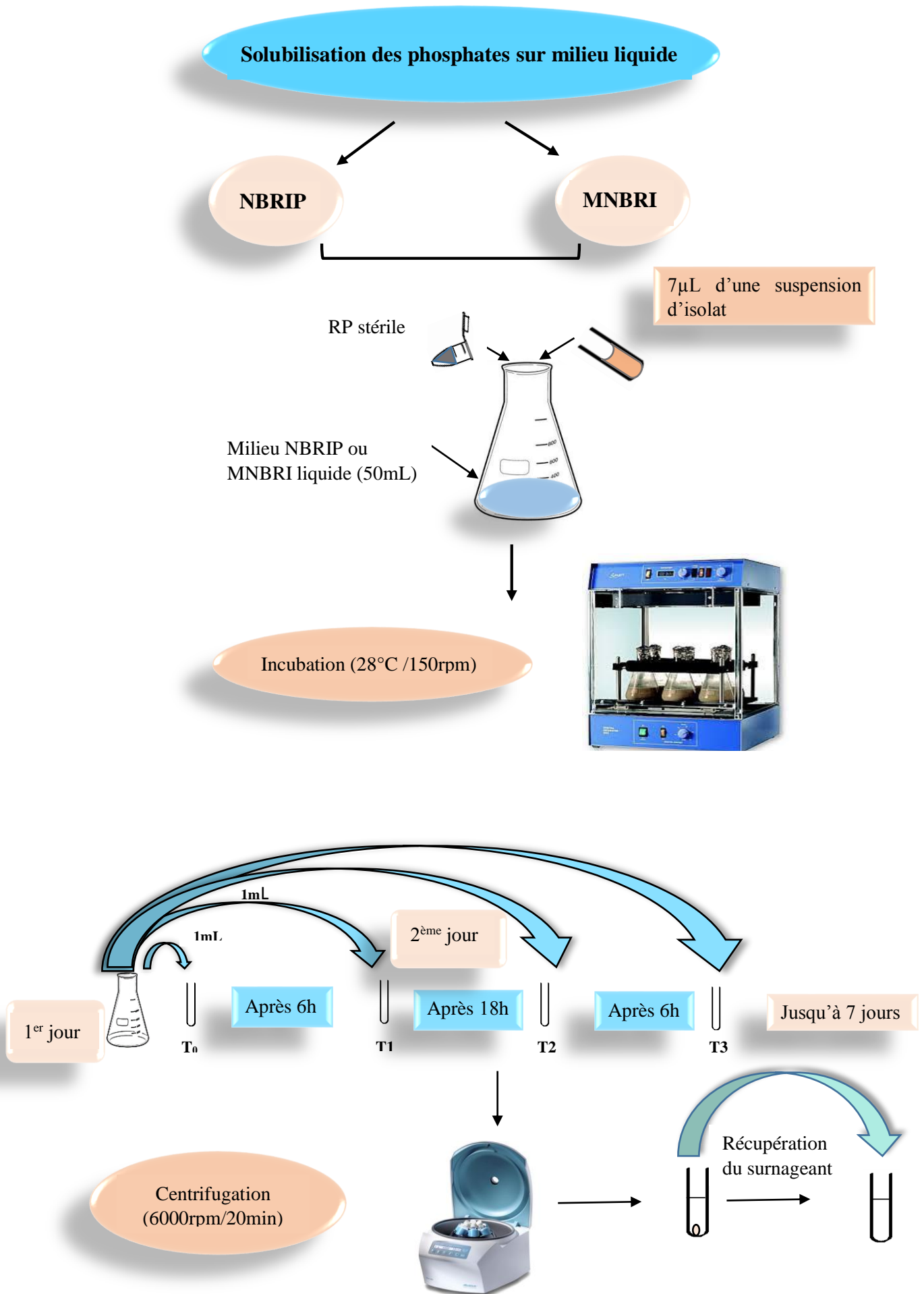


Fig 15. Protocole expérimental du test de la solubilisation des phosphates sur milieu liquide

- Solution de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 6N (solution stable).

Une fois les solutions stocks sont préparées, nous mélangeons dans un flacon propre un volume de la solution d'ammonium plus un volume de la solution d'acide sulfurique plus un volume de la solution d'acide ascorbique plus deux volumes d'eau distillée ; ce réactif se prépare juste avant l'emploi.

Dans un tube sec propre, nous mettons 1ml d'échantillon à analyser (ou du blanc, ou du standard) et on ajoute 1ml du réactif, bien mélanger l'ensemble à l'aide d'un vortex et on incube les tubes secs dans une étuve à 45°C pendant 30min.

Ensuite on remplit la cuve du spectrophotomètre de ce mélange et on mesure l'absorbance à 820nm.

Il faut toujours effectuer le dosage sur un échantillon totalement dépourvu de phosphate le "blanc", et sur un standard dont la concentration en phosphates est connue pour tracer ainsi la courbe d'étalonnage.

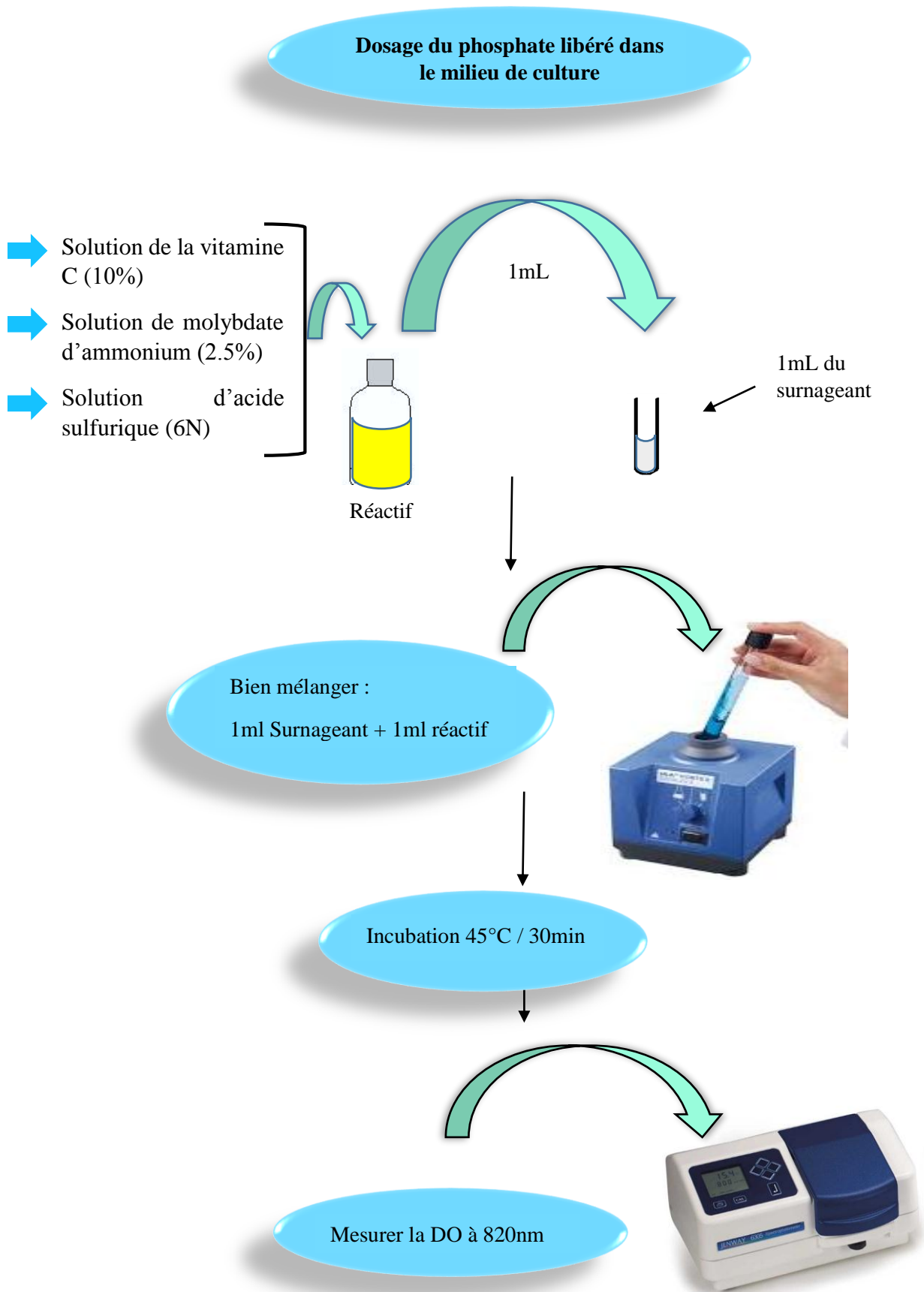


Fig 16. Protocole expérimental du dosage des phosphates libérés dans le milieu de culture

CHAPITRE VI : ESSAIS DE NODULATION DE LA PLANTE HOTE

Pour tester la capacité de chaque isolat à noduler sa propre plante hôte, nous avons réalisé le test de nodulation.

1. Germination des graines

En raison de la difficulté de la germination des graines de *Lathyrus ochrus* sauvage, nous avons essayé la méthode décrite par Brunet et al (2008), les graines sont immergées pendant quatre jours dans de l'eau distillée à 4°C à l'obscurité avant d'être désinfectées pendant 15 min dans de l'éthanol à 70 % puis pendant 1 heure dans de l'hypochlorite de sodium à 2 % puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Elles ont été scarifiées avant d'être immergées pendant 12 h dans de l'eau distillée stérile.

La germination se fait sur le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) (annexe I), les boîtes sont ensuite emballées dans du papier aluminium pour assurer l'obscurité, et sont ainsi déposées sur la paille ou dans un endroit frais à peu près 18°C pendant 3 à 8 jours (Fig 17).

2. Préparation des pots

Le sable est utilisé comme substrat, le sable est rincé plusieurs fois sous l'eau de robinet, et après séchage nous l'avons stérilisé plusieurs fois au four Pasteur à une température de 200°C.

Les pots en plastiques sont ensuite décontaminées par l'alcool et enroulé dans du papier aluminium et à l'extérieur on note le nom de chaque isolat et la date de la première inoculation. On perce trois trous dans le fond de chaque pot pour l'aération et pour ne pas avoir de l'eau qui stagne au fond des pots.

Les pots sont remplis avec du sable stérile et nous avons semé deux graines de *L. ochrus* germées dans chaque pot. Les pots sont déposés à l'extérieur c'est-à-dire dans des conditions naturelles.

Germination des graines de *Lathyrus ochrus*

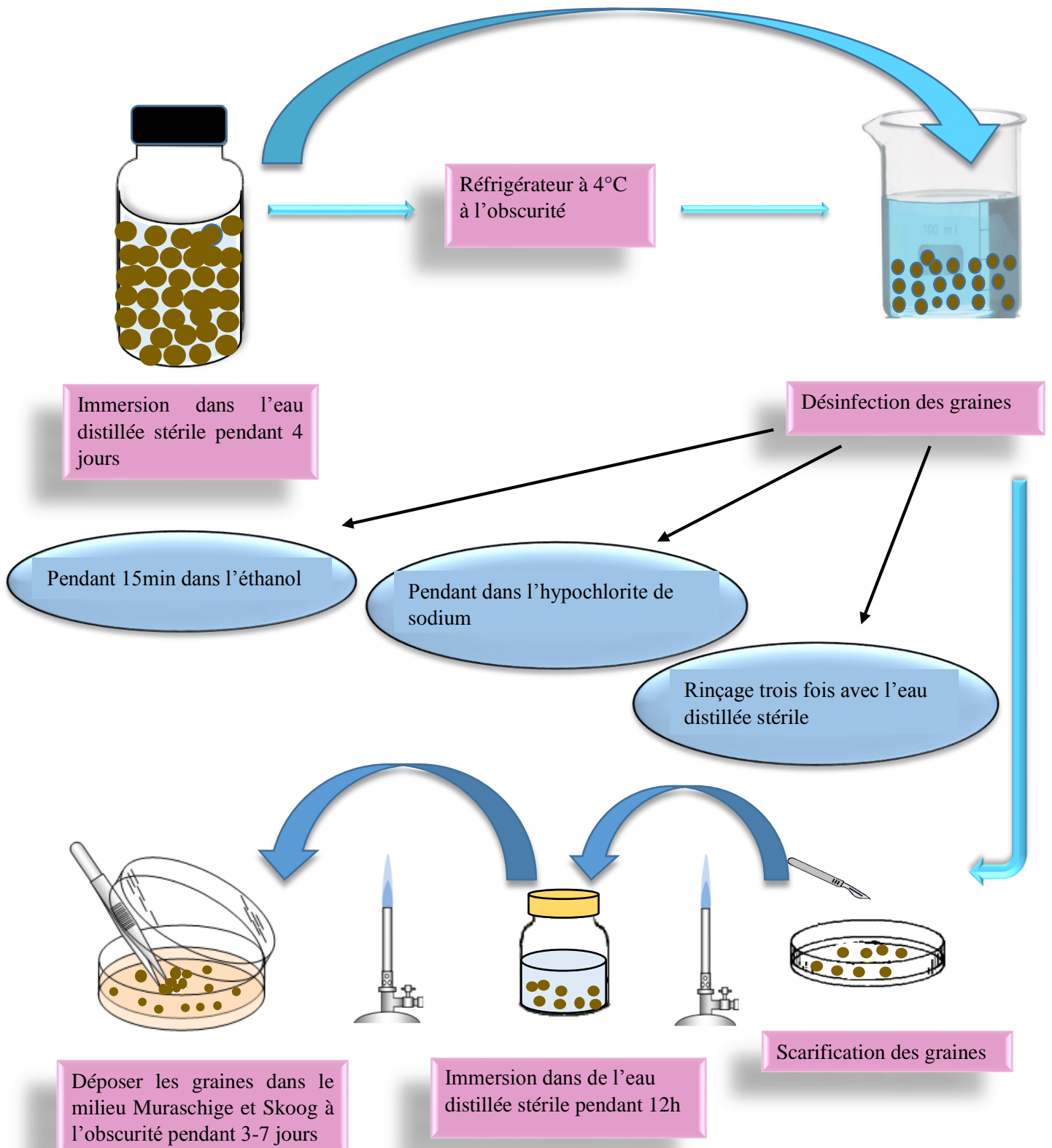


Fig 17. Protocole expérimental de la germination des graines de *Lathyrus*

3. Solution d'arrosage

La solution de Rigaud et Puppo (1975) est utilisée pour l'arrosage des plants de *Lathyrus ochrus*, deux à trois fois par semaine selon les besoins des plants.

4. Inoculation des plants de *Lathyrus ochrus* et vérification de la nodulation

Après l'apparition de la plantule de *L. ochrus*, on prépare nos suspensions avec nos isolats à partir des cultures jeunes et nous avons inoculé les pots ; après une semaine l'opération est répétée une seconde fois. Et après au moins 6 semaines de la première inoculation les plants sont récoltés et les nodules sont vérifiés (Fig 18).

5. Détermination du poids sec de la partie végétative

Nous avons récolté les plants et la partie racinaire de chaque plant est ensuite enlevée. La partie aérienne est mise à sécher à une température de 50°C.

Après dessiccation, le poids de la partie sèche est mesuré (en mg) pour chaque plant.

Test de nodulation

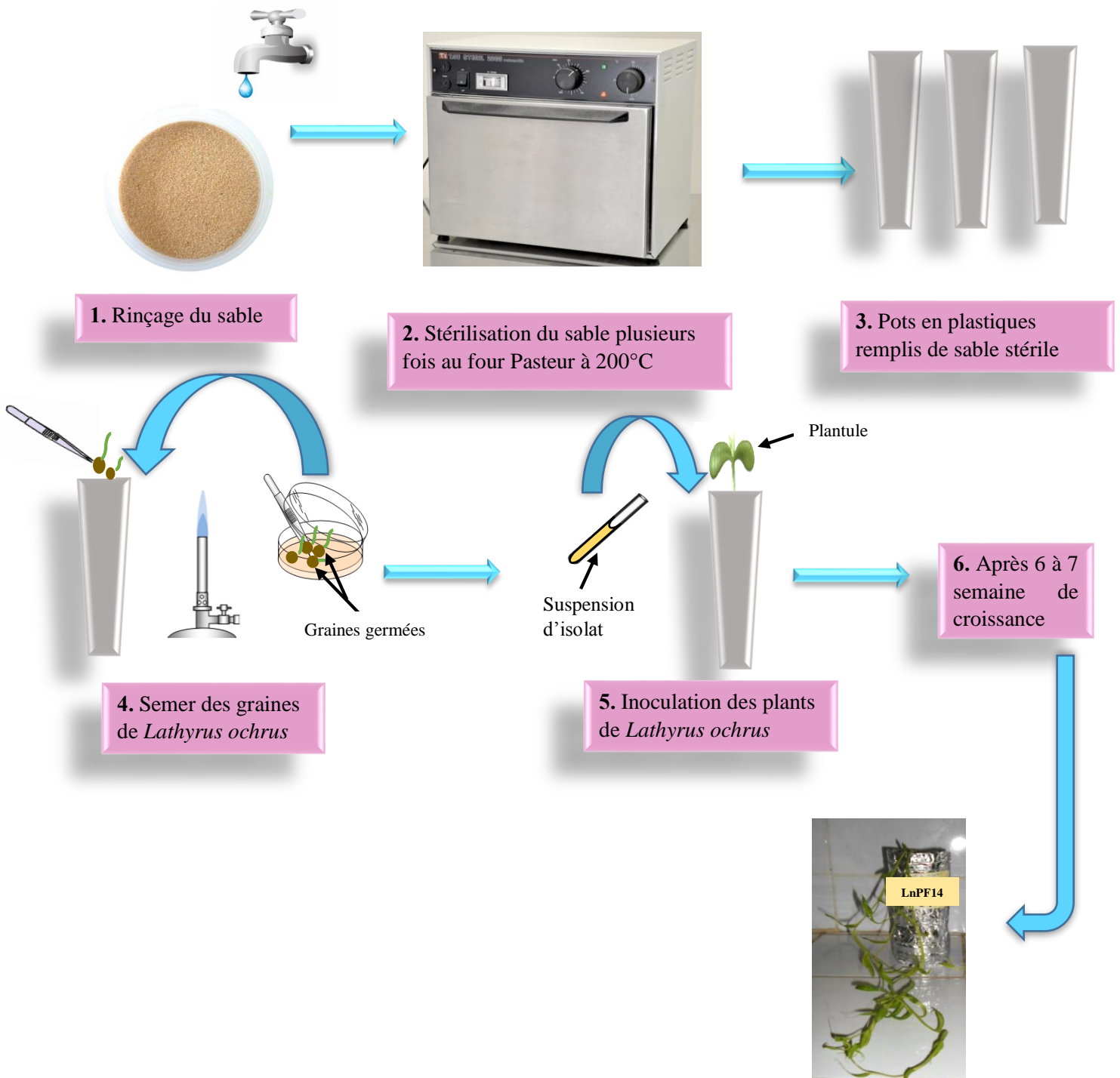


Fig 18. Protocole expérimental du test de nodulation in vitro

CHAPITRE VII : LA RESISTANCE DES ISOLATS AUX STRESS METALLIQUE ET SALIN

1. Tests de résistance à différentes concentrations en métaux lourds

Nous avons testé la résistance aux métaux lourds des 26 isolats qui solubilisent les phosphates inorganiques sur milieu solide. Les métaux lourds testés sont : plomb (Pb^{++}), mercure (Hg^{++}), cuivre (Cu^{++}), zinc (Zn^{++}), fer (Fe^{++}), nickel (Ni^{++}), cadmium (Cd^{++}), cobalt (Co^{++}) et chrome (Cr^{VI+}).

Chaque métal est testé en trois concentrations croissantes sauf ; Fe^{++} et Hg^{++} , pour lesquels nous avons utilisé six concentrations croissantes (Tableau 4).

Tableau 4. Les différentes concentrations utilisées pour tester la résistance des isolats aux métaux lourds

Métaux lourds	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}
	Concentrations croissantes pour chaque métal (mM)					
Fe^{++}	1.7	8.95	17.90	26.85	35.8	44.75
Hg^{++}	1	2	5	8	15	20
Pb^{++}	0.4	0.7	1	-	-	-
Cu^{++}	1	2	2.5	-	-	-
Co^{++}	1	2	3	-	-	-
Ni^{++}	0.7	1	2.5	-	-	-
Cr^{VI+}	0.2	0.7	1	-	-	-
Cd^{++}	0.8	1	2.5	-	-	-
Zn^{++}	12	16	32	-	-	-

La concentration de métal la plus élevée à laquelle la croissance de la bactérie était encore observée a été considérée comme la concentration de tolérance maximale (CMT) (Al-Enzi et Al-Charrakh (2012).

Selon les concentrations mentionnées sur le tableau 5, nous avons préparé des solutions métalliques qui sont stérilisés par filtration à l'aide d'un micro-filtre avec un diamètre de pores de 2 microns, et conservées à 6°C.

Le milieu YEMA est préparé et autoclavé à 120°C et après refroidissement du milieu jusqu'à 45°C, nous avons additionné 1ml de chaque solution métallique à 200ml du milieu YEMA.

Les boîtes de Pétri sont divisées en 14 carrés et en utilisant la technique des spots, 7µl provenant de cultures jeunes avec une DO de ($\approx 8.10^8$ UFC/ml) des isolats testés sont déposées à l'aide d'une micropipette dans un quadrant et les résultats sont la moyenne de deux répétitions.

Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 28°C pendant 15 jours et l'observation se fait tous les trois jours (Fig 19).

2. Tests de résistance à la salinité

Les isolats ont été testés pour leur tolérance aux différentes concentrations de sel (NaCl) en étudiant la croissance sur milieu YEMA additionné de 1, 2,5 et 5% (P / V) de NaCl, et sur milieu Tryptone agar (TA) (annexe I) contenant 2% (P / V) de NaCl (Priefer et al., 2001 , Thami-Alami et al., 2010).

Nous avons utilisé ; *Agrobacterium tumefaciens* (C58), *Burkholderia spp.* et *Cupriavidus basilensis* comme souches de référence.

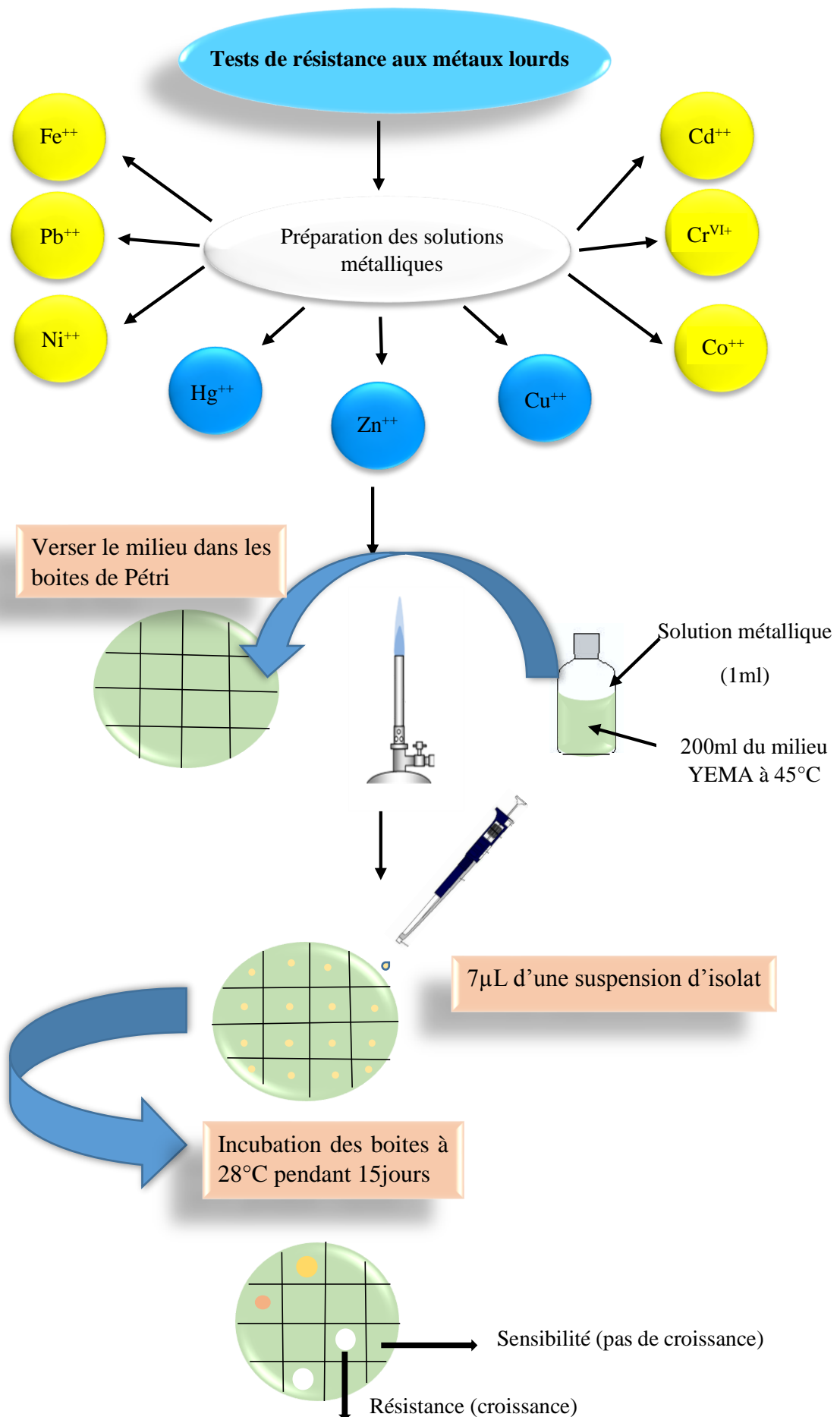


Fig 19. Protocole expérimental du test de ⁵⁹la résistance aux métaux lourds

CHAPITRE VIII : CARACTERISATION DE L'ISOLAT-LEVURE LnPF38

1. Etude morphologique et physiologique de l'isolat LnPF38

Dans le but d'étudier les divers caractères morphologiques et physiologiques de l'isolat LnPF38, plusieurs méthodes conventionnelles sont utilisées, y compris la taille et la forme des cellules, le type de reproduction et le bourgeonnement sont étudiés.

Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA, nous avonsensemencé une suspension de l'isolat LnPF38 provenant d'une culture jeune, et nous avons ensuite déposé au dessus de la gélose une lamelle.

Après une incubation à 48heures jusqu'à 72heures, des observations microscopiques sont faites avec du bleu de méthylène au grossissement $\times 100$. Aussi des observations sous microscope à l'état frais des cellules de l'isolat LnPF38 ont été réalisées.

La capacité de l'isolat LnPF38 à former des hyphes a été étudiée après 7 jours d'incubation.

2. Test de sporulation

Une suspension de l'isolat LnPF38 a été préparé à partir d'une culture jeune estensemencée sur trois types de milieux solides à base d'acétate de sodium : le milieu Mac Clary (annexe III), le milieu Fowells (annexe III) et le milieu Gordkoma (annexe III). L'incubation est faite après un à deux mois à température ambiante.

3. Tests de fermentation des glucides

Plusieurs hydrates de carbone sont utilisés pour voir la capacité de fermentation de la levure : D-glucose, lactose, D-fructose, D-galactose, maltose, D-saccharose, amidon. La solution de base utilisée pour la fermentation des hydrates de carbone est le milieu à base d'eau de levure (extrait de levure à 0,5% dans de l'eau distillée) conditionné avec une cloche de Durham additionné de 2% de chaque glucide. Les tubes ont été inoculés avec 1ml d'une suspension de ($\approx 9.10^8$ UFC/ml) d'une culture jeune de l'isolat LnPF38 et incubés pendant 10 à 15 jours à 28°C.

La présence de gaz dans la cloche indique une fermentation de la source de carbone testée (Wickerham et Burton, 1948 ; Wickerham, 1951).

4. Tests de résistance aux métaux lourds

4.1. Résistance aux métaux lourds sur milieu de culture solide

La capacité à résister aux métaux lourds de l'isolat LnPF38 a été évalué sur milieu YEMA additionné de neuf métaux en utilisant les concentrations suivantes : [Zn⁺⁺] 12, 16 et 32 mM; [Cd⁺⁺] 0,8, 1 et 2,5 mM; [Ni⁺⁺] 0,7, 1, 2,5 mM; [Co⁺⁺] 1, 2 et 3 mM; [Cu⁺⁺] 1, 2 et 2,5 mM; [Cr^{VI+}] 0,2, 0,7 et 1 mM; [Fe⁺⁺] 1,7, 8,95, 17,90, 26,85, 35,8 et 44,75 mM; [Hg⁺⁺] 1, 2, 5, 8, 15 et 20 mM; et [Pb⁺⁺] 0,4, 0,7, 1, 3, 8 et 10 mM.

En utilisant la méthode de spot ; des volumes de 7µl de la suspension de l'isolat LnPF38 sont déposés dans les milieux de cultures.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 28°C pendant deux semaines, et la CMT de chaque métal a été notée.

Tous les essais ont été réalisés en double.

4.2. Résistance aux métaux lourds sur milieu de culture liquide

L'isolat LnPF38 a été testé pour sa capacité à résister à cinq métaux lourds différents (Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺, Pb⁺⁺ et Cr^{VI+}) sur milieu liquide, en utilisant trois concentrations pour chaque métal: [Zn⁺⁺] 12, 16 et 32 mM; [Cd⁺⁺] 1,2, 3,5 mM; [Ni⁺⁺] 1, 2,5, 3,5 mM; [Pb⁺⁺] 3, 7 et 10 mM; [Cr^{VI+}] 0,7, 1 et 3,5 mM.

Les concentrations utilisées sont choisies à partir des valeurs CMT trouvées dans les résultats du test de la résistance sur milieu solide.

Dans des erlenmeyers de 250ml contenant 50ml de milieu YEMA ont été inoculés en triple avec 2ml de suspension de l'isolat LnPF38 provenant d'une culture jeune (≈ 8.10⁸UFC/ml).

Les erlenmeyers sont ensuite additionnés par les solutions de métaux lourds stériles (solutions mères). Le milieu sans métaux lourds a été utilisé comme blanc. Les erlenmeyers ont été incubés sur un agitateur rotatif à 150tr/min à 28°C pendant une semaine.

La DO₆₂₀ a été mesurée tous les jours pendant une semaine.

5. Solubilisation des phosphates inorganiques

5.1. Solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu de culture solide

L'isolat LnPF38 est testé pour son pouvoir à solubiliser deux formes de phosphates inorganiques ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PTC) et CaHPO_4 (PMC) sur cinq milieux solides : YEMA (Vincent, 1970), le milieu PVK (Pikovskaya, 1948), le milieu Sperber (Sperber, 1958) et enfin les deux milieux MNBRI et NBRIP (National Botanical Research Institute) (Nautiyal, 1999). Les milieux de culture ont été additionnés de 5g/l de PTC comme seule source de phosphate et le pH des milieux sont ajustés à 7 avant autoclavage.

Les milieux de cultures sont ensuite répartis dans des boîtes de Pétri et en utilisant la méthode de spots, nous avons inoculé chaque boîte avec 7 μ l de la suspension de l'isolat LnPF38 provenant d'une culture jeune.

Les diamètres des zones de solubilisation et des colonies ont été mesurés après 15 jours d'incubation des boîtes à 28°C. La taille de la zone de solubilisation est mesurée en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total (colonie + halo de solubilisation).

Tous les tests ont été répliqués trois fois et les données ont été exprimées en tant que valeur moyenne.

- **Influence de l'extrait de levure sur l'activité de solubilisation des phosphates inorganiques**

Nous avonsensemencé une culture jeune de l'isolat LnPF38 dans des boîtes de Pétri contenant deux milieux de cultures NBRIP avec extrait de levure (0,1g/l) et NBRIP sans extrait, pour tester l'influence de l'extrait de levure sur l'activité de solubilisation des phosphates inorganiques, en utilisant le PMC comme seule source de P.

Tous les tests ont été répliqués trois fois et les données ont été exprimées en tant que valeur moyenne.

5.2. Quantification du phosphate libéré par l'isolat LnPF38 sur milieu liquide

Des erlenmeyers de 250ml, nous avons mis 50ml de milieu NBRIP liquide (sans extrait de levure), en utilisant comme seul source de phosphate deux formes de phosphate inorganique ; PMC et PTC. Les erlenmeyers ont étéensemencés en triple avec 2ml de suspension de levure

($\approx 8.10^8$ UFC/ml) prélevé de la phase exponentielle. Le milieu stérile non inoculé a été utilisé comme un blanc.

L'incubation est faite sur un agitateur rotatif 150tr/min à 28°C pendant une semaine.

Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 10000rpm pendant 10 min et le phosphate dans le surnageant de la culture a été évalué en utilisant la méthode décrite par Chen et al (1956). Les données sont la moyenne de trois expériences.

➤ **ANALYSES STATISTIQUES**

L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour examiner les relations entre la tolérance des isolats in vitro à des concentrations élevées en métaux lourds et la solubilisation du PR et la salinité, et un phénogramme a été construit par la méthode de classification hiérarchique agglomérative (CHA). Les calculs, l'affichage graphique et les variables phénotypiques d'analyse de cluster informatique ont été réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2015 et 2016 et 2018, Addinsoft, Paris, France, <http://www.xlstat.com>).

PARTIE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : PIEGEAGE DES RHIZOBACTERIES SUR SUBSTRAT SOL-MINERAI DE FER

1. Région d'étude

La wilaya d'Annaba, Daïra d'El-Hadjar est le centre de plusieurs sites industriels qui sont souvent proches des zones urbanisées et constituent ainsi de sérieux problèmes de pollution.

Parmi les sites de pollution ; le complexe national de sidérurgie « Sider El-Hadjar » situé à 500m de l'agglomération Sidi Amar, ce qui préoccupe les habitants de cette commune en raison des retombées et des poussières chargées en métaux émises par l'usine et qui envahissent leur environnement (Merzouki et al, 2005).

Nous avons remarqué la présence de plusieurs genres de légumineuses qui poussent naturellement dans cette région (Fig 20) considérée comme une zone polluée et surtout la légumineuse *Lathyrus ochrus* (Fig 21). Ces observations nous ont conduit à étudier la microflore associée à cette légumineuse et notamment les rhizobia.



Fig 20. Champ de prélèvements des graines de *Lathyrus ochrus*

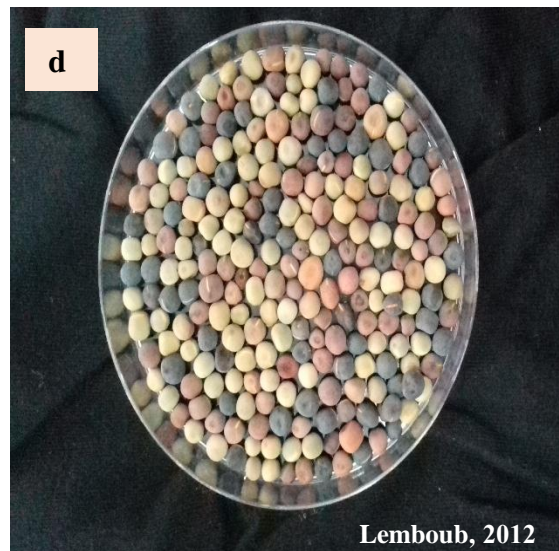


Fig 21. La légumineuse *Lathyrus ochrus* ; **a.** Plant de *Lochrus* in situ, **b.** fleur, **c.** racines avec nodules et **d.** graines

2. Résultats du piégeage des rhizobactéries par la légumineuse *Lathyrus ochrus* L.

Après deux mois de croissance, les plants de *L. ochrus* sont déterrés et nous avons observé la présence de nodules sur les racines. Les plants de *L. ochrus* se sont bien développés dans le substrat ; mélange de sol et de minerai de fer utilisé (Fig 22) ; et les nodosités proviennent des rhizobia présents dans le mélange de sol enrichi en minerai de fer.

Le test de piégeage nous a fourni des résultats intéressants, quarante plants de *L. ochrus* montrent une partie aérienne bien développée et un système racinaire très ramifié avec un nombre moyen significatif de nodules allant de 24 à 50 nodules/pot (Tableau 5). Les nodules sont de couleur soit rose/rouge ou blanche (Fig 22) et sont principalement situés dans la partie supérieure des racines.

Tableau 5. Le nombre moyen de nodules pour chaque pot

N° Pot	Nombre moyen de nodules	N° Pot	Nombre de nodules moyen
1	29	11	24
2	30	12	35
3	27	13	37
4	25	14	33
5	27	15	27
6	31	16	35
7	41	17	31
8	29	18	51
9	25	19	34
10	43	20	11



Nodules

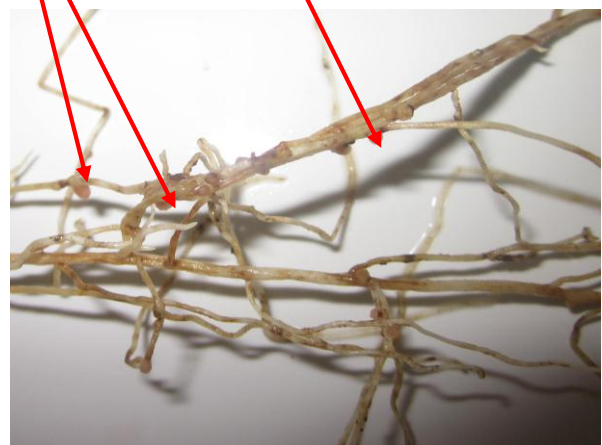


Fig 22. Plants de *L.ochrus* nodulés après piégeage des rhizobia

3. Discussion

Nous avons choisi la légumineuse *Lathyrus ochrus* parce que les légumineuses sauvages sont plus aptes à établir des relations symbiotiques et peuvent avoir une activité de fixation d'azote plus élevée et sont plus tolérantes aux conditions de stress que les légumineuses cultivées (Zahran, 2001).

Les résultats du piégeage des rhizobia ont montré que l'ajout de minerai de fer n'a aucune influence sur la croissance de *Lathyrus ochrus* et les plants se sont bien adaptés au substrat (sol pollué par les retombées des poussières de l'usine Sider et additionné de minerai de fer), avec une partie aérienne bien développée, un système racinaire très ramifié et un nombre significatif de nodules qui varie de 24 à 50 nodules/pot.

Nous avons noté que les plants du pot n° 20 comportent onze nodules seulement, le nombre de nodules est nettement inférieur par rapport aux autres pots. Aussi les plants présentent une partie aérienne réduite et une partie racinaire moins ramifiées par rapport aux plants des autres pots ; cela est dû à la période à laquelle le test de piégeage a été mené (fin Mai). Durant cette période les températures élevées ont beaucoup influencées la croissance des plants. Nous pensons donc que la diminution de la partie aérienne, la partie racinaire et le nombre de nodules est fortement influencée par l'augmentation des températures.

Ces résultats ont été confirmés par Mahdavi et al (2007), qui ont montré que la température du sol a des effets directs sur la croissance, le développement racinaire et l'absorption d'eau et de nutriments par les racines. Généralement, la symbiose légumineuse-rhizobia dans la nature est très sensible aux contraintes de l'environnement (Bruning et Rozema, 2012 ; Palma et al, 2013).

Ces observations ont aussi été notées par Zahran (2001) ; il a noté que les rhizobia qui subissent des conditions défavorables comme la chaleur peuvent perdre leur plasmide qui porte les gènes responsables de la symbiose ou suite à une modification dans la composition des polysaccharides cellulaires nécessaires pour la nodulation.

CHAPITRE II : ISOLEMENT ET CARACTERISATION CULTURALE DES RHIZOBACTERIES PIEGEES

1. Résultats

1.1. Isolement des rhizobia nodulaires

L'isolement des rhizobia (symbiotes ou endophytes) piégés à partir des nodules racinaires de la légumineuse spontanée *L. ochrus* est réalisé sur trois milieux de culture sélectifs : milieu YMFP (milieu YEMA modifié additionné des deux minerais fer et phosphate), milieu Gélose à l'acétamide (GA) et milieu (*Bosea* Culture Medium 115) BCM115.

Après une série de purification, nous avons obtenu 51 isolats sur les trois milieux de culture utilisés (Tableau 6).

Tableau 6. Isolats obtenus sur chaque milieu d'isolement

Milieux d'isolement	Isolats	Pourcentage
YMFP	LnPF1, LnPF2, LnPF3, LnPF4, LnPF5, LnPF6, LnPF7, LnPF8, LnPF9, LnPF10, LnPF11, LnPF12, LnPF13, LnPF14, LnPF15, LnPF16, LnPF17, LnPF18, LnPF19, LnPF20, LnPF21, LnPF22, LnPF23, LnPF24, LnPF25, LnPF26, LnPF27, LnPF28, LnPF29, LnPF30, LnPF31, LnPF32, LnPF33, LnPF34, LnPF35, LnPF36, LnPF37, LnPF39, LnPF40, LnPF41, LnPF42, LnPF43, LnPF44, LnPF45, LnPF46	88.23%
GA	LnPG1, LnPG2	3.92%
BCM115	LnPC1, LnPC2, LnPC3, LnPC4	7.84%

Le tableau ci-dessus montre que la grande majorité des isolats (88.23%) sont obtenus sur milieu YMFP, nous pouvons donc dire que ces isolats pourraient résister aux métaux lourds et solubiliser le phosphate roche.

NB : Nous avons utilisé un nombre important de nodules pour pouvoir obtenir les 51 isolats, et cela est dû à la grande sélectivité des trois milieux de culture utilisés, ce qui a inhibé la croissance de la majorité des microorganismes dans les suspensions nodulaires.

1.2. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats

1.2.1. Temps de croissance

Le temps de croissance des rhizobia, est un indice très important de groupage, il permet de regrouper les isolats en trois catégories : les isolats à croissance rapide (48 à 72 heures), les isolats à croissance moyenne (3 à 4 jours) et les isolats à croissance lente (≥ 4 jours) (Somasegaran et Hoben 1985).

Tableau 7. Temps de croissance des isolats

Codes	Nombre d'isolats	Temps de croissance
LnPF2, LnPF3, LnPF4, LnPF5, LnPF8, LnPF9, LnPF11, LnPF12, LnPF13, LnPF14, LnPF20, LnPF22, LnPF26, LnPF23, LnPF25, LnPF39, LnPF43, LnPF45, LnPF42, LnPF44, LnPF46, LnPC1, LnPC2, LnPC3, LnPC4, LnPG1, LnPG2	27	Croissance rapide (2 à 3 jours)
LnPF7, LnPF18, LnPF19, LnPF21, LnPF24, LnPF30, LnPF32, LnPF34, LnPF35	9	Croissance moyenne (4 jours)
LnPF1, LnPF6, LnPF10, LnPF15, LnPF16, LnPF17, LnPF27, LnPF28, LnPF29, LnPF31, LnPF33, LnPF36, LnPF37, LnPF40, LnPF41	15	Croissance lente (5 jours)

Le tableau 7 montre que 52.94% ; soit la majorité des isolats sont à croissance rapide (2 à 3 jours), 17.64% sont à croissance moyenne (4 jours) et 29.41% sont à croissance lente (5jours).

Howieson et McInnes (2001) ont signalé que la plupart des légumineuses de la région méditerranéenne semblent être nodulées par des bactéries à croissance rapide.

1.2.2. Observation macroscopique et microscopique des isolats

Dans cette étude, la croissance des plants de *Lathyrus ochrus* sur substrat ; mélange de sol pollué et de minerai de fer ; nous a permis d'obtenir cinquante et un isolats. Ces isolats sont différents dans leurs temps de croissance, leurs caractères macroscopiques et microscopiques. Nous avons aussi remarqué que ces isolats n'ont pas et/ou peu produit de polysaccharide.

Les tableaux (8, 9, 10 et 11) récapitulent les caractères macroscopiques et microscopiques de chaque isolat.

Tableau 8. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (bâtonnets)

Isolats	Aspects et taille des colonies	Morphologies
LnPC4	Colonies blanches, plates, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Long bâtonnets
LnPF8	Colonies blanches visqueuses, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (2-4mm)	Bâtonnets
LnPF13	Colonies jaune d'œuf, oblique, irrégulières, rugueuses, de tailles petites (2-4 mm)	Bâtonnets
LnPF14	Colonies jaune transparent bombées, irrégulières et rugueuses, de tailles petites (2-4 mm)	Bâtonnets
LnPF44	Colonies jaune, plates et irrégulières, de tailles moyennes (2-5mm)	Bâtonnets de taille moyenne
LnPF18*	Colonies rouge avec contour transparent, plates un peu ovale, régulières et lisses, de tailles petites (2mm)	Bâtonnets
LnPF19	Colonies rose, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Bâtonnets
LnPF6	Colonies rose, plates, lisses, de tailles moyennes (≈ 5mm)	Gros bâtonnets
LnPF7	Colonies filamenteuses de couleur noir et irrégulières, de tailles moyennes (≈1mm)	Large bâtonnets

* : Isolats avec reflets métallique

Tableau 9. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (courts bâtonnets)

Isolats	Aspects et taille des colonies	Morphologies
LnPF1	Colonies blanches translucides, plates et irrégulières, de tailles petites ($\approx 1\text{mm}$)	Courts bâtonnets
LnPF21	Colonies blanches, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1mm)	Courts bâtonnets
LnPF24	Colonies blanches, plates, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Courts bâtonnets
LnPF3*	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites ($\approx 1\text{mm}$)	Courts bâtonnets
LnPF4	Colonies jaune brillant, bombées, rondes et lisses, de tailles petites ($\approx 1\text{mm}$)	Courts bâtonnets
LnPF12	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Courts bâtonnets
LnPF22*	Colonies punctiformes de couleur jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites ($< 1\text{mm}$)	Très courts bâtonnets
LnPF23	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1mm)	Très courts bâtonnets
LnPF37	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Courts bâtonnets
LnPF39	Colonies jaune, plates, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Courts bâtonnets
LnPF46	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles moyennes (2-4mm)	Courts bâtonnets
LnPG2	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1mm)	Courts bâtonnets
LnPF25	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites ($< 1\text{mm}$)	Courts bâtonnets
LnPF31*	Colonies jaune d'œuf, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Court bâtonnets
LnPF33	Colonies punctiformes de couleur rose, bombées, rondes et lisses, de tailles petites ($< 1\text{mm}$)	Très courts bâtonnets
LnPF36	Colonies rose, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Courts bâtonnets

* : Isolats avec reflets métallique

Tableau 10. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (cocci)

Isolats	Aspects et taille des colonies	Morphologies
LnPF30	Colonies punctiforme de couleur blanche, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF34	Colonies punctiformes de couleur blanche, plates, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPC1	Colonies Blanche, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Cocci
LnPG1	Colonies blanches, plates, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF43	Colonies beige, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (2-3mm)	Cocci
LnPF29	Colonies beige, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (2-3mm)	Cocci
LnPF15*	Colonies jaune d'œuf, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (≈1mm)	Cocci
LnPF17	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Cocci
LnPF26	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Cocci
LnPF27	Colonies jaune d'œuf, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF28	Colonies jaune d'œuf, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1mm)	Cocci
LnPF35	Colonies jaune transparent, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF42	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Cocci
LnPF2	Colonies roses brillant, Bombées, rondes, lisses et visqueuses, de tailles petites (2-3mm)	Cocci
LnPF5	Colonies rouge avec contour transparent, plates, rondes et lisses de tailles petites (2-4mm)	Cocci
LnPF20	Colonies punctiforme de couleur rouge, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF40	Colonies rouge, opaque, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci
LnPF41	Colonies punctiformes de couleur rouge, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Cocci

* : Isolats avec reflets métallique

Tableau 11. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats (petits et gros cocci)

Isolats	Aspects et taille des colonies	Morphologies
LnPC2	Colonies blanches, plates, rondes et lisses, de tailles petites (2mm)	Petits cocci
LnPF16	Colonies ponctiformes de couleur rouge, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (< 1mm)	Petits cocci
LnPF32	Colonies ponctiforme de couleur rouge, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (<1mm)	Petits cocci
LnPF45	Colonies rouge, opaque, bombées, rondes et lisses, de tailles moyennes (1-2mm)	Petits cocci
LnPC3	Colonies Blanche, plates, rondes et lisses, de tailles petites (1-2mm)	Gros cocci
LnPF9	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles très petites (< 1mm)	Gros cocci
LnPF11	Colonies jaune, bombées, rondes et lisses, de tailles moyennes (\approx 4 mm)	Gros cocci
LnPF10	Colonies rose très clair, bombées, rondes et lisses, de tailles petites (1-3mm)	Gros cocci

Cette variété de caractéristiques morphologiques des isolats reflète la diversité des rhizobactéries à l'intérieur des nodules de *Lathyrus ochrus*.

1.2.3. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de rouge Congo (RC)

Les résultats de la croissance des isolats (solubilisateur du phosphate roche (PR)) sur milieu YEMA additionné de RC (0.0025%) sont représentés sur le tableau 12.

Les isolats ont conservés leur couleur initiale, soit ils ont absorbé très peu de RC et les colonies apparaissent de couleur rosâtre, ce qui veut dire que la majorité des isolats n'absorbent

pas ou peu le RC (Fig 23a et b, Fig 24d, e, f, g et h). Seul l'isolat LnPF19 a absorbé le RC et apparaît d'une couleur rouge vif (Fig 23c). Les souches de référence *Burkholderia* sp et *Cupriavidus basilensis* apparaissent d'une couleur rosâtre ce qui veut dire qu'elles ont absorbé peu de RC (Fig 25i et j), par contre *Agrobacterium tumefaciens* (C58) a absorbé le RC.

Tableau 12. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de RC

Isolats	Croissance sur YEMA additionné de RC
LnPF13, LnPF14, LnPF44, LnPF46, LnPG1	Colonies qui ont gardé leur couleur initiale (n'absorbent pas le RC)
LnPF18, LnPFG2, LnPF32	Colonies rosâtres (absorbent très peu le RC)
LnPF19	Colonies rougeâtres (absorbent fortement le RC)

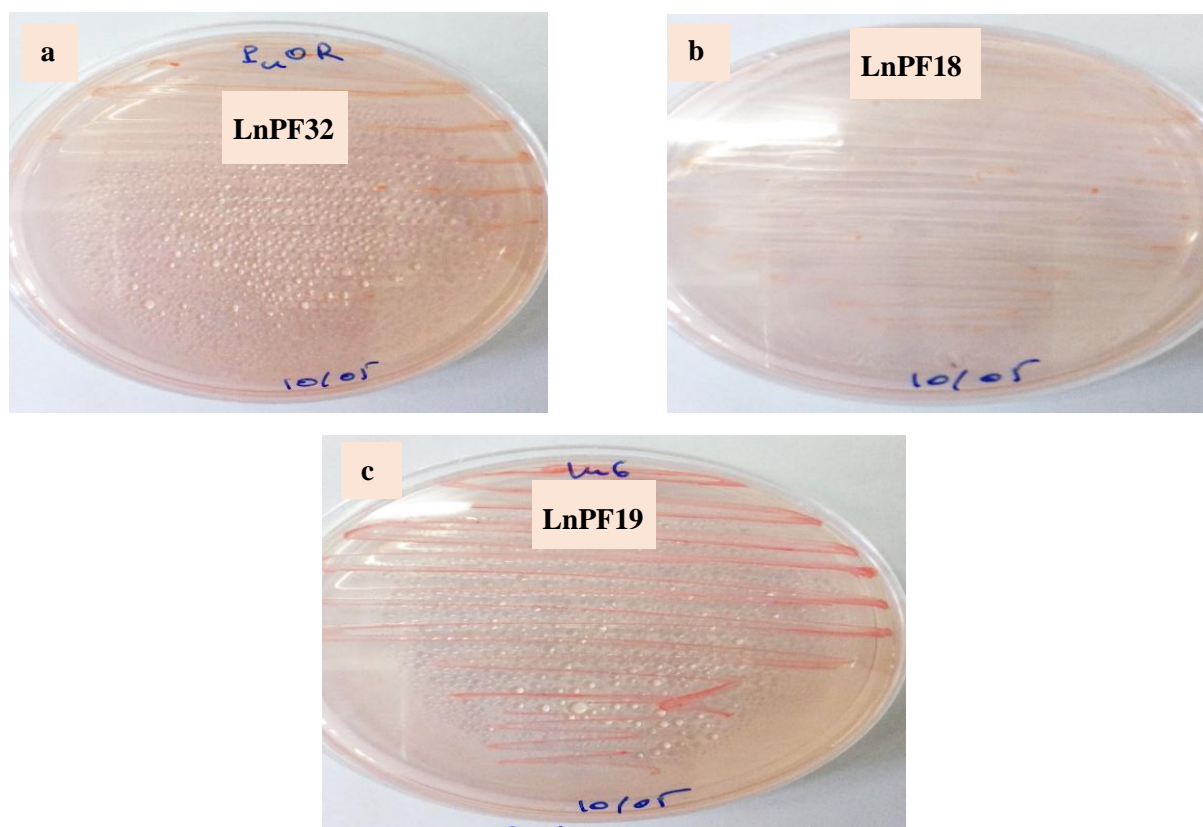


Fig 23. Isolats à croissance moyenne sur YEMA additionné de RC ; a. LnPF32, b. LnPF18 et c.

LnPF19

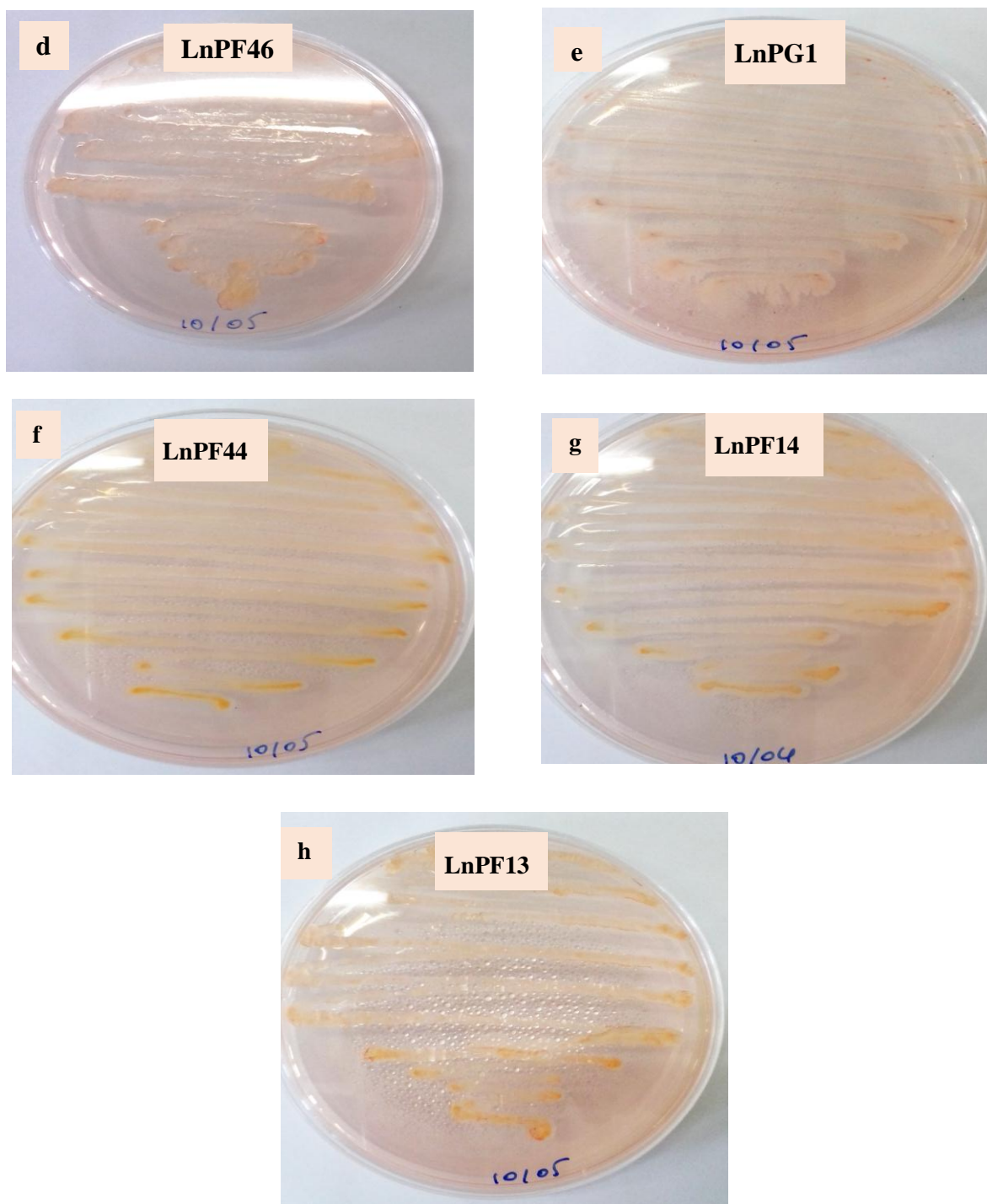


Fig 24. Les isolats à croissance rapide sur milieu YEMA additionné de RC ; d. LnPF46, e. LnPG1, f. LnPF44, g. LnPF14 et h. LnPF13

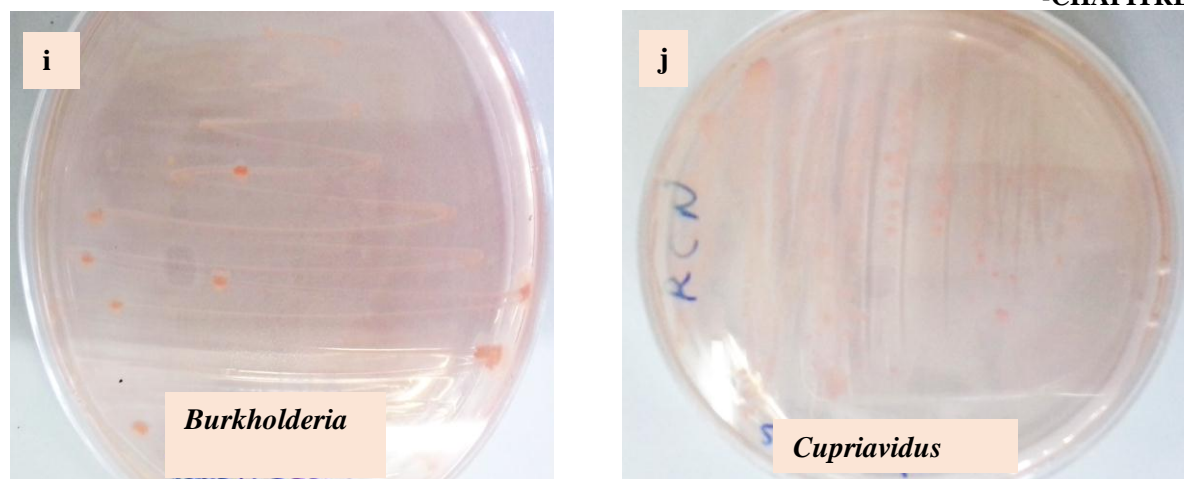


Fig 25. Croissance des souches de référence sur YEMA additionné de RC ; i. *Burkholderia* et j. *Cupriavidus*

1.2.4. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de bleu de Bromothymol (BBT)

Les résultats de la croissance des isolats (solubilisateur du phosphate roche) sur milieu YEMA additionné de BBT (0.0025%) ont montré un virage de couleur de l'indicateur de pH au jaune (Fig 26a, b, c, d, e et f) et ce pour la majorité des isolats testés (Tableau 13) ainsi que pour la souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* C58. Seuls les isolats LnPF18 et LnPF32 n'ont pas modifié le pH du milieu de même pour les souches de référence *Burkholderia* sp (Fig 27g et h) et *Cupriavidus basilensis*.

Tableau 13. Croissance des isolats sur YEMA additionné de BBT

Les isolats	Croissance sur milieu YEMA additionné de BBT
LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF44, LnPF46, LnPG1, LnPFG2	Acidifiantes
LnPF18 et LnPF32	Pas de changement de la couleur du milieu

+++ : bonne croissance, ++ : moyenne croissance, + : faible croissance

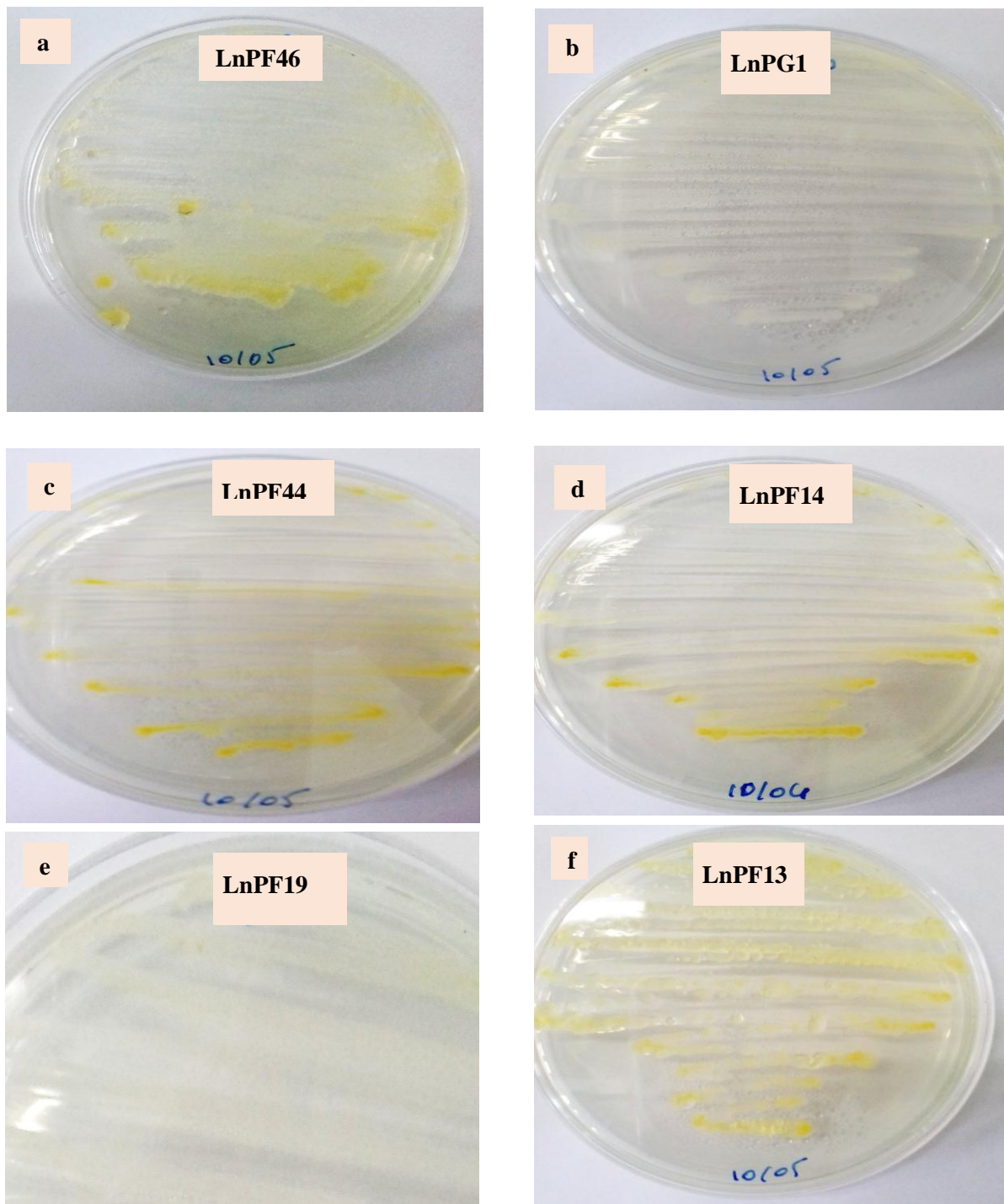


Fig 26. Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de BBT ; a. LnPF46, b. LnPG1, d. LnPF44, d. LnPF14, e. LnPF19 et f. LnPF13

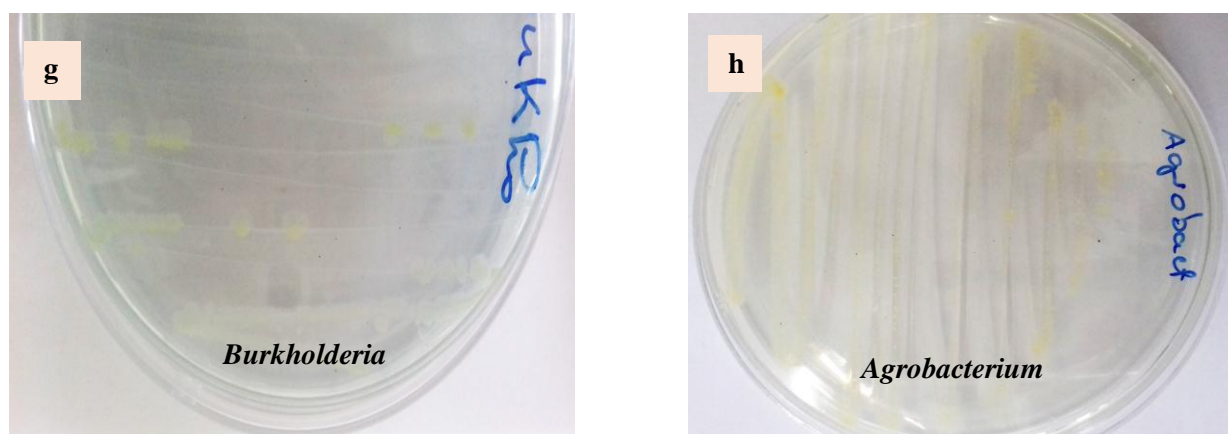


Fig 27. Croissance des souches de références sur YEMA additionné de BBT ; **g.** *Burkholderia* sp et **h.** *Agrobacterium tumefaciens* (C58)

1.2.5. Croissance des isolats sur milieu GPA

Nous avons observé que la majorité des isolats ont eu une bonne croissance sur le milieu GPA (Fig 28), à l'exception de LnPF19 et LnPG2 qui ont faiblement poussé sur ce milieu (Tableau 14).

Aussi les souches de références *Burkholderia* sp, *Cupriavidus basilensis* et *Agrobacterium tumefaciens* se sont bien développées sur le milieu GPA.

Tableau 14. Croissance des isolats sur milieu GPA

Les isolats	Croissance sur milieu GPA
LnPF13, LnPF44, LnPF46, LnPG1, LnPF18, LnPF32, LnPF14	+++
LnPF19	++
LnPG2	+

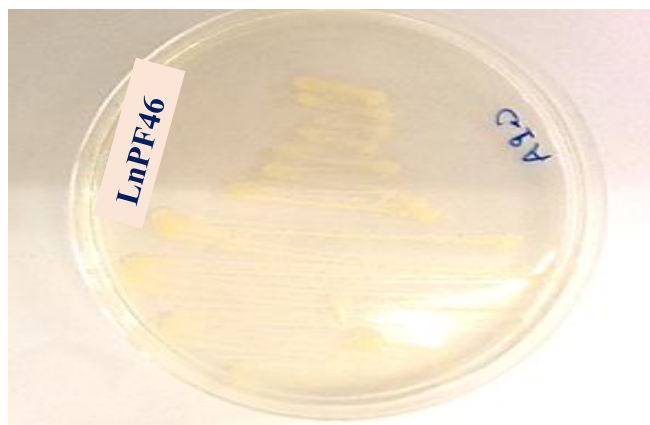


Fig 28. Croissance de LnPF46 sur milieu GPA

1.2.6. Croissance des isolats sur milieux YMFP et YEMA

D'après les résultats obtenus, nous avons observé que le temps de croissance des isolats était plus court avec une abondance plus importante sur milieu YEMA par rapport au milieu YMFP (Fig 29, 30 et 31).

Donc le rajout des minerais fer et phosphate a rendu le milieu YMFP plus sélectif ; ce qui nous a permis de sélectionner des souches résistantes aux métaux lourds et solubilisatrice de phosphate.

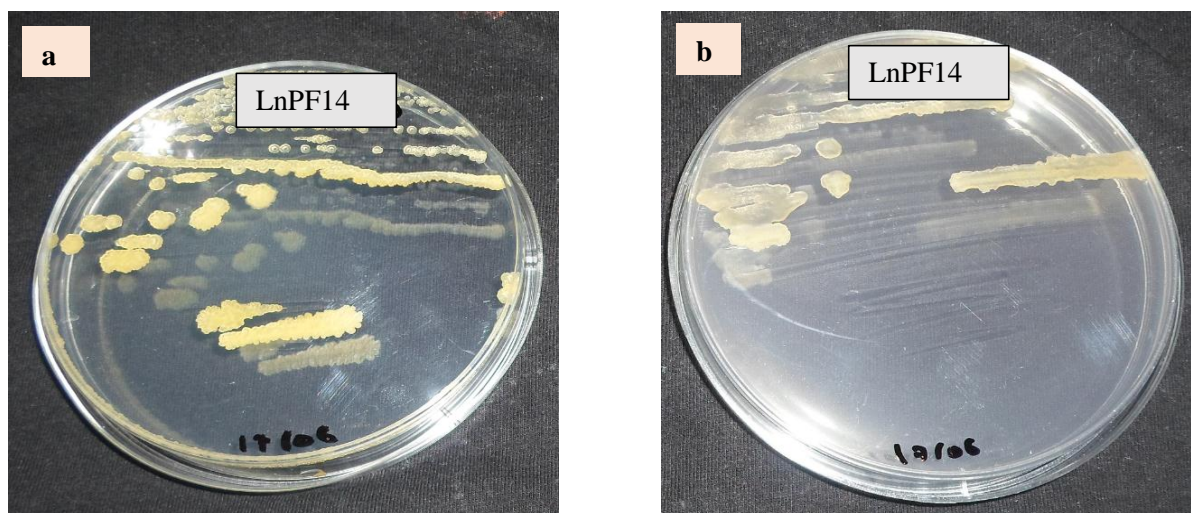


Fig 29. Croissance de LnPF14 sur ; a. YMA et b. YMFP

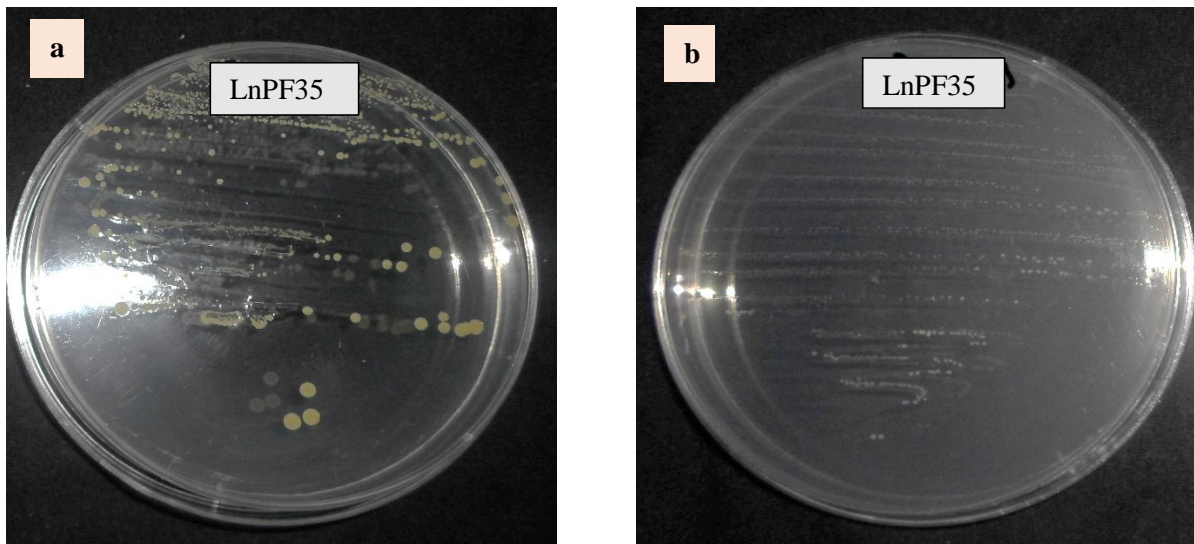


Fig 30. Croissance de LnPF35 sur ; a. YMA et b. YMFP

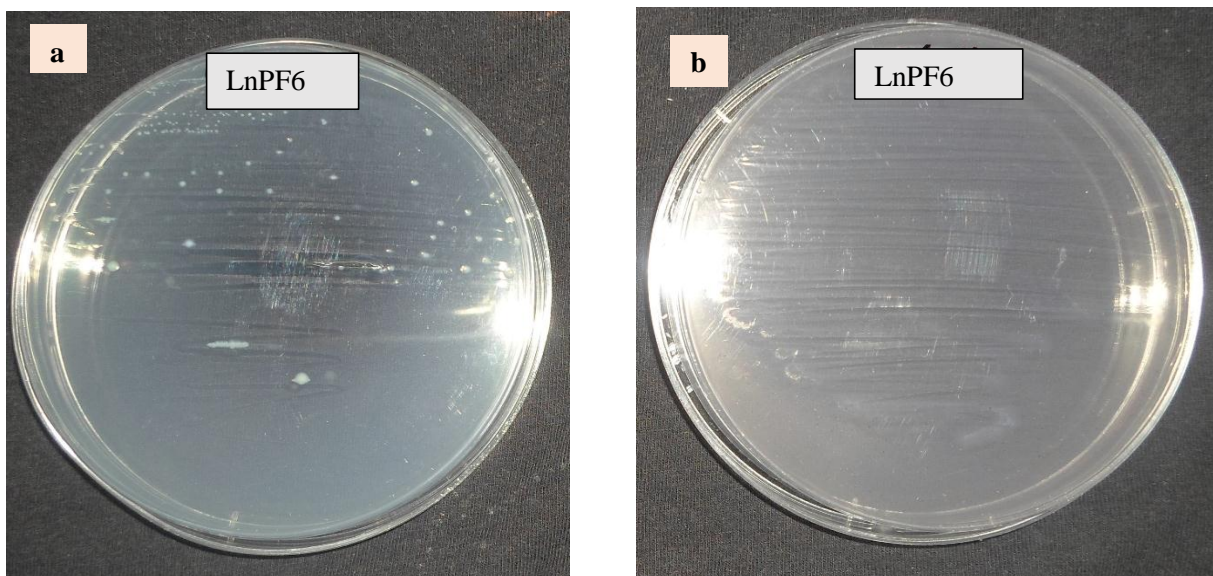


Fig 31. Croissance de LnPF6 sur ; a. YMA et b. YMFP

1.2.7. Test au cétolactose

Les résultats ont confirmé l'absence de l'enzyme 3-cétolactose hydrolase pour tous les isolats. Cette enzyme est produite par les souches d'*Agrobacterium* (biovar 1) durant leur croissance sur le lactose ; ce qui confirme que les isolats n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*.

1.2.8. Coloration de Gram et la recherche de la catalase et de l'oxydase

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram montrent des cellules colorées en rose, ce qui signifie que les isolats sont Gram négatif.

Tous les isolats sont catalase positive et oxydase positive (Fig 32). Les isolats sont donc des aérobies.

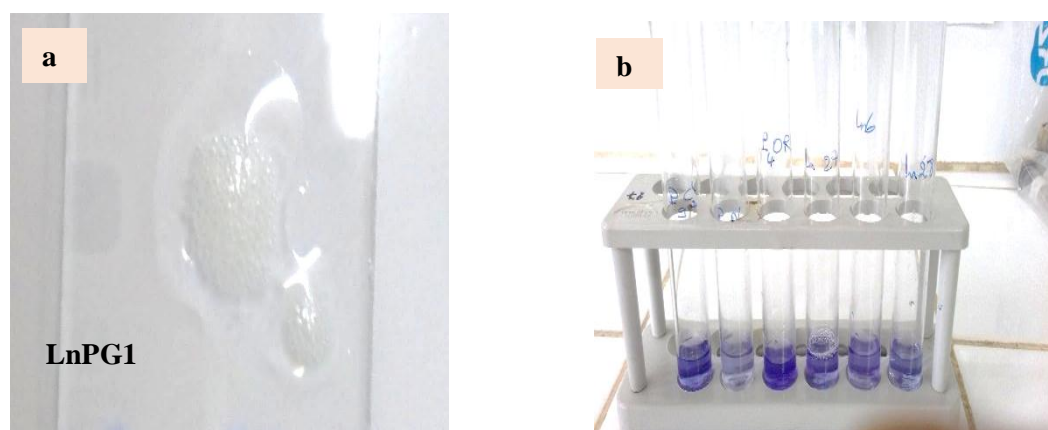


Fig 32. Résultat du test de ; **a.** catalase positive pour la LnPG1 et **b.** oxydase positive pour tous les isolats qui ont solubilisé le PR sur milieu liquide

2. Discussion

Nous avons étudié 51 rhizobactéries isolées après piégeage par la légumineuse *Lathyrus ochrus* cultivée dans un substrat de sol pollué par les retombées de la pollution atmosphérique provenant de "Sider El-Hadjar" et additionné de minerai de fer.

L'isolement est réalisé sur trois milieux de culture YMFP, GA et BCM115 et la majorité des isolats sont obtenus sur milieu YMFP ce qui montre leur capacité à solubiliser le phosphate et résister aux métaux lourds.

L'étude de la caractérisation culturale et morphologique des isolats nous a permis de regrouper les isolats en différents groupes en se basant sur leur temps de croissance qui varie entre rapide (52.94% des isolats), moyen (17.64% des isolats) et lent (29.41% des isolats).

L'étude macroscopique nous a montré les différentes caractéristiques des colonies entre lisse ou rugueuse, translucide ou opaque, bombées ou plates. Aussi la majorité des isolats produisent des pigmentations de couleur rose, rouge, jaune, jaune d'œuf avec également des isolats de couleur blanche et beige, avec des reflets métalliques pour certains isolats. Le

diamètre des colonies varie entre 1 et 5mm et même ponctiformes après 3 à 7 jours d'incubation. Les isolats n'ont pas produit de polysaccharide.

L'examen microscopique a permis de déterminer que les isolats sont des bâtonnets ou des cocci de tailles différentes et sont tous des Gram négatif, catalase et oxydase positives.

Ces résultats nous confirment que les nodules de la légumineuse *Lathyrus ochrus* renferment une multitude de bactéries très riche qui ont pu pénétrer à l'intérieur de ses nodules comme bactéries symbiotiques ou endophytes.

L'étude de la croissance des neuf isolats (solubilisateur de PR) sur milieu YEMA additionné de 0.0025% de RC a montré que la majorité des isolats n'absorbent pas ou peu le RC de même pour les souches de référence *Burkholderia* sp et *Cupriavidus basilensis* à l'exception de la LnPF19 qui absorbe fortement le RC. Selon plusieurs études la majorité des rhizobia qui appartiennent à la classe des α -Protéobactéries (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium*...) n'absorbent pas et/ou faiblement le RC (Jordan, 1984).

Abu-Zaitoon et Sallal (2012) ont montré aussi que les souches du genre *Rhizobium* y compris *R. leguminosarum*, *R. loti* et *R. ciceri* n'ont pas absorbé le RC.

Selon Somasegaran et Hoben (1994), l'absorption du RC est un caractère distinctif des bactéries fixatrices d'azote. Donc la majorité des rhizobia n'absorbent pas le RC mais les nouveaux genres de rhizobia (qui appartiennent à β et δ -Proteobacteria) peuvent absorber le RC.

En ce qui concerne la croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de BBT, les isolats à croissance rapide ont acidifié le milieu ; ce qui est confirmé par plusieurs études (Jordan, 1984). Par contre les isolats à croissance moyenne LnPF18 et LnPF32 n'ont pas changé le pH du milieu tout de même pour les souches de référence *Burkholderia* et *Cupriavidus*., ce qui est confirmé par Pervin et al (2017) les isolats lent nécessitent plus de temps à produire des points de terminaison alcalins avec ou sans changement de la couleur du milieu.

D'après Somasegaran et Hoben (1985), les rhizobia à croissance rapide sont généralement acidifiantes ; alors que les rhizobia à croissance lente sont alcalinisantes.

Les rhizobia ne poussent pas ou faiblement sur milieu GPA (Somasegaram et Hoben ,1994 ; Vincent, 1970) ; en raison que les rhizobia ne métabolisent pas le peptone comme source d'azote, de vitamines ou de facteurs de croissance ou d'acides aminés (Previn et al, 2017) ce qui est le cas de LnPF19 et LnPG2. Nous avons noté que le reste des isolats se sont bien

développés sur milieu GPA, ce qui peut expliquer que nos isolats appartiennent à autres groupes de rhizobia.

Nous pouvant dire que la majorité des isolats et surtout les isolats qui ont solubilisé le phosphate roche sur milieu liquide n'appartiennent pas au groupe des rhizobia (α -Protéobactéries) et peuvent appartenir à d'autres nouveaux genres de bactéries qui sont nouvellement inclus dans la classification taxonomique des rhizobia comme par exemple : *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*....

CHAPITRE III : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ISOLATS

1. Résultats de l'identification phénotypique Api 20E

Les résultats obtenus de l'Api 20E sont différents d'un isolat à l'autre. Nous avons regroupé les isolats (Tableau 15) selon les critères suivants :

- Métaboliser trois substrats ou plus
- Liquéfier la gélatine et dégrader le citrate
- Liquéfier la gélatine
- Métaboliser un seul substrat
- Aucune métabolisation

Tableau 15. Les résultats des isolats de l'Api 20E

Isolats	(%) isolats	Observations	Genres et espèces
LnPF46, LnPG2, LnPC2, LnPF4, LnPF28, LnPF1, LnPC3, LnPF45, LnPG1, LnPF21, LnP42, LnPF6, LnPF13, LnPF44, LnPF14	29.41	Métabolisation de trois substrats ou plus ; donc ces isolats peuvent appartenir aux Entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Chryseobacterium indoligenes</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Aeromonas</i>
LnPF3, LnPF39, LnPF23, LnPF22	7.84	Métabolisation de la gélatine et du citrate	<i>Chryseobacterium indoligenes</i> , <i>Ochrobacterium anthropi</i>
LnPF15, LnPF9, LnPF31, LnPF4, LnPF12, LnPF25	11.78	Métabolisation de la gélatine seulement.	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>
LnPF36, LnPF24	3.92	Métabolisation d'un seul substrat	<i>Alcaligenes / Bordetella / Morexella spp</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i>
LnPF29, LnPF2, LnPF8, LnPF40, LnPF33, LnPC4, LnPF18, LnPF19	15.68	Pas de métabolisation au bout de 7 jours	Non fermenteur spp, <i>Ochrobactrum anthropi</i>

2. Résultats de l'identification phénotypique Api 20NE

Les résultats de l'Api 20NE des 9 isolats qui ont solubilisé le PR sur milieu liquide se résumant dans les tableaux suivants :

Tableau 16. Résultats des tests sur Api 20NE

Tests	Réaction/ Enzyme	Isolats (G1)					
		LnPF13	LnPF46	LnPF44	LnPG1	LnPF14	LnPF19
NO3	Réduction des nitrates	-	-	-	-	-	-
TRP	Formation d'indole	±	+	-	-	-	-
GLU	Fermentation du glucose	+	+	+	+	-	-
ADH	Arginine Dihydrolase	+	+	+	+	+	-
URE	Uréase	+	+	+	+	+	+
ESC	Hydrolyse β-glucosidase	-	+	-	-	-	-
GEL	Hydrolyse (protéase)	+	+	+	+	+	+
PNPG	β-galactosidase Para-Nitro-Phényl-β D-Galctopyranosidase	-	-	-	-	-	-

(+) : résultat positif, (-) : résultat négatif, (±) : résultat intermédiaire.

Suite tableau 16.

Tests	Réaction/Enzyme	Isolats (G2)		
		LnPF18	LnPG2	LnPF32
NO3	Réduction des nitrates	-	-	-
TRP	Formation d'indole	-	+	-
GLU	Fermentation du glucose	-	-	-
ADH	Arginine Dihydrolase	-	-	-
URE	Uréase	+	-	-
ESC	Hydrolyse β-glucosidase	-	-	+
GEL	Hydrolyse (protéase)	+	-	-
PNPG	β-galactosidase Para-Nitro-Phényl-β D-Galctopyranosidase	+	-	-

(+) : résultat positif, (-) : résultat négatif.

Tableau 17. Assimilation des substrats de l'Api 20NE

Tests	Ingrédient	Isolats (G1)					
		LnPF13	LnPF46	LnPF44	LnPG1	LnPF14	LnPF19
GLU*	D-Glucose	+	+	+	+	+	+
ARA	L-arabinose	+	+	+	+	+	-
MNE	D-mannose	+	+	+	-	+	+
MAN	D-mannitol	+	+	+	+	+	+
NAG	N-acétyl- glucosamine	-	-	-	-	-	-
MAL	D-maltose	+	+	-	-	-	-
GNT	Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+
CAP	Acide caprique	+	+	+	+	+	+
ADI	Acide adipique	-	-	-	-	-	-
MLT	Acide malique	+	+	+	+	+	+
CIT	Trisodium citrate	+	+	+	+	+	+
PAC	Acide phénylacétique	-	-	-	-	-	-

Suite tableau 17.

Tests	Ingrédient	Isolats (G2)		
		LnPF18	LnPG2	LnPF32
GLU*	D-Glucose	-	-	-
ARA	L-arabinose	-	-	-
MNE	D-mannose	-	-	-
MAN	D-mannitol	-	-	-
NAG	N-acétyl-glucosamine	-	-	-
MAL	D-maltose	-	-	-
GNT	Potassium gluconate	-	-	-
CAP	Acide caprique	-	-	-
ADI	Acide adipique	-	-	-
MLT	Acide malique	-	-	-
CIT	Trisodium citrate	-	-	-
PAC	Acide phénylacétique	-	-	-

(+) : résultat positif, (-) : résultat négatif.

3. Discussion

La caractérisation biochimique des isolats, en utilisant les galeries biochimiques (Api 20E et Api 20NE) nous a donné des résultats importants sur le comportement de chaque isolat, ce qui nous a permis de rapprocher chaque isolat à un genre bactérien bien précis.

Les résultats de l'Api 20E (Tableau 15), nous ont permis de classer les isolats en 5 groupes différents selon leur capacité à dégrader et/ou ne pas dégrader les substrats de la galerie.

Selon les résultats obtenus la majorité des isolats appartiendraient aux genres suivants : *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Enterobacter* et *Ochrobactrum*.

Les résultats de l'Api 20NE (Tableau 16 et 17) montrent que les 9 isolats présentent des réponses semblables pour quelques tests et/ou différentes pour d'autres. La réponse de LnPG1 et LnPF44 est identique pour tous les tests ; les deux isolats fermentent le glucose, hydrolysent la gélatine et possèdent une enzyme arginine dihydrolase et une uréase.

Tous les isolats ont présenté des réactions positives pour liquéfier la gélatine et la présence de l'uréase à l'exception de LnPG2 et LnPF32 qui ont montré des réactions négatives. Aussi la LnPF13 possède l'enzyme uréase et est dépourvue de la capacité de liquéfier la gélatine. Contrairement aux souches de références qui sont dépourvues de ces deux enzymes sauf pour l'*Agrobacterium* qui possède que l'uréase.

La β -galactosidase est présente seulement chez LnPF18 comme les souches de référence *Cupriavidus* et *Agrobacterium*.

La formation d'indole est assurée que par LnPF13, LnPG2 et LnPF46 comme la souche de référence *Burkholderia*.

L'isolat LnPF32 et LnPF46 étaient les seuls isolats qui possèdent la β -glucosidase. Aussi tous les isolats ne réduisent pas les nitrates et même les souches de références.

En ce qui concerne l'assimilation des hydrates de carbones sur l'Api 20NE, le tableau 28 présente les résultats obtenus par les 9 isolats.

La totalité des isolats ont métabolisé le D-glucose, le L-arabinose (à l'exception de la LnPF19), le D-mannose (sauf LnPG1), D-mannitol, le gluconate de potassium, l'acide caprique, acide malique et trisodium citrate.

Par contre les isolats sont incapables de métaboliser le N-acétyl glucosamine, le D-maltose (à l'exception de LnPF13 et LnPF46), acide adipique et l'acide phényl-acétique.

Les trois isolats LnPG2, LnPF18 et LnPF32 sont incapables de métaboliser les composants sur l'Api 20NE, de même pour la souche de référence *Cupriavidus*.

La souche de référence *Burkholderia* est capable uniquement de métaboliser que le D-glucose et l'*Agrobacterium* est la souche de référence qui a métabolisé la majorité des composants à l'exception de l'acide caprique, acide adipique et acide phényl-acétique.

CHAPITRE IV : SOLUBILISATION DES PHOSPHATES INORGANIQUES

1. Résultats

L'étude de la capacité des isolats à solubiliser les phosphates inorganiques a été réalisée avec des tests qualitatifs sur milieu solide et un test quantitatif sur milieu liquide.

1.1. Solubilisation des phosphates sur milieu solide

1.1.1. Solubilisation du phosphate tricalcique sur différents milieux solides

La capacité de tous les isolats à solubiliser le phosphate tricalcique (PTC) a été étudiée initialement sur cinq milieux de culture solide : YEMA, PVK, SP, MNBRI et NBRIP. En essayant de déterminer l'efficacité de la solubilisation du PTC pour chaque milieu de culture, nous avons mesuré les différents diamètres des zones de solubilisation autour des colonies et différentes valeurs ont été enregistrées (Tableau 18). Les résultats mentionnés dans le tableau 16 sont la moyenne de trois essais.

L'ensemble des isolats ont poussé sur le milieu YEMA additionné de PTC et les isolats LnPF3, LnPF12, LnPF14, LnPF20, LnPF23, LnPF25 et LnPG1 ont faiblement solubilisé le PTC.

Le deuxième test de solubilisation est réalisé sur le milieu SP, nous avons observé un halo de solubilisation autour de plusieurs colonies : LnPC2, LnPF4, LnPF5, LnPF8, LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF23, LnPF31, LnPF44, LnPF46, LnPG1 et LnPG2, mais la solubilisation était incomplète et la mesure des diamètres s'est avéré difficile à réaliser.

Cependant sur les trois milieux de culture NBRIP, PVK et MNBRI la solubilisation de phosphate est meilleure par 12, 13 et 16 isolats respectivement. Ces trois milieux ont une composition chimique similaire, ce qui fait que les résultats de la solubilisation de PTC sont similaire aussi, et selon l'analyse de la variance ANOVA ; nous avons constaté qu'il existe une

Tableau 18. Solubilisation des phosphates inorganiques sur milieux solides

Isolats	Diamètres des halos de solubilisation du phosphate (cm)				
	Milieux de culture				
	NBRIP	MNBRI	PVK	YEMA	SP
LnPC2	-	-	-	-	Faible
LnPC4	0.6	-	-	-	-
LnPF1	0.55	-	-	-	-
LnPF3	-	0.9	0.5	Faible	-
LnPF4	-	0.9	-	-	1.1
LnPF5	-	0.3	0.3	-	1.25
LnPF8	-	-	0.2	-	1.05
LnPF12	0.75	0.5	0.8	0.2	-
LnPF13	0.46	0.5	0.7	-	1.2
LnF14	0.7	0.8	0.7	Faible	1.2
LnPF19	0.5	0.5	-	-	1.2
LnPF20	-	0.8	0.6	Faible	-
LnPF22	-	0.2	-	-	-
LnPF23	-	0.5	0.2	Faible	faible
LnPF25	-	0.5	0.7	Faible	-
LnPF30	1.1	-	-	-	-
LnPF31	-	0.6	Faible	-	0.8
LnPF32	0.7	-	-	-	-
LnPF36	0.2	-	-	-	-
LnPF37	-	0.6	0.4	-	-
LnPF44	0.43	0.6	0.4	-	1.8
LnPF46	0.76	-	-	-	0.85
LnPFG1	-	0.2	0.3	0.2	Faible
LnPG2	0.8	0.5	-	-	0.14

- : absence de l'halo de solubilisation

relation significative entre seulement la solubilisation de P sur MNBRI et PVK (Tableau 22) ($P < 0,01$).

Cette relation significative s'explique par le comportement proche des isolats sur ces deux milieux : la majorité des isolats qui ont la capacité à solubiliser le phosphate sur MNBRI peuvent aussi le solubiliser sur PVK et aussi la majorité des isolats qui n'ont pas solubilisé le phosphate sur MNBRI n'ont pas la capacité de le solubiliser sur PVK.

La fig 33 représente la différence de la dimension des halos de solubilisation sur les trois milieux NBRIP, MNBRI et PVK pour chaque isolat.

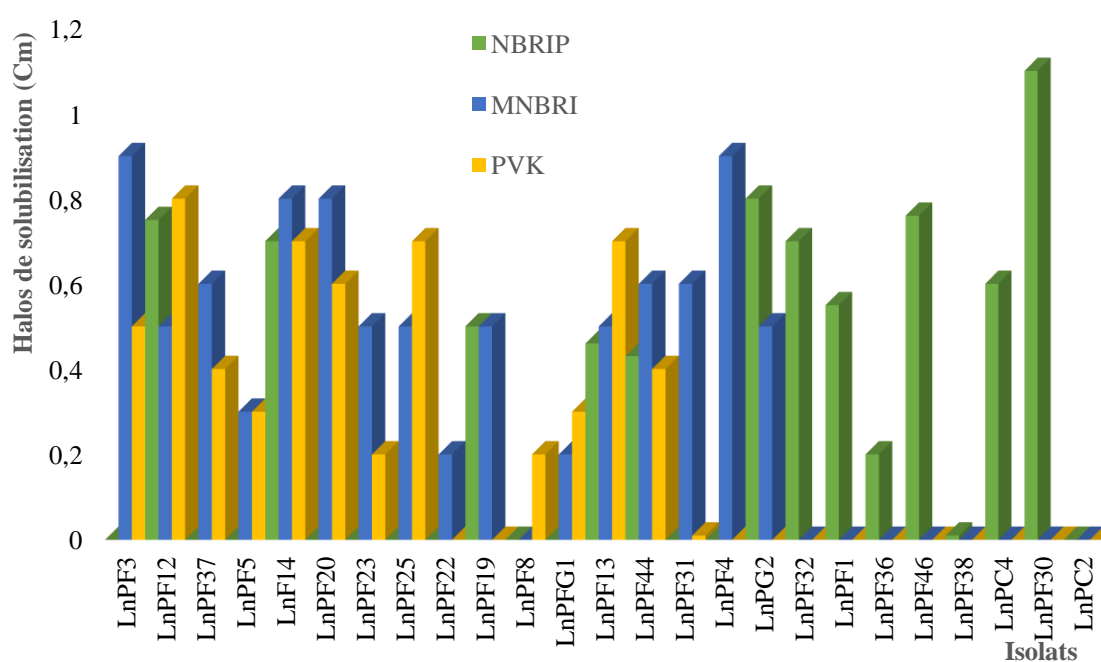


Fig 33. Solubilisation du phosphate tricalcique (PTC) par les isolats sur les milieux MNBRI, NBRIP et PVK

1.1.2. Solubilisation du Phosphate tricalcique, Phosphate monocalcique et Phosphate roche (PR)

Nous avons utilisé trois sources de phosphate inorganique PTC, PMC et PR pour déterminer les différents diamètres de solubilisation autour des colonies pour chacun de ces composants.

Les résultats ont montré que les isolats solubilisent mieux le PMC que le PTC et aucun isolat ne peut solubiliser le PR sur milieu NBRIP solide (Tableau 19). La composition de PTC est plus riche en calcium par rapport au PMC et c'est la raison pour laquelle les isolats ont pu solubiliser le PMC mieux que le PTC. Il n'y a pas de relation significative entre la solubilisation de PTC, de PMC et du PR (Tableau 22).

Tableau 19. Solubilisation de trois formes de phosphates inorganiques par les isolats

Isolats	Diamètres des halos de solubilisation (cm)		
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	CaHPO ₄	PR
LnPC4	0.6	2	-
LnPF1	0.55	0.7	-
LnPF8	-	1.65	-
LnPF12	0.75	0.85	-
LnPF13	0.46	0.5	-
LnPF14	0.7	0.9	-
LnPF18	-	1.6	-
LnPF19	0.5	0.8	-
LnPF23	-	0.2	-
LnPF28	-	Faible	-
LnPF30	1.1	1.2	-
LnPF31	-	0.55	-
LnPF32	0.7	0.6	-
LnPF36	0.2	Faible	-
LnPF44	0.43	1.43	-
LnPF46	0.76	0.73	-
LnPG2	0.8	1.93	-

- : absence de l'halo de solubilisation

1.1.3. Effets de l'extrait de levure, glucose et MgCl₂ sur la solubilisation du phosphate

L'étude de l'effet de la variation de la concentration en extrait de levure, glucose et MgCl₂ sur la solubilisation des phosphates inorganiques en utilisant comme seule source de phosphate

le PMC par les isolats nous permettra de comprendre le comportement de chaque isolat vis-à-vis la concentration de ces trois ingrédients importants dans un milieu de culture pour assurer une bonne solubilisation.

1.1.3.1 Effet de l'ajout de l'extrait de levure

Les résultats de l'effet de l'ajout de l'extrait de levure sont mentionnés sur le tableau 20.

Tableau 20. Effet de l'extrait de levure sur la solubilisation

Activité solubilisatrice	Isolats	Diamètres des halos de solubilisation (cm)	
		NBRIP*	NBRIP**
Amélioration	LnPF5	-	0.6
	LnPF13	0.5	1.25
	LnPF20	-	Faible
	LnPF25	-	0.8
	LnPF36	Faible	1.1
	LnPF46	0.73	1.35
Diminution	LnPC4	2	Faible
	LnPF8	1.65	Faible
	LnPF14	0.9	0.4
	LnPF18	1.6	0.85
	LnPF12	0.85	0.65
	LnPF44	1.43	1
Inhibition	LnPF1	0.7	-
	LnPF19	0.8	-
	LnPF23	0.2	-
	LnPF28	Faible	-
	LnPF30	1.2	-
	LnPF31	0.55	-
	LnPF32	0.6	-
Similaire	LnPG2	1.93	1.9

* : sans extrait de levure, ** : avec 0.1g/l d'extrait de levure

Les résultats montrent que l'activité solubilisatrice varie d'un isolat à un autre en fonction de l'addition de 0.1g/l d'extrait de levure.

Nous avons constaté que l'ajout de l'extrait de levure améliore l'activité solubilisatrice des isolats suivants : LnPF5, LnPF13, LnPF20, LnPF25, LnPF36 et LnPF46.

Par contre la présence de la même concentration d'extrait de levure dans le milieu de culture provoque soit ; la diminution de la solubilisation par les isolats suivants : LnPC4, LnPF8, LnPF14, LnPF18, LnF12 et LnPF44 ; ou même l'inhibition de l'activité solubilisatrice des isolats suivants : LnPF1, LnPF19, LnPF23, LnPF28, LnPF30, LnPF31 et LnPF32.

A l'exception de l'isolat LnPG2 pour lequel la présence ou l'absence de l'extrait de levure n'a pas changé son activité solubilisatrice.

1.1.3.2. Effet de l'augmentation de la concentration de glucose et de MgCl₂

Les résultats du test de l'augmentation de la concentration en glucose et en MgCl₂ respectivement de 10 et 5g/l à 20 et 10g/l sont notés dans le tableau 21.

Nous avons remarqué que les isolats sont répartis en quatre groupes selon l'amélioration ou non de leur activité solubilisatrice en fonction avec l'augmentation de la concentration de glucose et de MgCl₂.

L'amélioration de l'activité solubilisatrice a été observée par les isolats suivants : LnPC4, LnPF1, LnPF5, LnPF8, LnPF12, LnPF14, LnPF23, LnPF30, LnPF37 et LnPG1.

Nous avons aussi constaté que l'augmentation de la concentration de glucose et de MgCl₂ a diminué la solubilisation des phosphates pour les trois isolats LnPF13, LnPF46 et LnPG2. Cette augmentation des concentrations a même provoqué une inhibition de la solubilisation par LnPF20 et LnPF25.

Les isolats LnPF18, LnPF36 et LnPF44 ont gardé presque les mêmes diamètres des halos de solubilisation et donc pas de changement de l'activité solubilisatrice.

Tableau 21. Effets de la variation de l'augmentation de la concentration de glucose et le MgCl₂

Activité solubilisatrice	Isolats	Milieux de culture	
		NBRIP**	MNBRI
Amélioration	LnPC4	Faible	0.25
	LnPF1	-	Faible
	LnPF5	0.6	0.95
	LnPF8	Faible	0.35
	LnPF12	0.65	0.9
	LnPF14	0.4	0.8
	LnPF23	-	0.8
	LnPF30	-	0.8
	LnPF37	-	0.7
	LnPG1	-	0.4
Diminution	LnPF13	1.25	0.6
	LnPF46	1.35	0.85
	LnPG2	1.9	1.15
Inhibition	LnPF20	Faible	-
	LnPF25	0.8	-
Similaire	LnPF18	0.85	0.9
	LnPF36	1.1	1.2
	LnPF44	1	0.95

** : avec extrait de levure

L'analyse de la variance ANOVA a montré une relation significative entre le milieu NBRIP (avec extrait de levure) et MNBRI à $P < 0,005$ (Tableau 22), et donc la solubilisation de CHP par les isolats sur ces deux milieux est presque similaire.

Tableau 22. Test ANOVA de la solubilisation du P inorganique (PTC, PMC, PR) sur milieu solide n valeurs moyennes (cm) est : $DS = DH - DC$

Milieux	P inorganique		
	DH-DC	Degré de liberté	Carré moyen
NBRIP	0.62 ^a	2	0.094
MNBRI	0.55 ^b		
PVK	0.44 ^b		
NBRI(TCP)	0.44 ^c	2	3.69
NBRI(PMC)	0.93 ^d		
NBRI(ARP)	0 ^e		
NBRIP*	0.93 ^f	2	0.38
NBRIP**	0.79 ^g		
MNBRI	0.73 ^g		

DS : diamètre de solubilisation, DH : diamètre de l'halo de dissolution, DC : diamètres des colonies, *: Sans extrait de levure, **: avec extrait de levure (0.1mg/l)

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. Les moyennes suivies par la même lettre sont significatives à $P < 0.01$.

Ces résultats, nous ont permis de poursuivre nos tests sur NBRIP (Fig 34) sans extrait de levure et MNBRI (Fig 35), pour permettre à toutes les catégories d'isolats de solubiliser le PR sur milieu liquide.

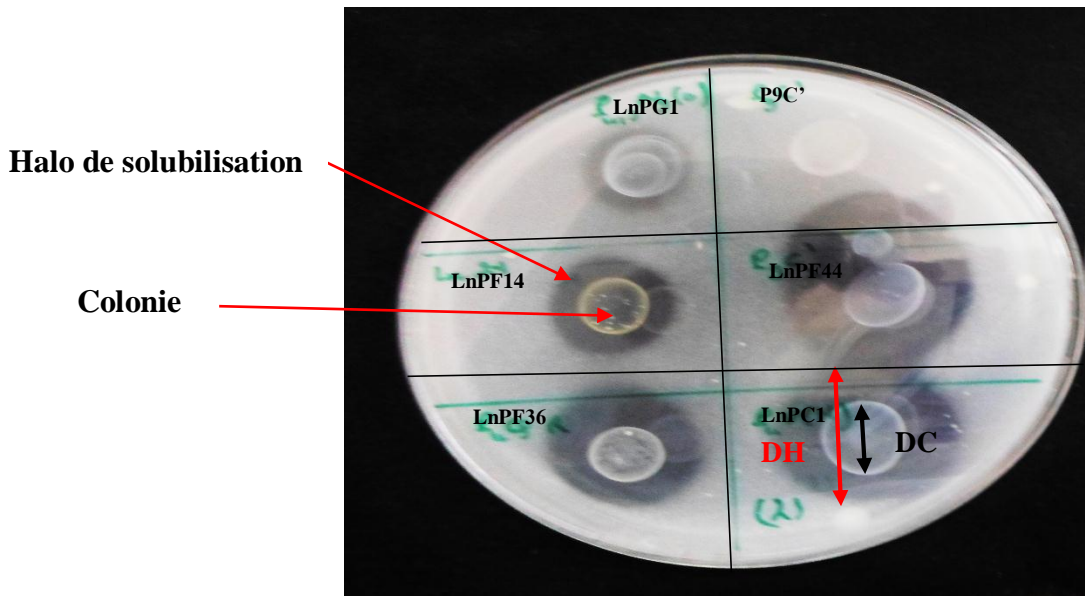
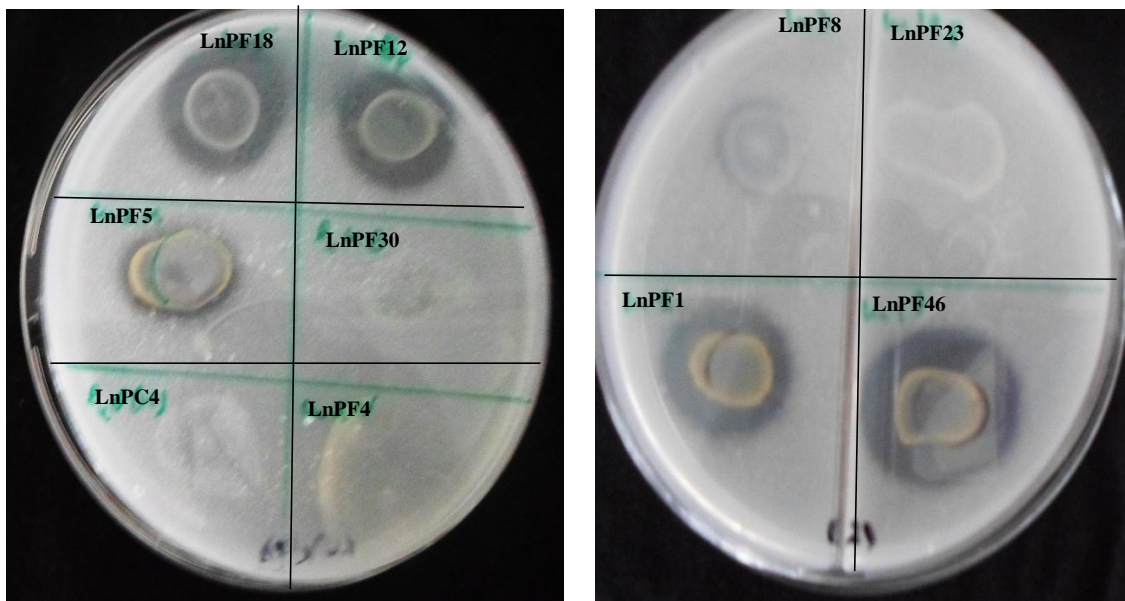


Fig 34. Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu NBRIP. DH : diamètre de l'halo de dissolution, DC : diamètre de la colonie

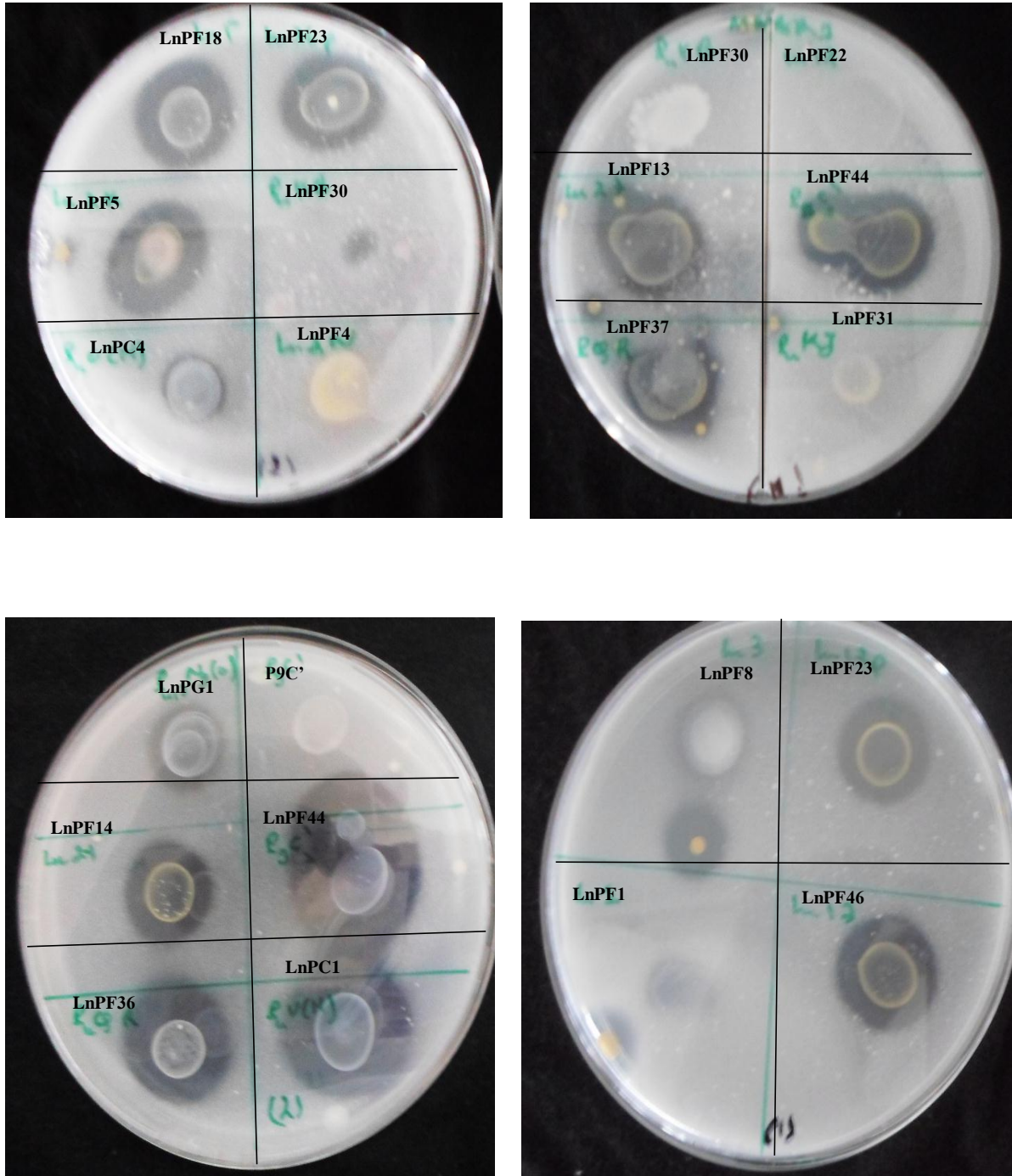


Fig 35. Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu MNBRI

1.2. Solubilisation du phosphate roche (PR) sur milieu liquide

1.2.1. Cinétiques de solubilisation du phosphate

Les résultats des tests de la solubilisation des phosphates inorganiques sur différents milieux de cultures solides, nous ont permis de sélectionner 26 isolats capables de solubiliser les phosphates inorganiques.

Le dosage de phosphate total libéré dans les milieux de cultures liquides est mesuré par l'intensité de la couleur bleu ($\lambda = 820\text{nm}$) qui indique la concentration de phosphate soluble libéré par les isolats après l'ajout du réactif utilisé aux surnageant. La concentration de phosphate soluble libéré dans le milieu a été mesurée en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues de P soluble.

Les résultats obtenus ont montré la capacité de neuf isolats : LnPF18, LnPF46, LnPF13, LnPF14, LnPF44, LnPF19, LnPG1, LnPG2 et LnPF32 à solubiliser le PR sur milieu liquide.

Les concentrations de phosphate libéré sont significativement corrélées ($P < 0,005$). Des courbes ont été tracées pour étudier la cinétique de la libération du phosphate soluble dans le temps (Fig 36, 37, 38 et 39) et l'activité de solubilisation du PR pour tous les isolats testés était significativement ($P < 0,05$) augmentée avec le temps et la plus grande concentration de P solubilisé est atteinte après 162 heures d'incubation.

Les valeurs de phosphate soluble libéré par les isolats sont très proches (Tableau 23), et elles atteignent 206.98 mg/l.

Le phosphate libéré est assimilable par la microflore du sol et les plantes.

1.2.2. Relation entre l'acidification du milieu et la solubilisation des phosphates

La libération de phosphate soluble est accompagnée d'une acidification et une baisse de pH dans les cultures liquides (Fig 36, 37, 38 et 39) comparé au blanc qui garde toujours un pH 7. Cette diminution atteint des valeurs de 3,88 à 3,97 respectivement pour les isolats LnPF46 et LnPG1. Nous supposons que cette acidité du milieu est responsable de la solubilisation du PR et la libération de phosphate soluble dans le milieu de culture et nous pensons que les isolats testés produisent des acides organiques responsables de la diminution du pH.

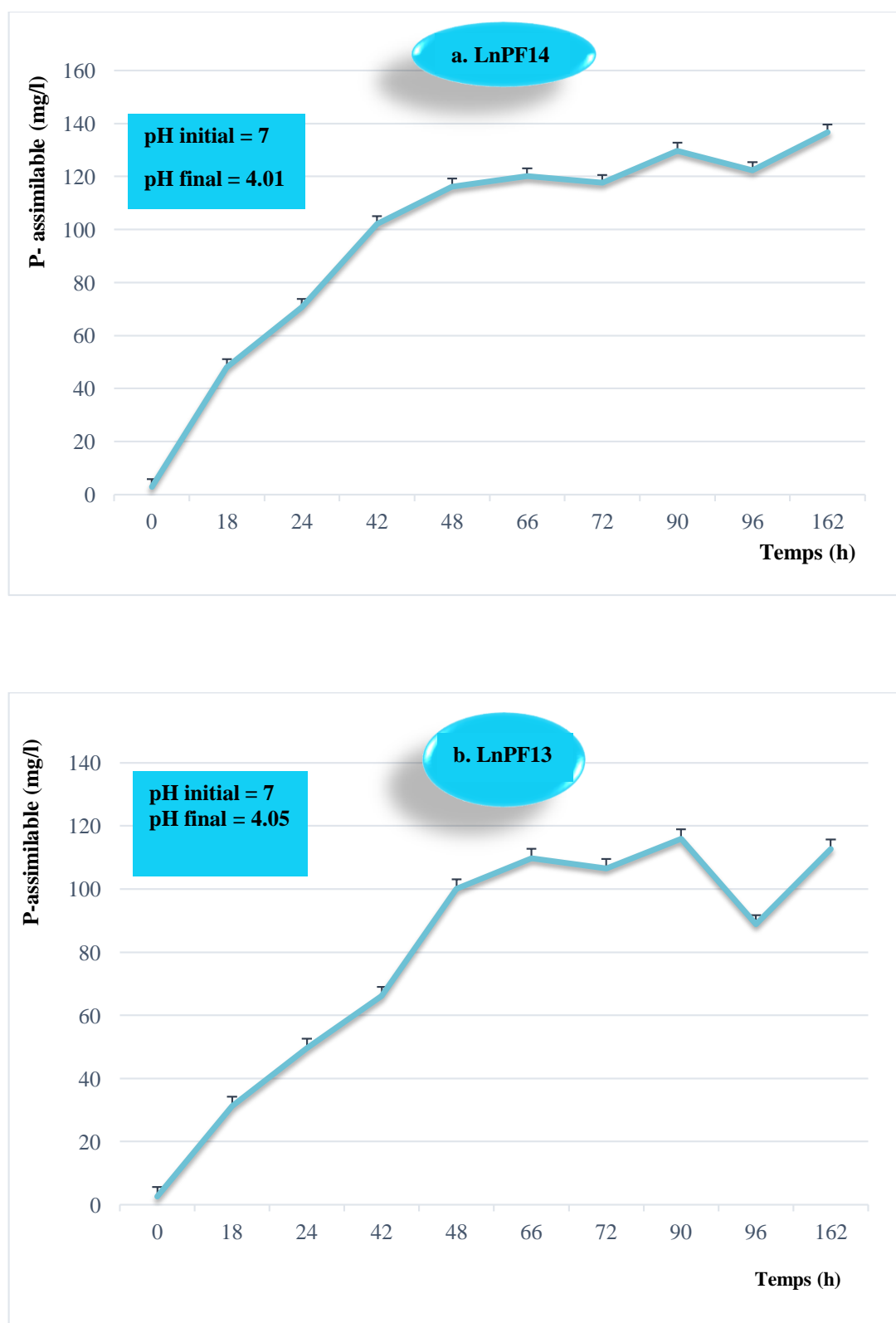


Fig 36. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; **a.** LnPF14 et **b.** LnPF13 (isolats à solubilisation rapide)

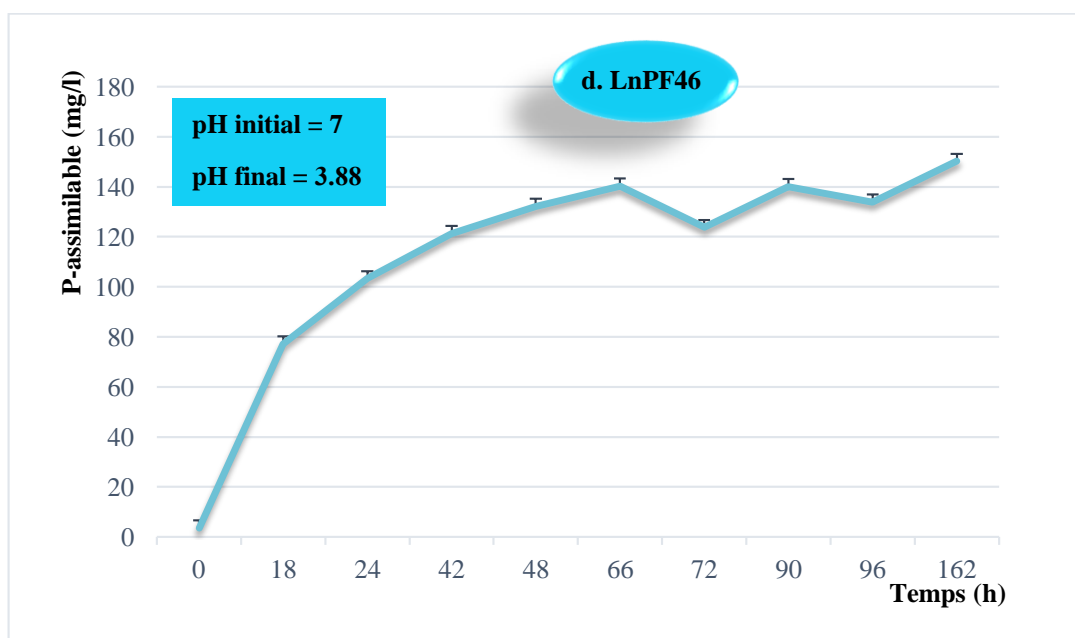
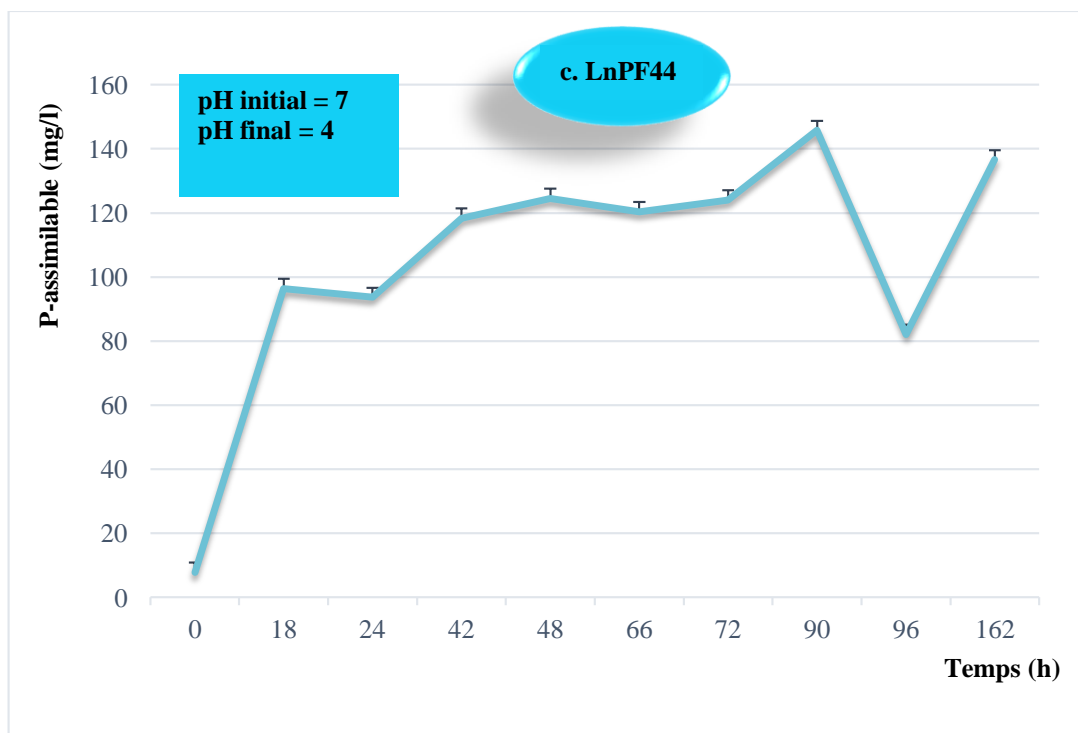


Fig 37. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; **c.** LnPF44 et **d.** LnPF46 (Isolats à solubilisation rapide)

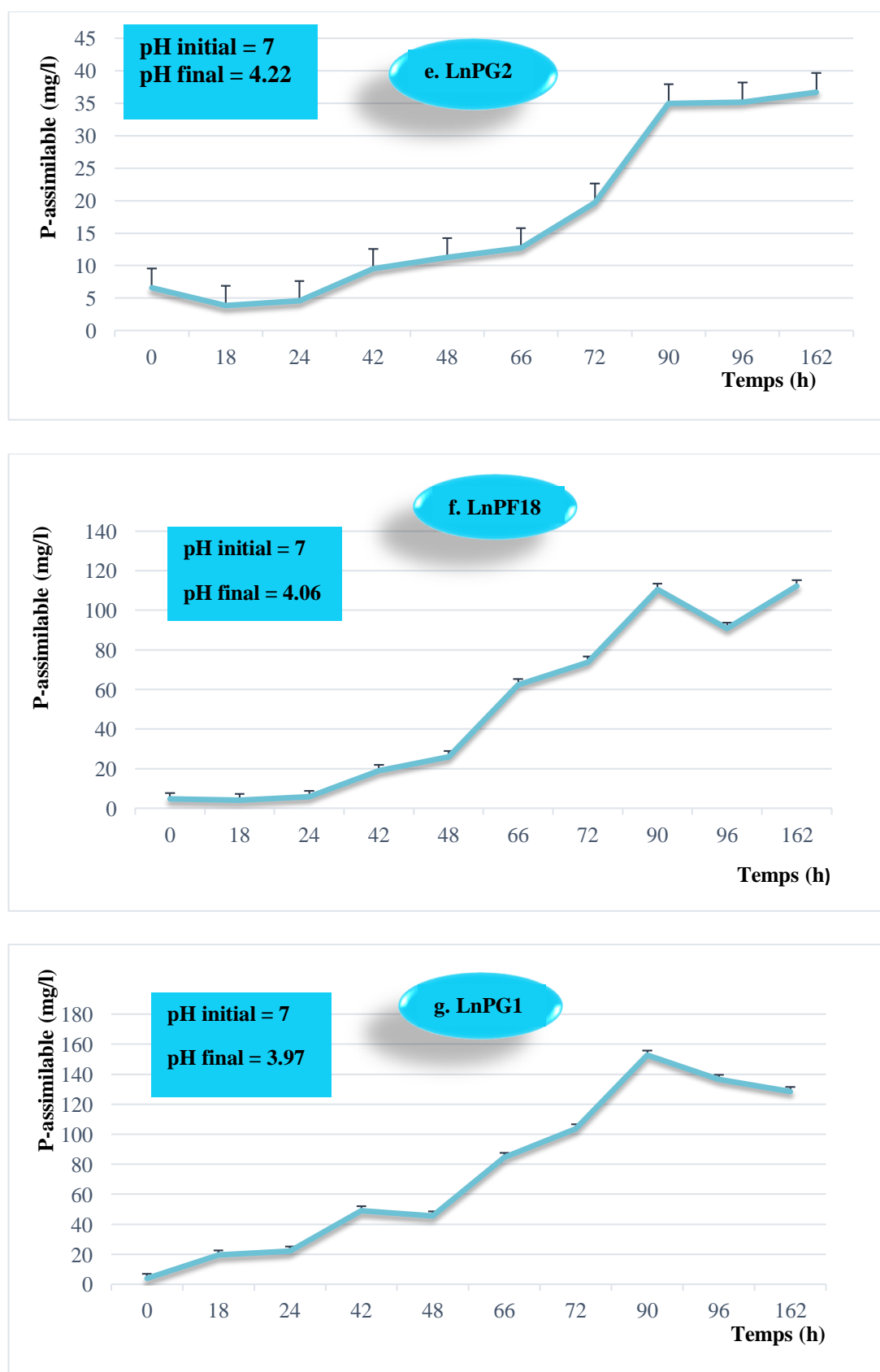


Fig 38. Cinétiques de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; e. LnPG2, f. et LnPF18 et g. LnPG1 (Isolats à solubilisation moyenne)

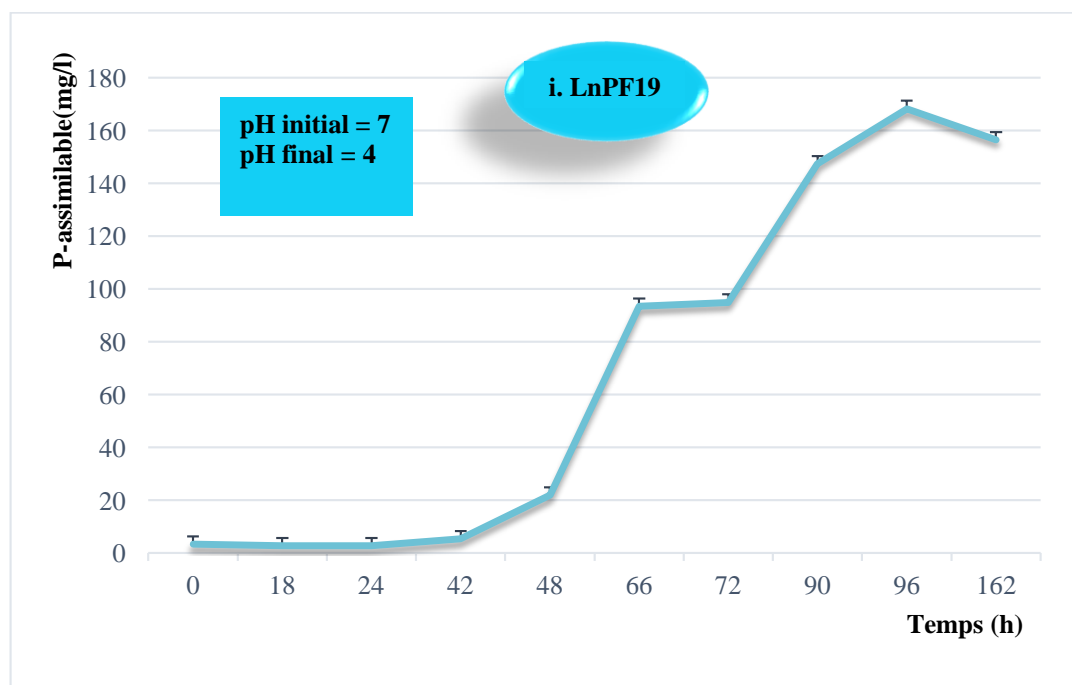
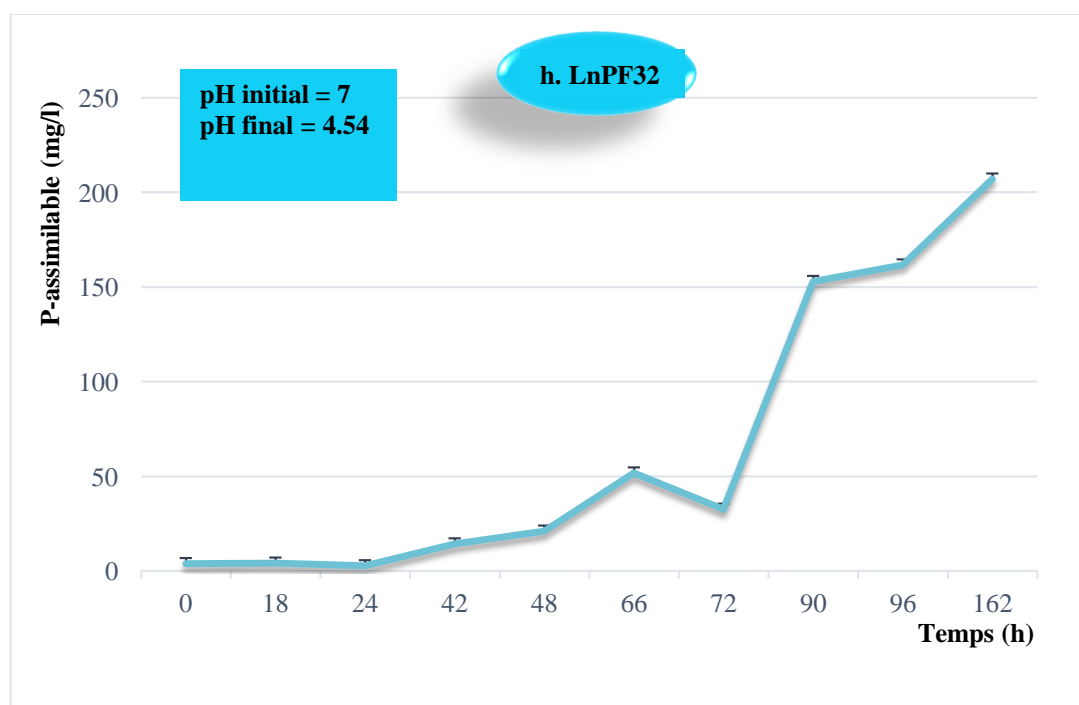


Fig 39. Cinétique de la solubilisation du phosphate roche des isolats ; **h.** LnPF32 et **i.** LnPF19.
(Isolats à solubilisation lente)

Nous avons classé les neuf isolats qui ont la capacité à solubiliser le PR sur milieu liquide selon leur concentration de phosphate solubilisé et libéré dans le milieu en trois classe : bonne solubilisation (entre 150 à 200 mg/l de P), moyenne solubilisation (entre 100 à 140 mg/l de P) et faible (<100 mg/l de P).

Tableau 23. Concentrations de P libéré dans le milieu de culture liquide en fonction du temps

	Isolats	P libéré (mg/l)	Temps (heures)
Bonne solubilisation	LnPF32	206.98	162
	LnPF19	168.23	96
	LnPG1	152.69	90
	LnPF46	150.22	162
Moyenne solubilisation	LnPF44	145.77	90
	LnPF14	136.64	162
	LnPF13	115.91	90
	LnPF18	112.21	162
Faible solubilisation	LnPG2	36.69	162

L'isolat le plus performant de la solubilisation du PR est LnPF32 qui solubilise jusqu'à 206,98mg de P /l et l'isolat le moins performant est LnPG2 avec une valeur de 36.69mg de P/l.

2. Discussion

L'ensemble des isolats obtenus à partir des nodules de *Lathyrus ochrus* sont testés pour leur capacité à solubiliser les phosphates inorganiques, en utilisant plusieurs milieux solides ; cette méthode peut être considérée comme généralement fiable pour l'isolement et la caractérisation préliminaire de bactéries solubilisatrices de phosphate (BSP) (Rodriguez et Fraga, 1999).

De nombreuses espèces de rhizobactéries, y compris les bacilles, *Pseudomonas* et les rhizobiums peuvent solubiliser les phosphates insolubles dans le test d'agar in vitro (Islam et al, 2007, Thakuria et al, 2004).

Cependant, les résultats du test de solubilisation du phosphate sur le milieu YEMA indiquent que le mannitol n'est pas une bonne source de carbone pour les études de mobilisation du phosphate (Alikhani et al, 2006), ce qui explique que la solubilisation des phosphates soit grandement affectée par la source de carbone utilisée et généralement la plus grande solubilisation du phosphate de calcium a été observé en utilisant le glucose comme source de carbone (Silva Filho et Vidor, 2000).

Le milieu SP a montré une bonne solubilisation mais qui était incomplète, ce qui explique que les isolats LnPC2, LnPF4, LnPF5, LnPF8, LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF23, LnPF31, LnPF44, LnPF46, LnPG1 et LnPG2 ; n'ont pas pu solubiliser tout le phosphate.

La meilleure solubilisation de phosphate est déterminée sur les milieux NBRIP, PVK et MNBRI avec un nombre d'isolats respectivement 12, 13 et 16. Nous avons démontré une similarité qui existe dans les résultats de la solubilisation de PTC sur les deux milieux MNBRI et PVK, donc nous avons choisis le milieu MNBRI en raison de sa composition plus simple que le milieu PVK.

La solubilisation de phosphate est également affectée par l'ajout de l'extrait de levure et l'augmentation des concentrations de glucose et de $MgCl_2$; les isolats ont montré des comportements différents vis-à-vis ces variations de concentrations.

Nous avons noté que les variations de la concentration de l'extrait de levure, de glucose et $MgCl_2$ ont soit amélioré la solubilisation du phosphate, soit la diminuée voir même l'inhibée pour certains isolats. Nous avons constaté que les isolats LnPF5, LnPF20, LnPF25 et LnPF37 exigent l'extrait de levure pour la solubilisation de phosphate. Par contre la présence de l'extrait de levure ne permet pas la solubilisation du phosphate par les isolats suivants : LnPF19, LnPF28, LnPF31 et LnPF32 ; ce qui est confirmé par Nautiyal (1999) qui a démontré qu'une concentration supérieure à 0,5g/l d'extrait de levure peut inhiber la solubilisation du phosphate ; alors que nous avons montré que la solubilisation de phosphate est inhibée avec même 0,1g/l d'extrait de levure pour certains isolats.

Nous avons noté aussi qu'il existe un autre groupe d'isolats pour lesquels la présence d'extrait de levure inhibe son activité solubilisatrice mais l'augmentation de la concentration de glucose et de $MgCl_2$ avec l'addition de l'extrait de levure favorise la solubilisation et les isolats supportent ainsi la présence d'extrait de levure qui sont : LnPF1, LnPF23, LnPF30.

En ce qui concerne LnPF37 et LnPG1 la solubilisation n'est achevée qu'en présence d'extrait de levure avec augmentation des concentrations de glucose et de $MgCl_2$. Nautyial (1999) a montré que les concentrations de glucose et de $MgCl_2$ jouent un rôle important dans la capacité de solubilisation du phosphate et il a trouvé que l'activité maximale de solubilisation du phosphate a été obtenue lorsqu'il a utilisé 20 et 10g/l de glucose et de $MgCl_2$ respectivement.

Le test de comparaison ANOVA est utilisé pour comparer les résultats de la solubilisation de phosphate sur NBRIP (sans extrait de levure), NBRIP (avec extrait de levure) et le MNBRI (avec extrait de levure) et nous avons sélectionné les milieux MNBRI et NBRIP sans extrait de levure pour effectuer les autres tests de solubilisation.

Les résultats de la solubilisation des phosphates sur les différents milieux solides utilisés nous ont permis de sélectionner un total de 26 isolats qui solubilisent le phosphate inorganique. Ces isolats sont par contre incapables de solubiliser le PR sur milieu solide.

Les phosphates de roches ont été considérés comme une source alternative intéressante pour les engrais à base de phosphate soluble (Xiao et al, 2013). Des efforts de recherche sont en cours pour manipuler les roches et les convertir en produits à valeur ajoutée en utilisant surtout des microorganismes solubilisant le phosphate (Vassilev et al, 2006) et dans ce but nous avons poursuivi nos tests de solubilisation sur milieux liquides en utilisant comme seule source de phosphate le PR.

Le test de solubilisation de PR est réalisé sur milieux NBRIP et MNBRI liquides et les résultats ont permis de sélectionner neuf isolats : LnPF18, LnPF46, LnPF13, LnPF14, LnPF44, LnPF19, LnPG1, LnPG2 et LnPF32. Les deux groupes d'isolat G1 (LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF44, LnPF46, LnPG1) et G2 (LnPG2, LnPF18 et LnPF32) ont libéré une concentration moyenne de 136,84 et 118,62 respectivement de phosphate. Ces quantités étaient significativement corrélées ($P < 0,005$). L'activité solubilisatrice du PR par l'ensemble des isolats testés était significativement ($P < 0,05$) augmentée avec le temps, et la concentration la

plus élevée de phosphate solubilisée est atteinte après 90 heures pour G1 et 162 heures pour G2.

La concentration de phosphate libéré est 206.98mg/l par l'isolat LnPF32, les autres isolats libèrent des concentrations de phosphate qui varie de 112.21 jusqu'à 168.23mg/l et l'activité solubilisatrice la moins faible effectuée par l'isolat LnPG2 ; 36.69 mg/l. Ces concentrations de phosphate libérées sont très importantes et donc les isolats sont performants pour la solubilisation du PR. Kshetril et al (2017) ont trouvé que la concentration maximale de phosphate solubilisé est de 81.6µg/l à 1% de PR et 72.2µg/l à 0.5% de PR par la souche *Klebsiella pneumoniae* (S4C10) ; ce qui est très faible par rapport aux résultats que nous avons obtenus. Aussi Gomes et al (2014) ont montré que les souches *Burkholderia cepacia* (CMSB58), *Burkholderia sp* (CMSB48) et *Burkholderia sp* (CMSB82) isolées à partir de la rhizosphère de maïs sont capable de solubiliser le PR provenant de PR mine de Brésil à des valeurs de 153.11, 135.58 et 132.88 mg/l respectivement. Les souches de *Rhizobium leguminosarum bv viciae* (TAL1236) et *Rhizobium meliloti* solubilisent 192 et 225mg/l respectivement en utilisant comme seule source d'azote le NH₄Cl, par contre toutes les souches de *Bradyrhizobium* ont solubilisé de faibles concentrations de phosphate de 0 à 13mg/l (Abdallah, 1994).

La libération de phosphate disponible et donc assimilable a conduit à une acidification des milieux liquides avec une diminution des valeurs de pH. Cette relation inverse observée entre le pH et la concentration de phosphate soluble nous oriente vers l'hypothèse que les isolats ont la capacité à produire des acides organiques.

Certaines rhizobactéries ont la capacité de produire des acides organiques qui jouent un rôle important dans l'acidification du milieu facilitant la solubilisation du phosphate par les PSB (Halder et al, 1990, Chen et al, 2006), comme le gluconate, l'oxalate, citrate, acétate, lactate, tartrate, succinate, céto gluconate et glycolate (Baig et al, 2010 ; Walpola et Yoon, 2013).

Les deux groupes d'isolats ont une forte corrélation inverse (G1 : $P \leq 0,001$, G2 : $P < 0,05$) (G1 : $r = -0,8$, G2 : $r = -0,7$) entre le pH des cultures et leur teneur en phosphate soluble, c'est-à-dire que l'augmentation de la libération de phosphate dans le milieu est suivi par la diminution du pH ce qui est confirmé par Hameeda et al (2006) que la libération de phosphate soluble par les microorganismes implique généralement la production d'acides organiques et une diminution du pH du milieu.

Les isolats ne peuvent pas solubiliser le PR sur milieu solide par contre nous avons sélectionné neuf isolats qui ont la capacité à solubiliser le PR sur milieu liquide. Le PR a une composition très riche et très complexe ce qui rend sa solubilisation une procédure très difficile pour les isolats. En plus sur milieu liquide le PR est en contact permanent avec les isolats alors que sur milieu solide le PR ainsi que les autres ingrédients du milieu sont solidifiés ce qui peut empêcher la solubilisation.

CHAPITRE V : NODULATION DES ISOLATS SOLUBILISATEUR DE PHOSPHATE

1. Présentation des résultats

Les essais de nodulation sont réalisés afin d'évaluer la capacité symbiotique des isolats qui est déterminée par deux paramètres : l'infectivité et l'efficacité.

L'infectivité de chaque isolat est démontrée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante ; ce qui confirme ou non la présence des gènes *nod* dans le génome des isolats (Masson-Boivin et al, 2006).

L'efficacité est estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plants inoculés ; ce qui montre ou non la présence des gènes *nif* (nitrogénase) et *fix* qui sont impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Masson-Boivin et al, 2006).

Le test de nodulation est mené dans des pots en plastique remplis de sable stérile pour permettre un bon développement du système racinaire de la plante hôte.

Nous avons rencontré une grande difficulté pour réussir la germination, les graines de la plante hôte ont un tégument très dur avec un taux de germination très faible en utilisant la méthode classique de germination (désinfection des nodules, les laisser tremper pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile et enfin les mettre à l'obscurité dans des boîtes vides ou remplis par l'eau d'agar).

Nous avons modifié la technique de germination en adoptant le protocole décrit par Brunet et al (2008) et l'utilisation du milieu de Murashige et Skoog ont permis d'avoir un taux de germination élevé (Fig 40).



Fig 40. Germination des graines de *Lathyrus ochrus* sur milieu Murashige et Skoog

Après 6 à 8 semaines de croissance (Fig 41), les plants sont déterrés et les racines sont rincées pour éliminer le sable qui reste autour des racines.



Fig 41. Essais de nodulation de *Lathyrus ochrus* in vitro

L'observation du système racinaire des plants inoculés par les isolats montre que la majorité des isolats 57% ont induit des nodules qui sont localisés dans la racine principale et les racines secondaires, de couleur blanche et de forme déterminée (Fig 42).

Les plants avaient une partie aérienne bien développée avec des racines ramifiées et un nombre de nodules qui varie de 4 à 26 nodules/plant (Fig 42).

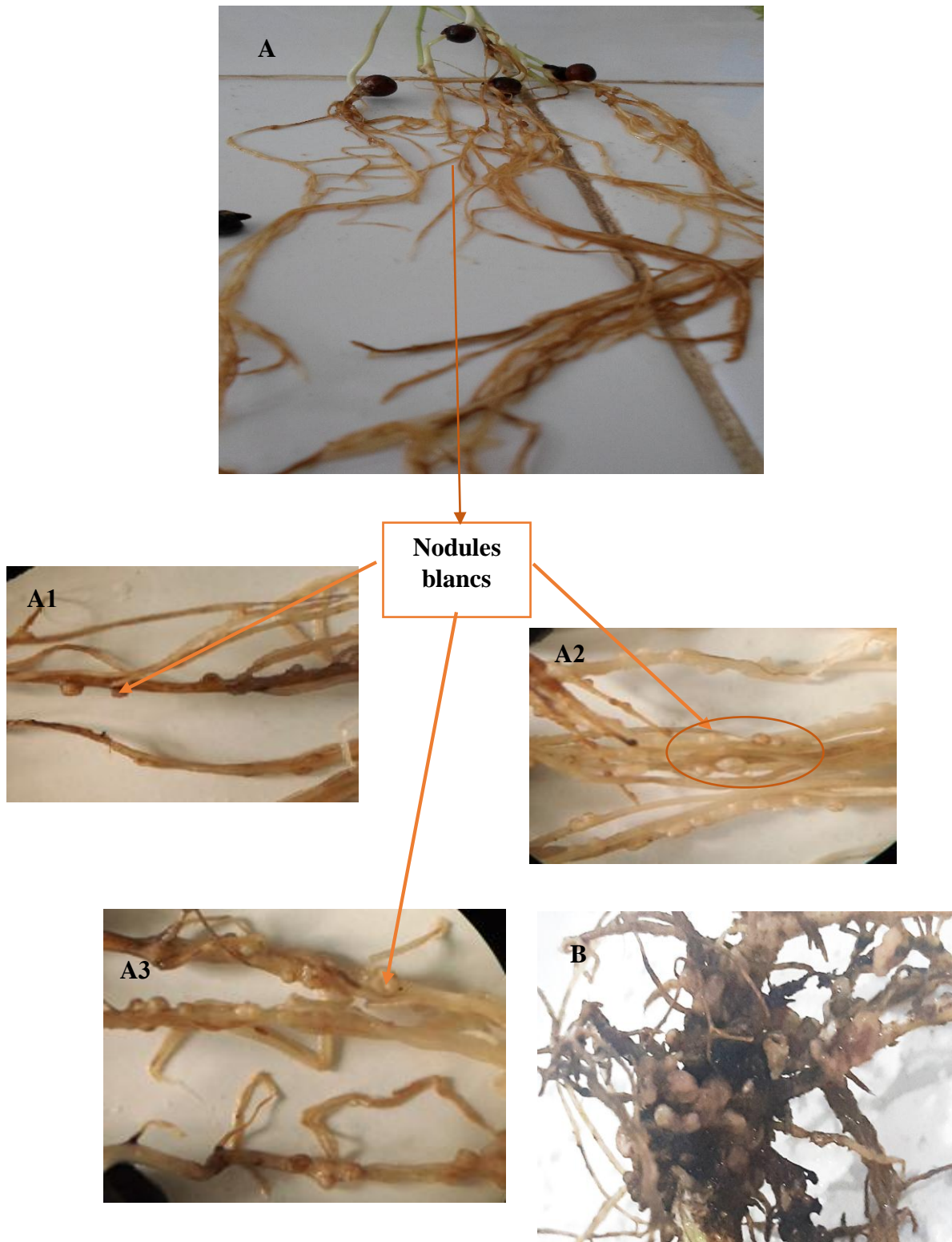


Fig 42. Photos des nodules formées sur les racines de *Lathyrus ochrus* ; **A.** à partir du test de nodulation et **B.** à partir du site de Sidi Amar

La Figure (43) résume les résultats des essais de nodulation pour l'ensemble des isolats, cette figure présente la relation entre le nombre de nodules formés par chaque isolat et la matière sèche (poids sec des parties aériennes des plants nodulés).

Nous avons observé que la matière sèche augmente proportionnellement avec le nombre de nodules formés, ce qui explique que ces rhizobactéries ont pu développer la partie aérienne de *Lathyrus ochrus* et améliorer ainsi sa croissance.

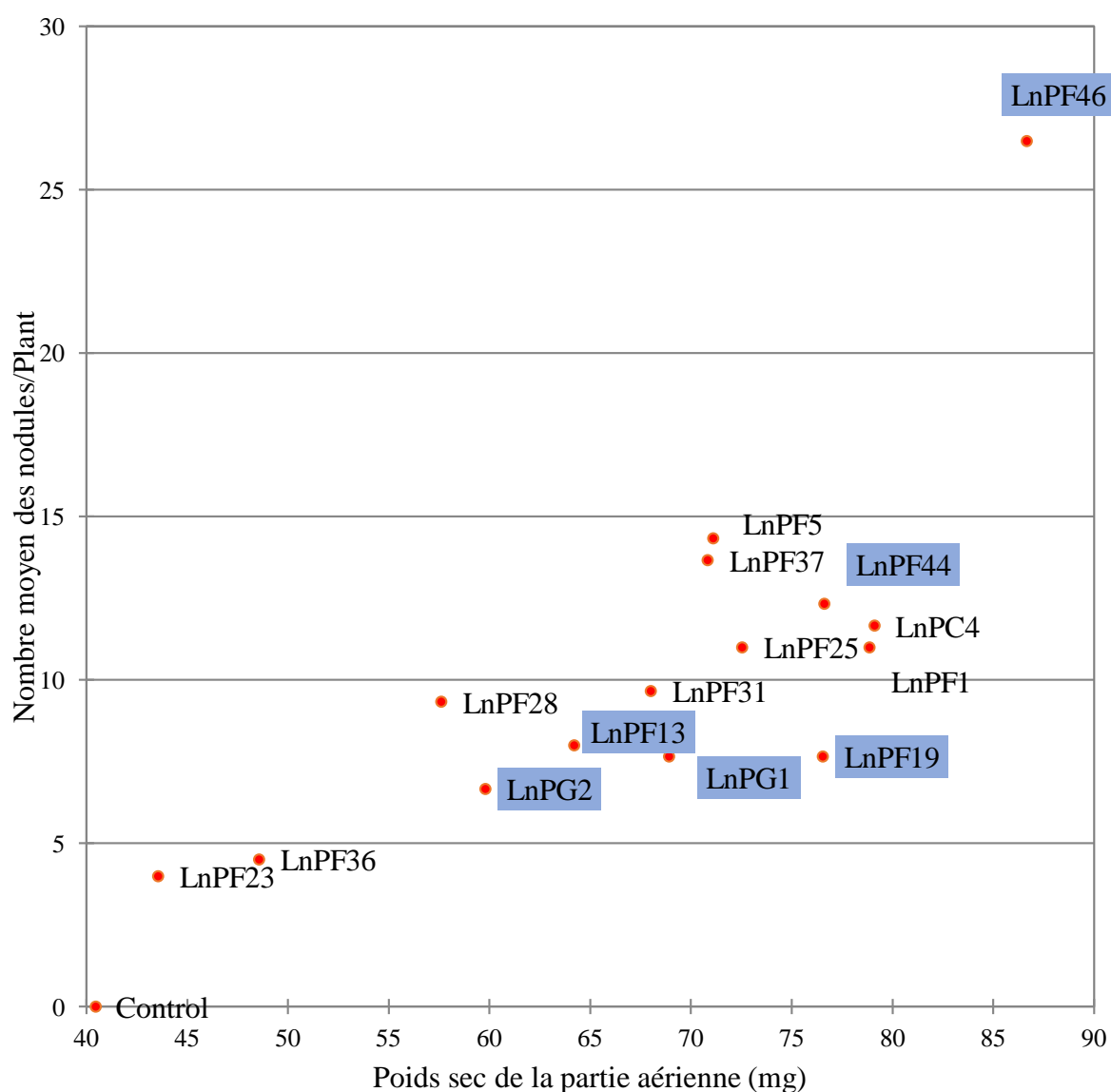


Fig 43. Représentation graphique du poids sec en fonction du nombre de nodules

2. Discussion

La majorité des isolats (57%) ont la capacité d'infecter leur plante hôte (*L. ochrus*) avec un nombre de nodules qui varie entre 4 à 26 nodules /plant.

Les résultats du nombre de nodules formés par les isolats en fonction du gain en poids de la matière végétale, nous ont permis de répartir les isolats en trois groupes :

➔ Premier groupe : inclut l'isolat LnPF46 qui a la capacité d'induire 26 nodules/plant générant ainsi une quantité importante de la matière végétale, ce qui le place comme étant l'isolat le plus performant.

➔ Deuxième groupe : regroupe les isolats LnPF5, LnPF37, LnPF44, LnPC4, LnPF25, LnPF1, LnPF31, LnPF28, LnPF13, LnPF19, LnPG1 et LnPG2 avec un nombre de nodules qui varie entre 14 à 6 nodules/plant et une quantité moyennement importante de la partie végétale.

➔ Troisième groupe : comprend LnPF36 et LnPF23 avec 4 nodules/plant et une partie végétale faible.

L'isolat LnPF46 a montré sa capacité importante à induire des nodules dans le *Lathyrus ochrus* et produire une matière végétale importante, en plus de sa capacité remarquable à acidifier le milieu de culture liquide dans le test de solubilisation du PR. L'isolat LnPF46 a diminué la valeur de pH jusqu'à 3.88 et c'était la valeur la plus basse ce qui a permis de libérer 150.22mg/l de phosphate.

Les autres isolats solubilisateurs du PR ont induit aussi des nodules selon l'ordre croissant suivant : LnPF44 >LnPF13> LnPF19, LnPG1> LnPFG2. A l'exception des isolats LnPF14, LnPF18 et LnPF32 qui n'ont pas induit la formation de nodules dans les racines de la plante hôte.

L'ensemble des isolats ont induit des nodules de couleur blanche chez le *Lathyrus ochrus*. La couleur blanche des nodules indique le début de formation de nodules (jeunes nodules) en cours de devenir actifs ou inactifs (Pommeresche et Hansen, 2017). Aussi elle peut se traduire par l'incapacité des isolats à fixer l'azote (Ishizawa et Toyoda, 1955), mais l'augmentation proportionnelle du poids sec des plants en fonctions du nombre de nodules formés nous a poussé à s'orienter vers d'autres hypothèses :

➔ Soit ces rhizobactéries fixent une faible quantité d'azote, ce qui n'a pas permis d'observer l'apparition de la couleur rouge au sein des nodules ce qui est confirmé par Tajma et al (2007) qui ont expliqué que les petits nodules présentent des zones infectées en blanc ; ont une activité fixatrice moins faible par rapport aux nodules présentant une zone d'infection de couleur rouge.

➔ Soit que les rhizobactéries ont développé d'autres mécanismes pour améliorer la croissance des plantes.

➔ Cette couleur blanche peut être due aussi à la pollution métallique, surtout que nous avons ajouté une concentration considérable du minerai de fer dans le sol utilisé pour le piégeage et aussi dans le milieu de culture utilisé pour l'isolement.

Les nodules ont une forme déterminée ; en les comparants avec les nodules de la plante hôte à l'état naturel (Fig 42), nous pouvons observer une grande différence de formes et de taille entre les deux types de nodules.

Les nodules de la légumineuse *Lathyrus ochrus* à l'état naturel sont de grande taille avec une forme qui varie entre déterminée et indéterminée. Nous pensons donc qu'il y'a des rhizobactéries qui induisent des nodules de forme déterminée et d'autres induisent des nodules de forme indéterminée.

CHAPITRE VI : ETUDE DE LA TOLERANCE DES ISOLATS AUX STRESS METALLIQUE ET SALIN

1. Résultats

1.1. Résistance aux métaux lourds

Le test de la résistance des isolats à différentes concentrations de métaux lourds a montré la capacité des isolats à résister à plusieurs métaux lourds.

1.1.1. Résistance des isolats au Zinc (Zn^{++})

Nous avons utilisé des concentrations très élevées de Zn^{++} et nous avons noté la résistance des isolats LnPF44, LnPG2 et LnPG1 jusqu'à 32mM ; l'isolat LnPF23 a résisté jusqu'à 16mM et finalement les deux isolats LnPF36 et Ln5 jusqu'à 12mM (Fig 44).

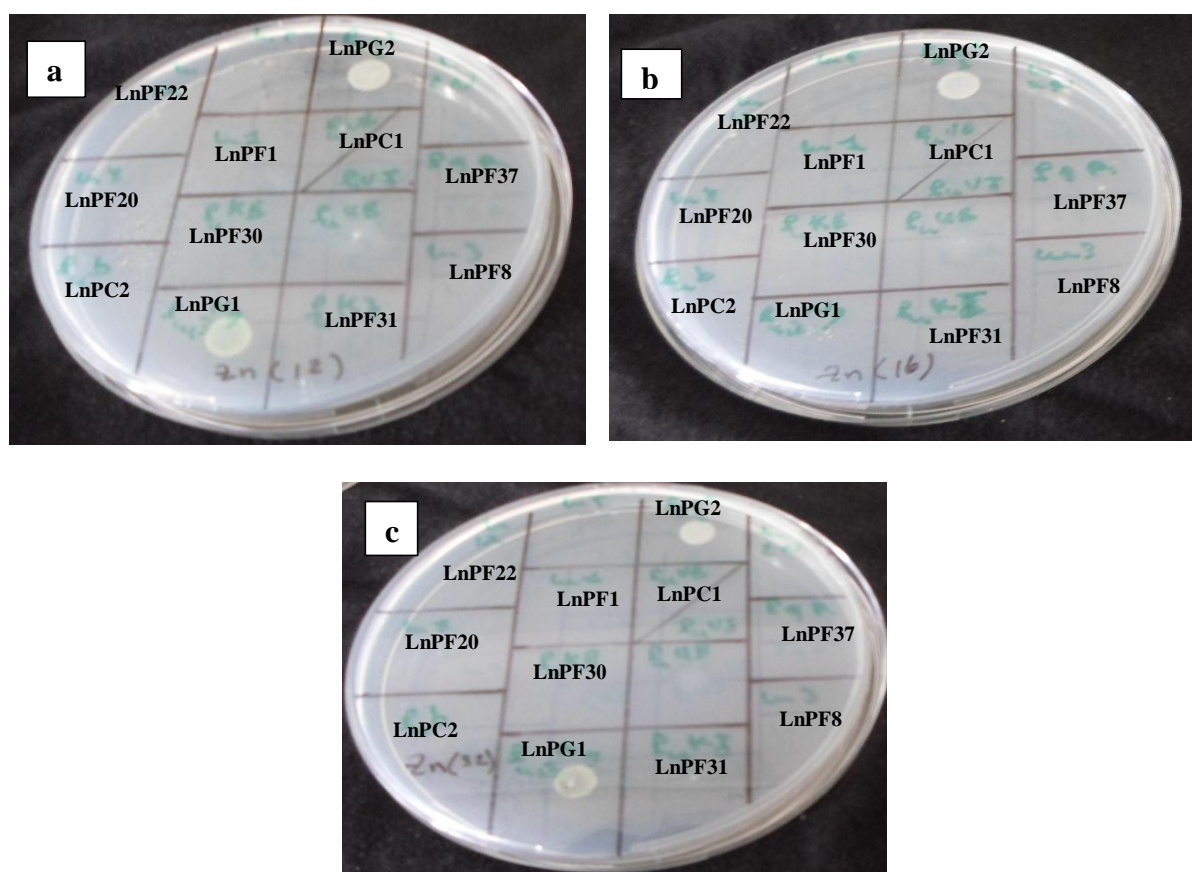


Fig 44. Résistance des isolats LnPG1 et LnPG2 au Zn^{++} ; a. 12mM, b. 16mM, c.32mM

La croissance des isolats a fortement diminué en présence du Zn, seuls LnPG1 et LnPG2 ont gardé une très bonne croissance jusqu'à 32mM.

Nous avons représenté la CMT (concentration maximale de tolérance) de chaque isolat pour chaque concentration de Zn^{++} dans l'histogramme ci-dessous (Fig 45).

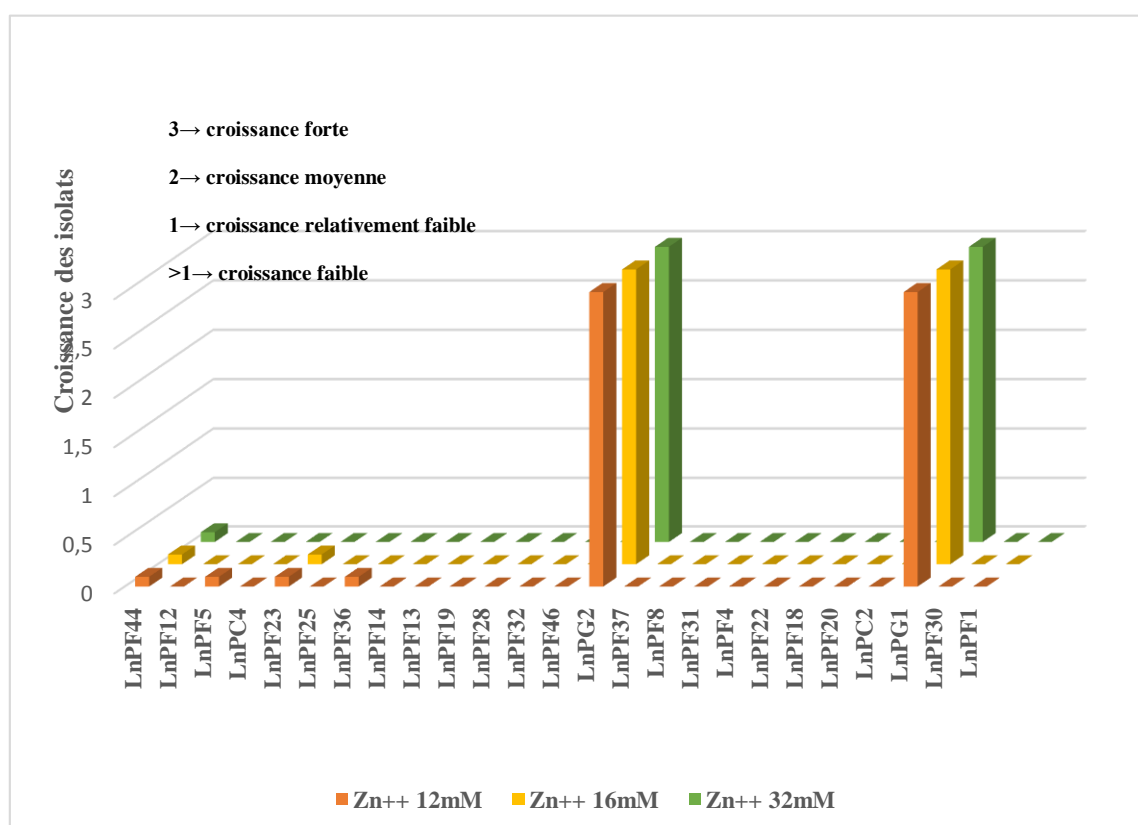


Fig 45. Résistance des isolats au Zn^{++} sur milieu solide

1.1.2. Résistance des isolats au Cuivre (Cu^{++})

Les résultats de la résistance des isolats au Cu^{++} montre que 42.3% des isolats testés ont résisté au Cu^{++} ; LnPF44, LnPF5, LnPC4, LnPF23, LnPF25, LnPG2, LnPF37, LnPF4, LnPF22, LnPG1 et LnPF1. Parmi ces isolats LnPF44, LnPF23, LnPF25 LnPG2 ont résisté jusqu'à 2.5mM (Fig 46). L'histogramme (Fig 47) représente la CMT de chaque isolat résistant pour chaque concentration de métal.

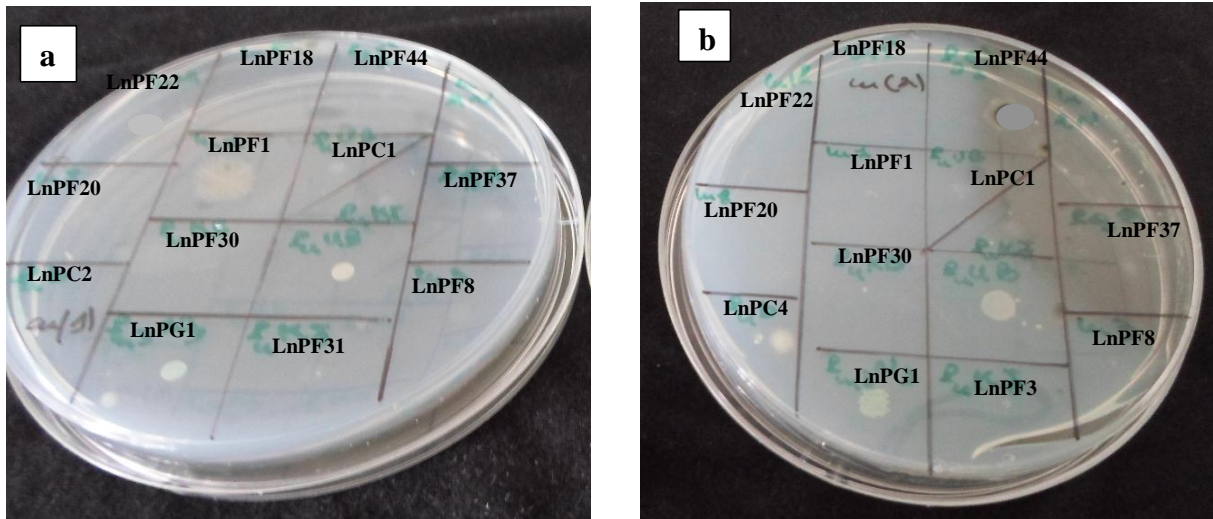


Fig 46. Résistance des isolats au Cu⁺⁺ ; a. 1mM, b. 2mM

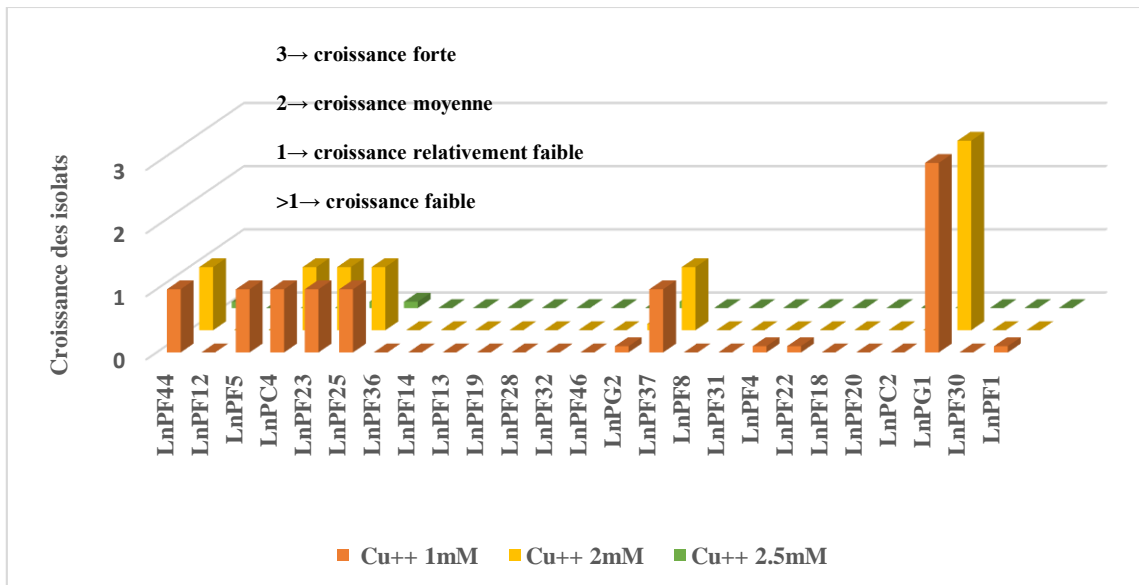


Fig 47. Résistance des isolats au Cu⁺⁺ sur milieu solide

1.1.3. Résistance des isolats au Cadmium (Cd⁺⁺)

Nous avons noté la résistance de cinq isolats au Cd⁺⁺ LnPF5, LnPF23, LnPF25 et LnPG2 ont résisté jusqu'à 2.5mM et seul l'isolat LnPG1 a résisté que à 0.8mM (Fig 48). Les résultats de la résistance des isolats sont représentés sur l'histogramme (Fig 49), en mentionnant la CMT de chaque isolat.

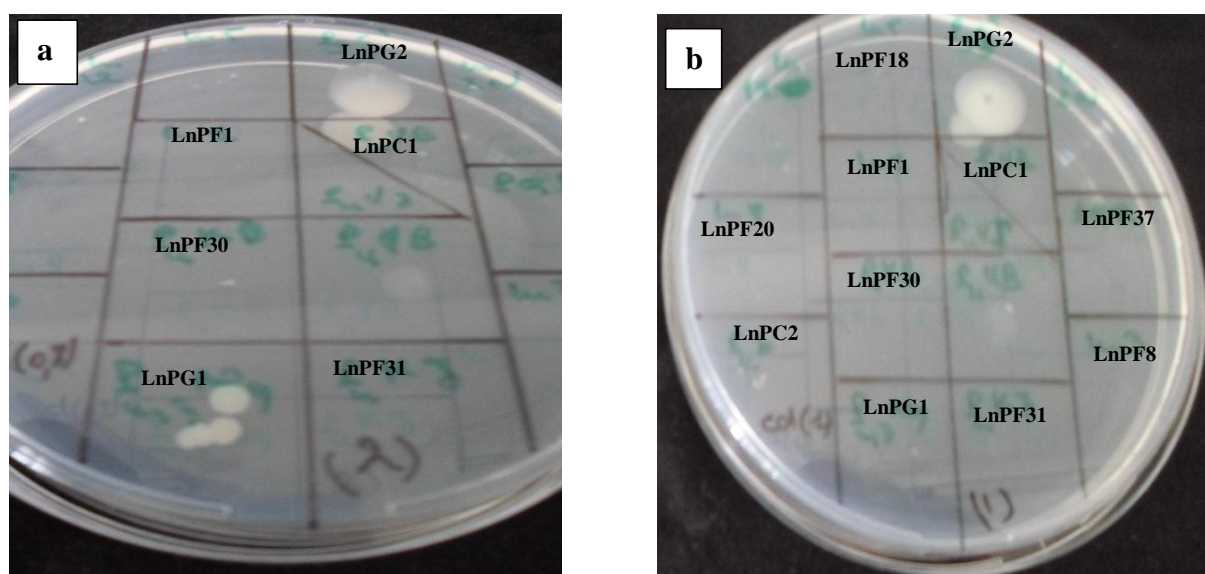


Fig 48. Résistance des isolats au Cd⁺⁺ ; a. 0.8mM et b. 1mM

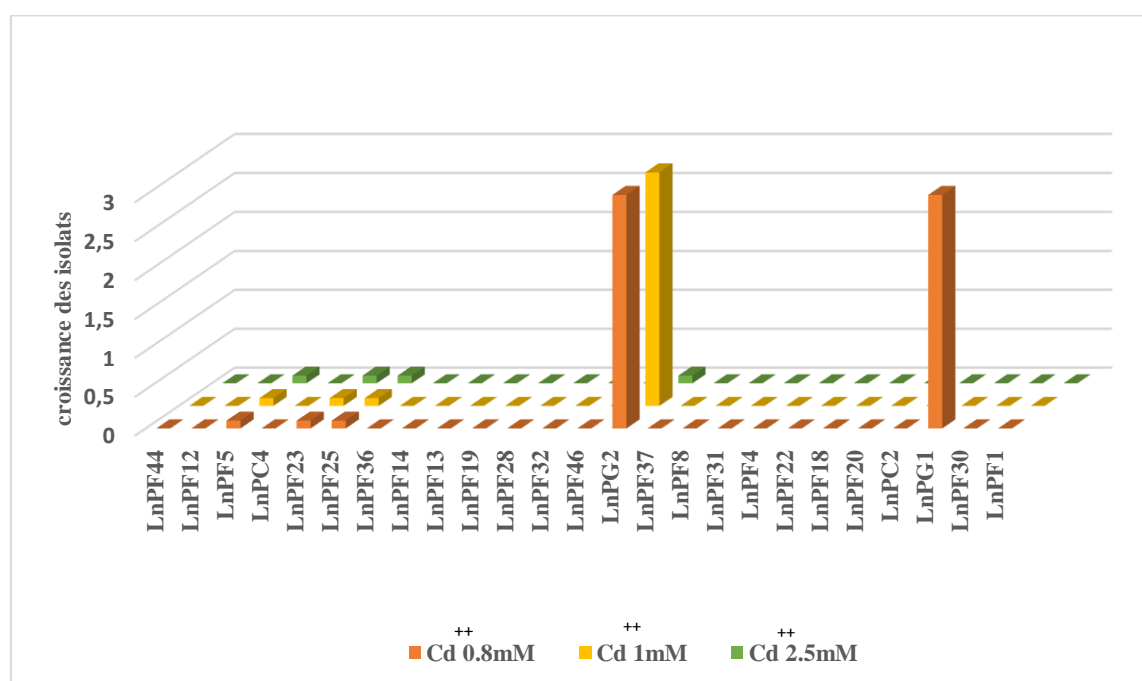


Fig 49. Résistance des isolats au Cd⁺⁺ sur milieu solide

1.1.4. Résistance des isolats au Chrome (Cr^{VI+})

Les résultats de la résistance au Cr^{VI+} ont montré une bonne résistance pour la majorité des isolats : 88.46% des isolats ont résisté jusqu'à 0.2mM, 80.76% jusqu'à 0.7mM et 26.92% jusqu'à 1mM (Fig 50). La CMT de chaque isolat pour chaque concentration de métal est démontré dans l'histogramme ci-dessous (Fig 51).

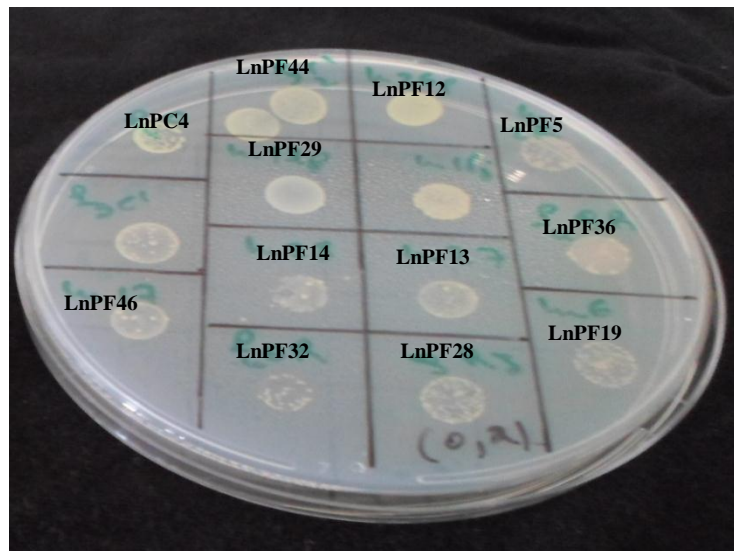


Fig 50. Résistance des isolats à 0.2mM du Cr^{VI+}

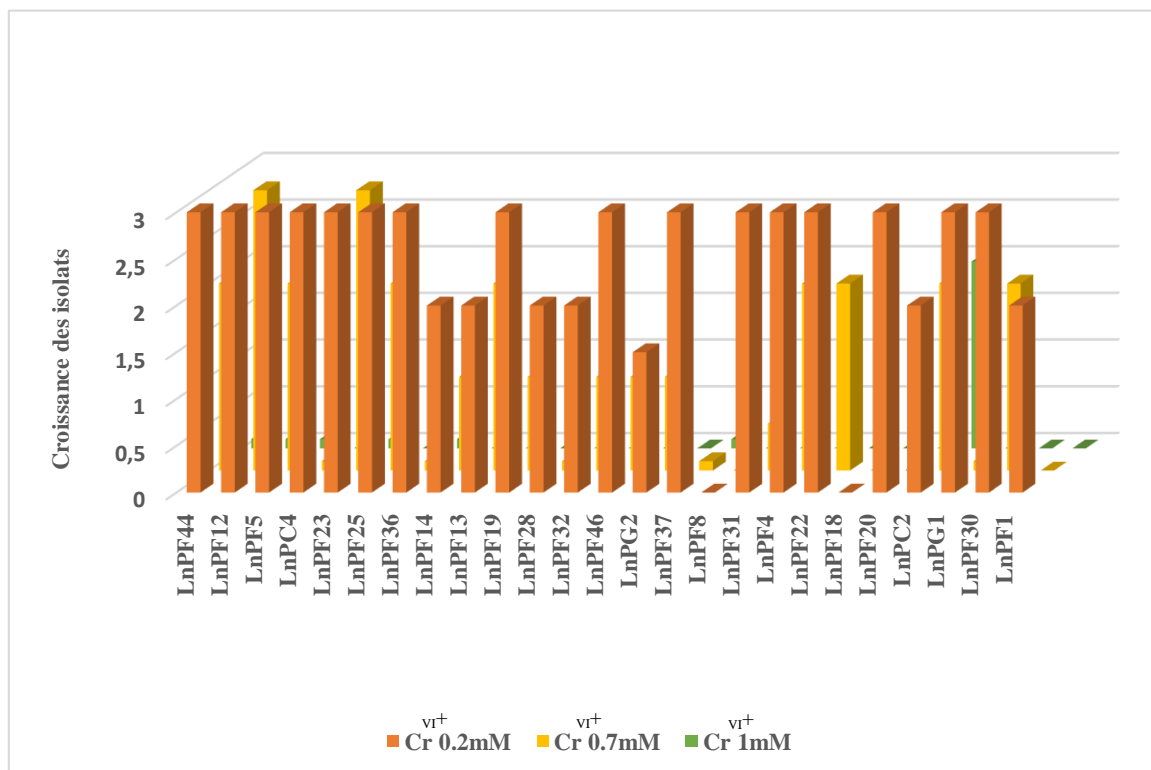


Fig 51. Résistance des isolats au Cr^{VI+}

1.1.5. Résistance des isolats au Cobalt (Co⁺⁺)

L'isolat LnPG1 est le seul isolat ayant la capacité à résister à 1mM de Co⁺⁺ (Fig 52). Cette sensibilité des isolats au Co⁺⁺ confirme ; sa grande toxicité sur la croissance des isolats. Les résultats sont mentionnés sur l'histogramme ci-dessous (Fig 53).

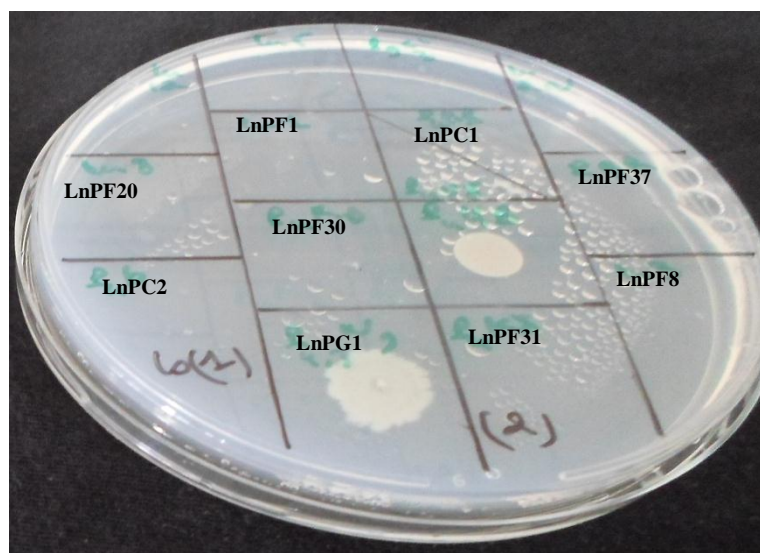


Fig 52. Résistance de LnPG1 à 1mM de Co^{++}

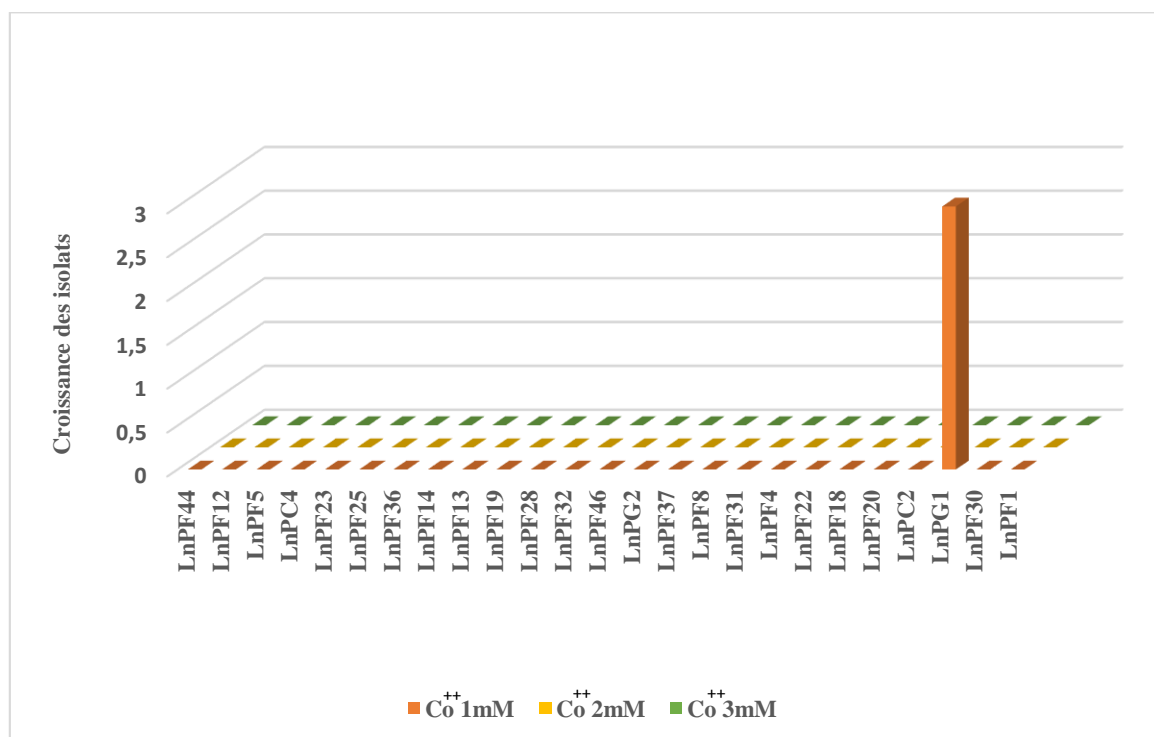


Fig 53. Résistance des isolats sur milieu solide au Co^{++}

1.1.6. Résistance des isolats au Nickel (Ni^{++})

Les résultats de la résistance des isolats au Ni^{++} ont montré que 46.15% des isolats ont résisté à 0.7mM, 38.46% ont résisté à 1mM et 7.69% ont résisté jusqu'à 2.5mM (Fig 54). La

CMT de chaque isolat pour chaque concentration de métal est représenté dans l'histogramme ci-dessous (Fig 55).

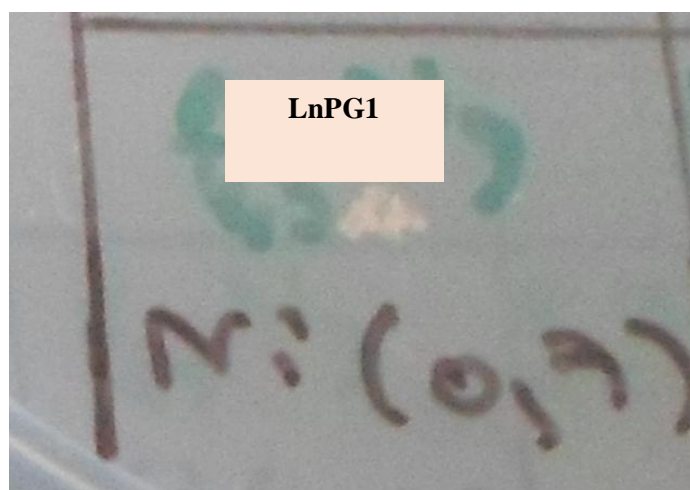


Fig 54. Résistance de l'isolat LnP G1 à 0.7mM de Ni⁺⁺

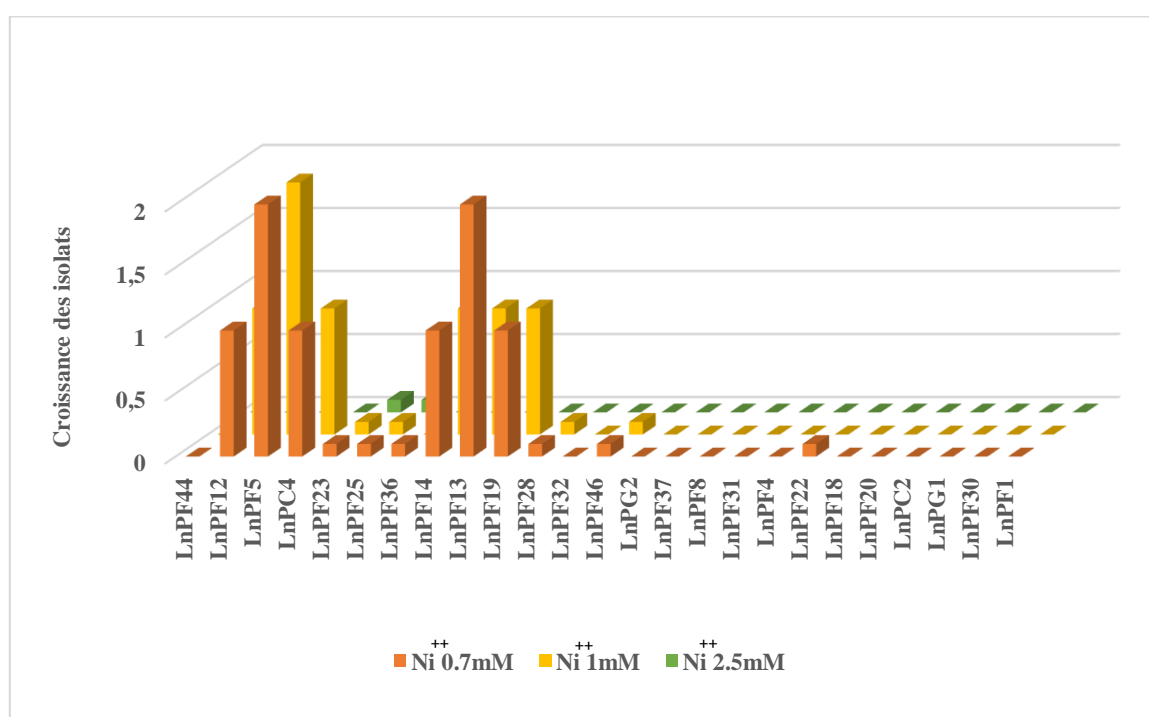


Fig 55. Résistance des isolats au Ni⁺⁺ sur milieu solide

1.1.7. Résistance des isolats au Plomb (Pb⁺⁺)

Les isolats ont montré une très bonne résistance au Pb⁺⁺ (Fig 56), 100% des isolats ont résisté jusqu'à 3mM. Tandis que 19.23% ont pu supporter jusqu'à 10mM et sont ; LnPF5,

LnPC4, LnPF23, LnPF8 et LnPF22. La figure 57 représente les résultats de chaque isolat pour chaque concentration testée.

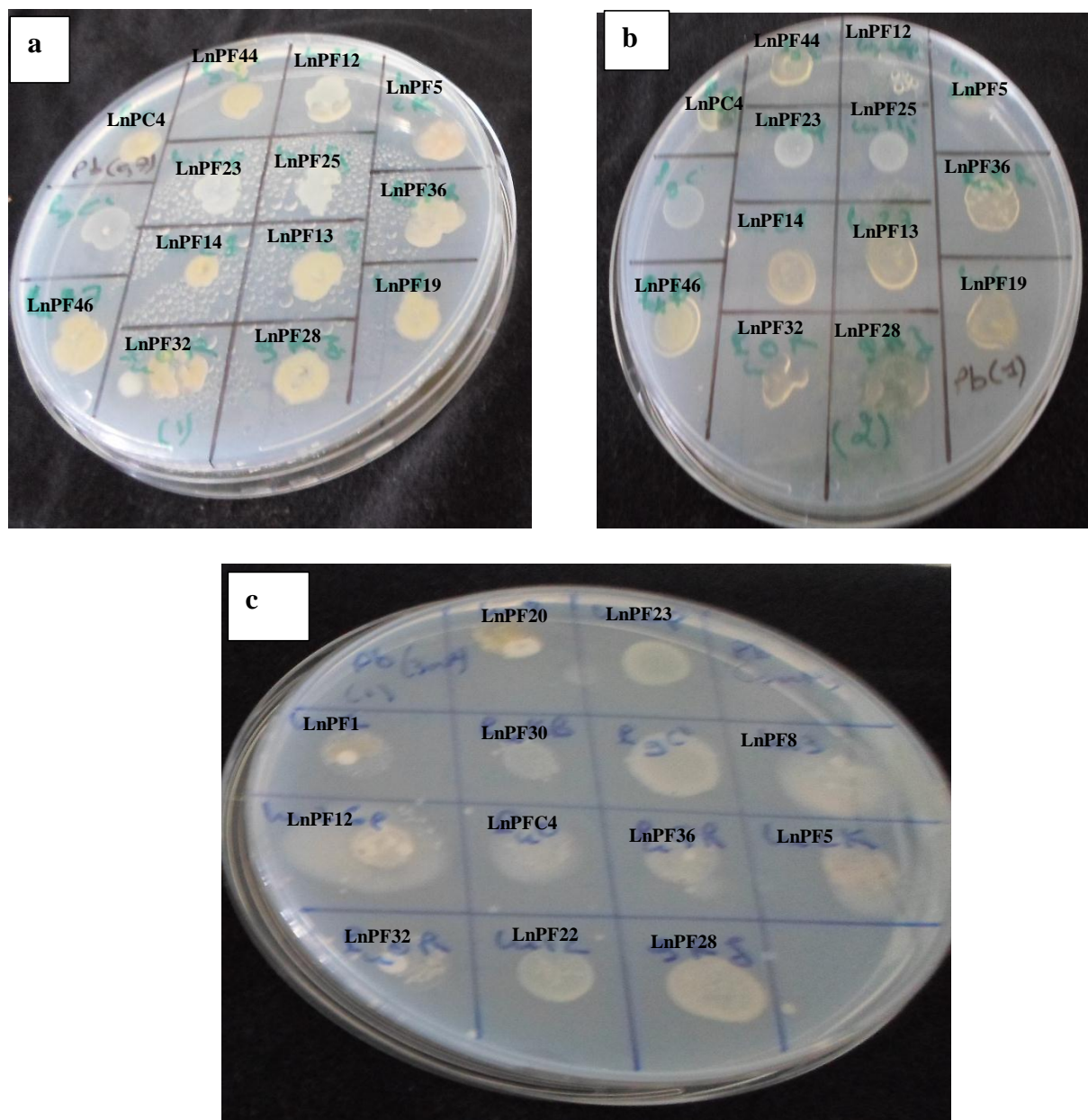


Fig 56. Résistance des isolats au Pb^{++} ; a. 0.7mM, b. 1mM et c. 3mM

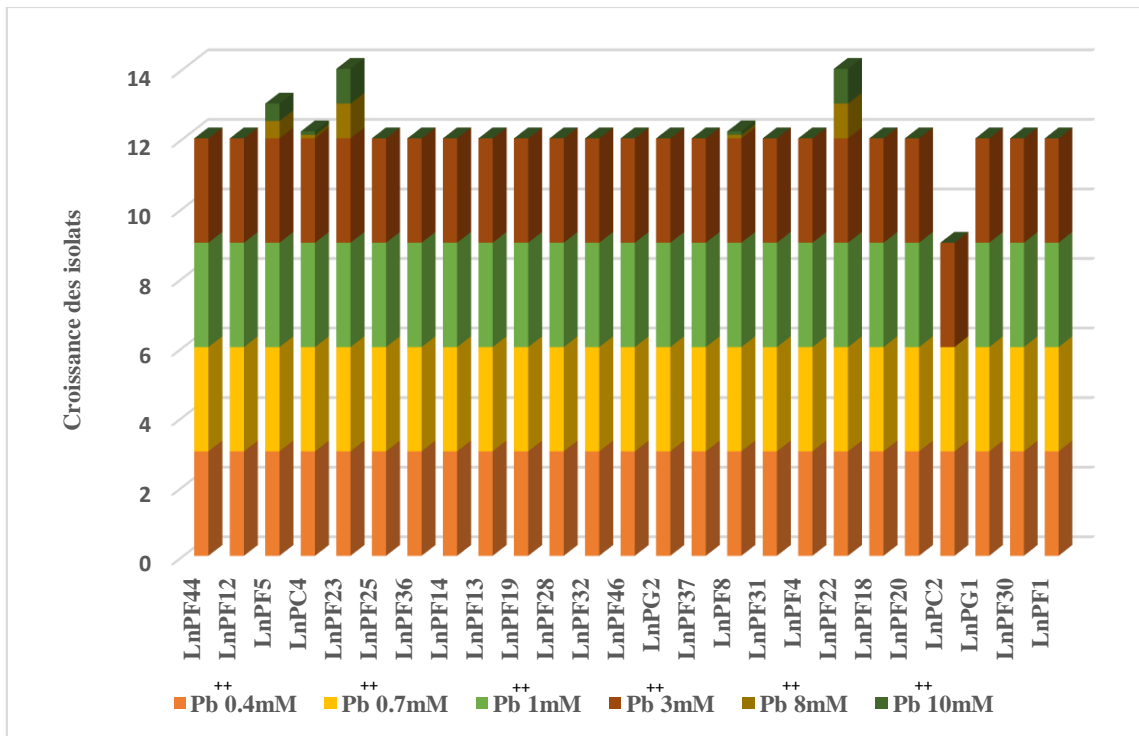


Fig 57. Résistance des isolats au Pb⁺⁺ sur milieu solide

1.1.8. Résistance des isolats au Fer (Fe⁺⁺)

L'ensemble des isolats ont résisté à des concentrations très élevées en Fe⁺⁺ (100%) jusqu'à 44.75mM sans aucune inhibition de la croissance (Fig 58, 59). Nous avons représenté les résultats obtenus sous forme d'histogramme (Fig 60).

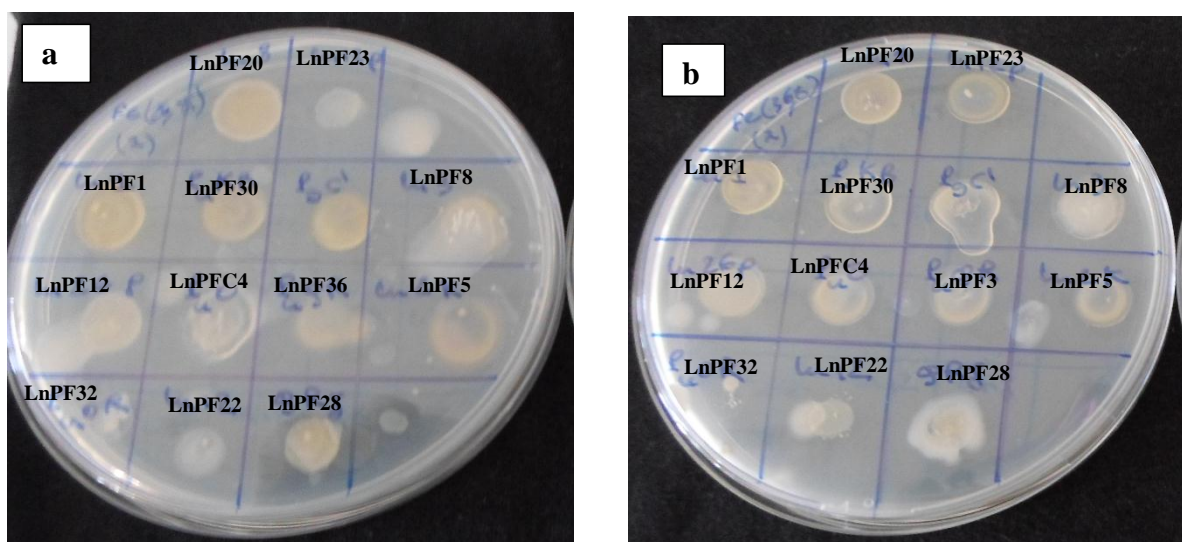


Fig 58. Résistance des isolats au Fe⁺⁺ ; a. 26.05mM, b. 36.6mM

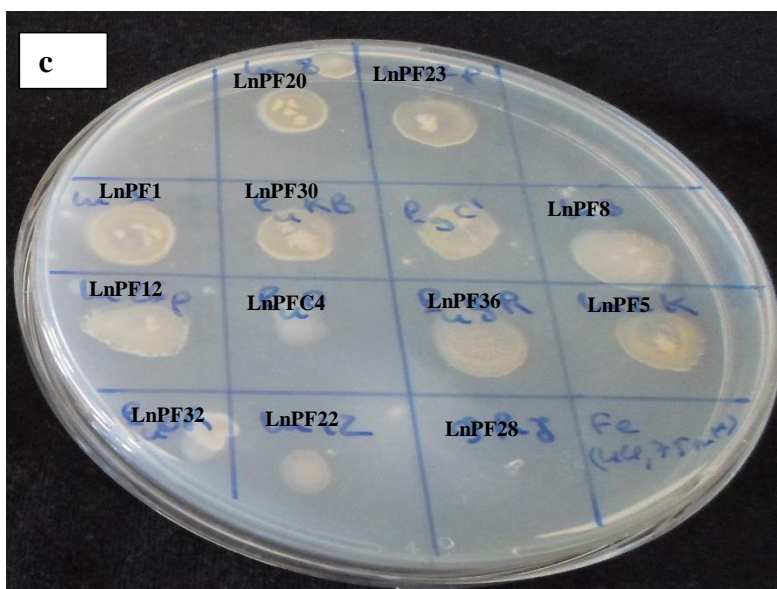


Fig 59. Résistance des isolats au Fe⁺⁺ ; c. 44.75mM

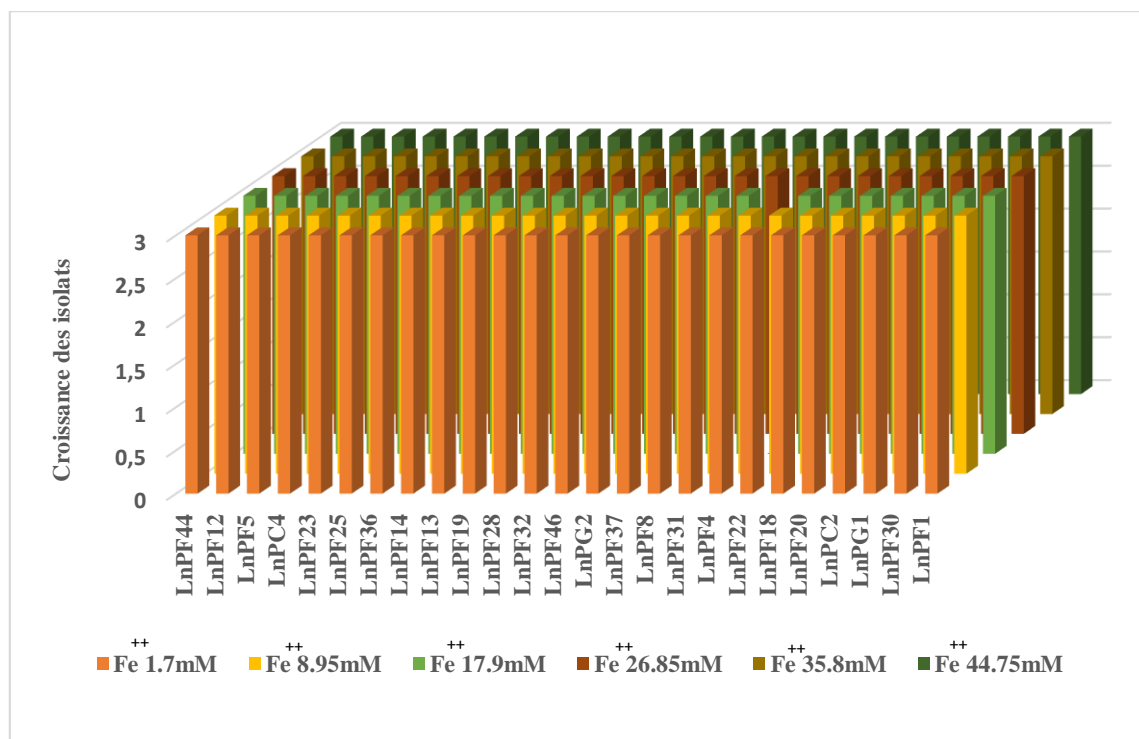


Fig 60. Résistance des isolats au Fe⁺⁺ sur milieu solide

6.1.9. Résistance des isolats au Mercure (Hg^{++})

L'ensemble des isolats (100%) ont résisté à des concentrations très élevées en Hg^{++} jusqu'à 20mM (Fig 61), sans aucune inhibition de la croissance des isolats et les résultats sont représentés dans l'histogramme (Fig 62).

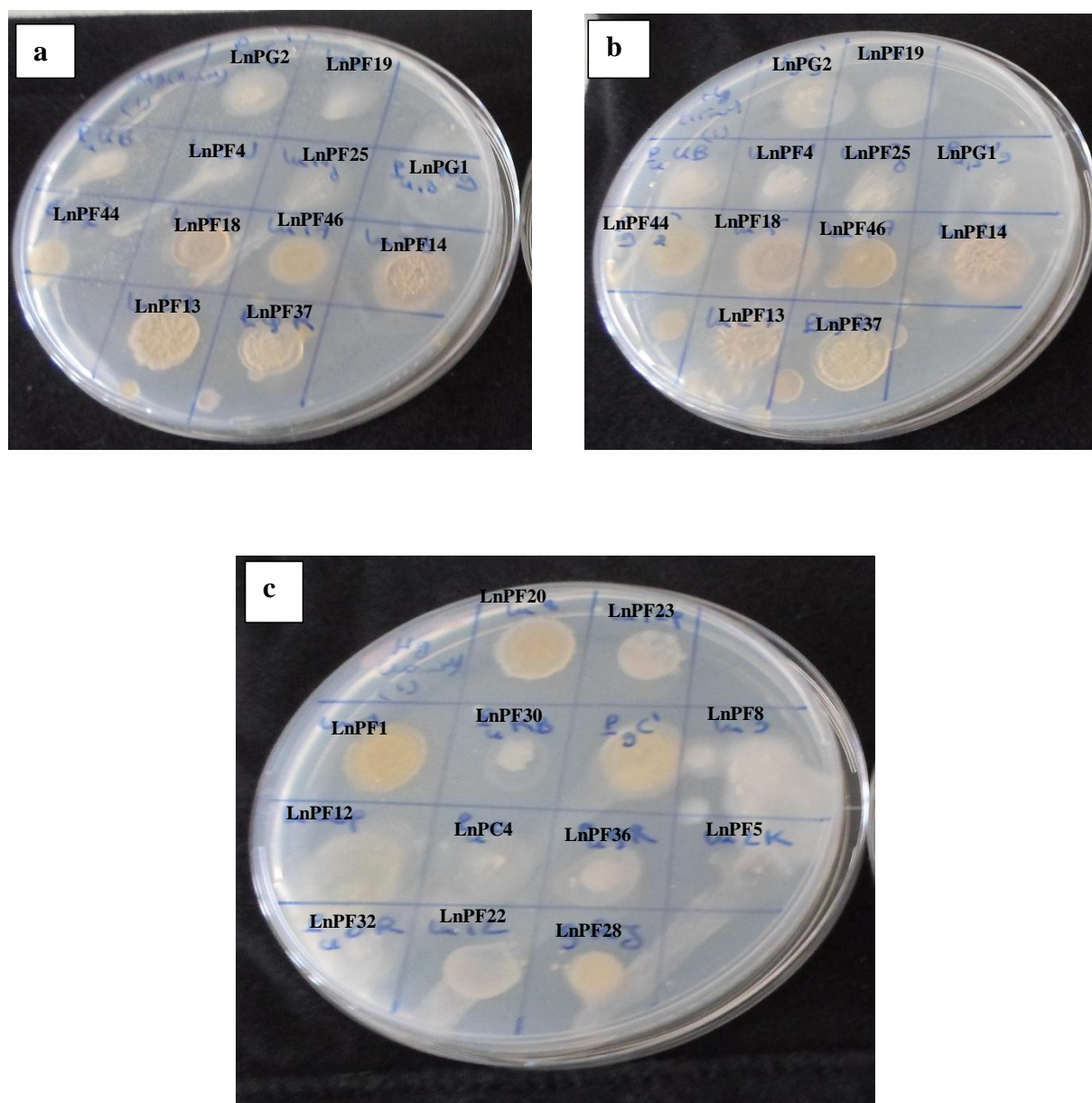


Fig 61. Résistance de tous les isolats au Hg^{++} ; a. 8mM et b. 15mM et c. 20mM

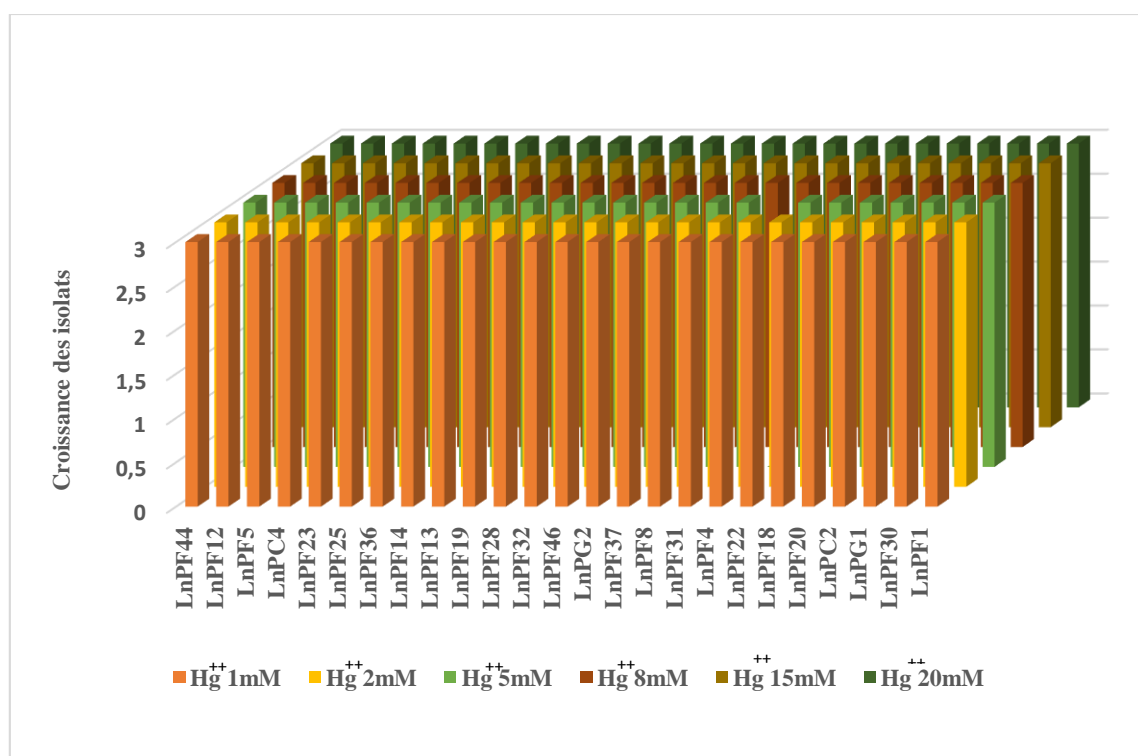


Fig 62. Résistance des isolats au Hg^{++} sur milieu solide

Dans le tableau 24 nous avons noté l'intervalle de résistance pour chaque isolat solubilisateur du PR.

L'analyse en composantes principales (ACP) (Fig 63) est réalisée pour déterminer les corrélations existant entre la résistance des isolats aux métaux lourds.

Selon la première composante principale (facteur 1) une variabilité de 41.71% a été enregistrée, où les paramètres (variables) de Zn^{++} , Cu^{++} , Cr^{VI+} , Ni^{++} , Pb^{++} et Cd^{++} sont bien représentés avec des coordonnées dans le cercle de corrélation de : 0.75, 0.87, 0.56 et 0.51, 0.44 et 0.86 respectivement.

Selon la deuxième composante principale (facteur 2) une variabilité de 21.78% a été enregistrée, dont le seul paramètre (variable) le Co^{++} est bien représenté avec une coordonnée dans le cercle de corrélation de : 0.75.

Tableau 24. Concentration maximale de tolérance (CMT) pour ; Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Cr^{VI+}, Co⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺, Pb⁺⁺, Hg⁺⁺ et Fe⁺⁺ en (mM) pour les isolats qui ont solubilisé le PR

CMT (mM)	Isolats qui ont solubilisé le PR sur milieu liquide								
	LnPF13	LnPF14	LnPF18	LnPF19	LnPF32	LnPF44	LnPF46	LnPG1	LnPG2
12 ≤ [Zn ⁺⁺] ≤ 32	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1 ≤ [Cu ⁺⁺] ≤ 2	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1 ≤ [Cu ⁺⁺] ≤ 2.5	-	-	-	-	-	+	-	-	+
[Cr ⁺⁺] ≤ 0.2	+	+	-	+	+	+	+	+	+
0.2 ≤ [Cr ^{VI+}] ≤ 0.7	+	+	-	+	-	+	+	+	+
0.7 ≤ [Cr ^{VI+}] ≤ 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
[Co ⁺⁺] ≤ 1	-	-	-	-	-	-	-	+	-
[Cd ⁺⁺] ≤ 0.8	-	-	-	-	-	-	-	+	+
[Cd ⁺⁺] ≤ 2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.7 ≤ [Ni ⁺⁺] ≤ 1	+	+	-	+	-	-	+	-	-
0.4 ≤ [Pb ⁺⁺] ≤ 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 ≤ [Hg ⁺⁺] ≤ 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.7 ≤ [Fe ⁺⁺] ≤ 44.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : résistante, - : sensible

L'étude de la corrélation entre les paramètres en utilisant le test de Pearson a révélé une corrélation significative entre les paramètres suivant (Tableau 25) :

➡ Une corrélation positive est détectée entre la résistance aux Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ et Cd⁺⁺.

→ Une corrélation positive existe aussi entre la résistance aux Ni^{++} et Cr^{VI+} , tandis que le Ni^{++} est corrélé négativement avec le Zn^{++} , donc la majorité des isolats qui ont résisté au Ni^{++} ne résistent pas au Zn^{++} et le contraire est vrai.

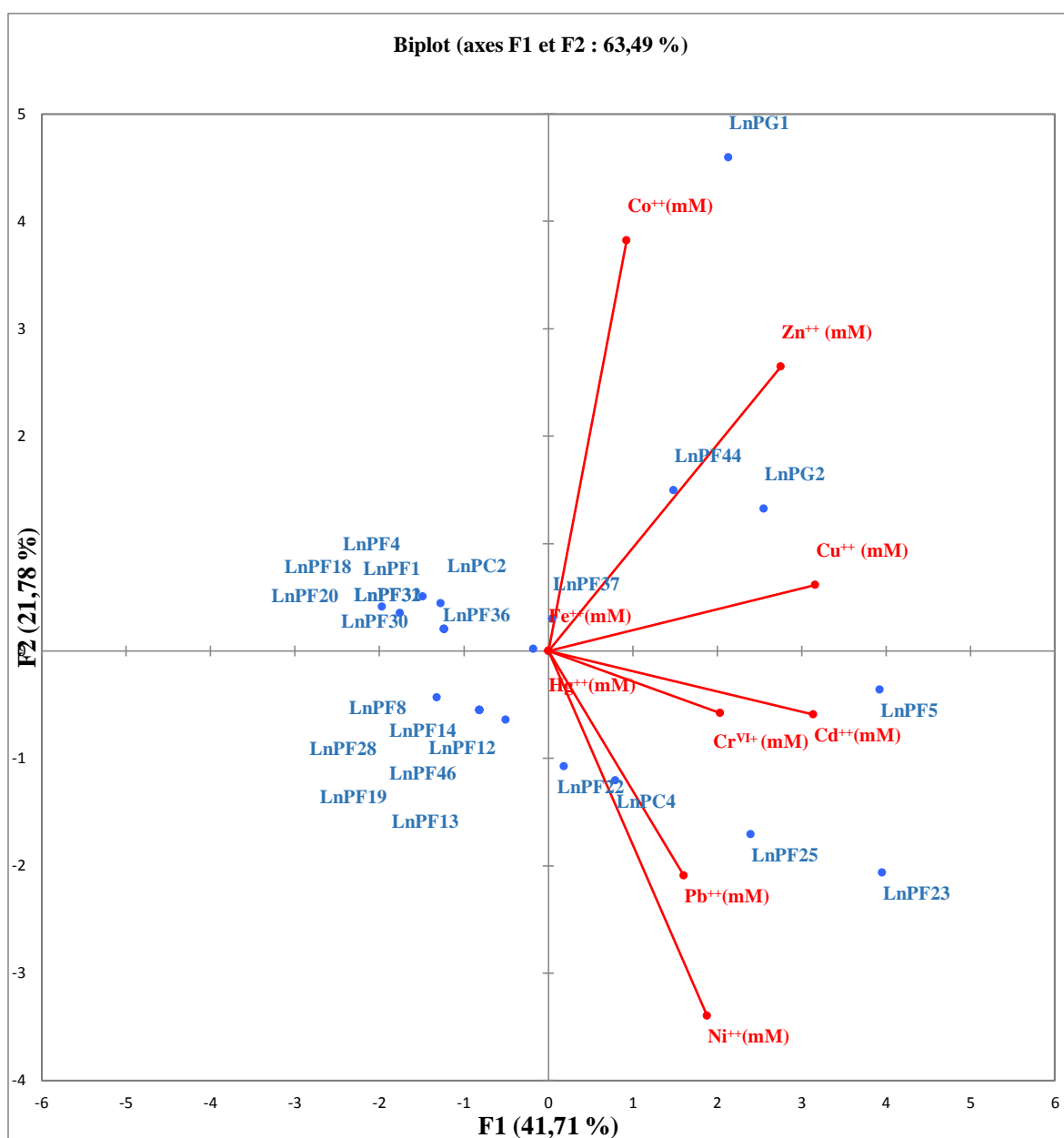


Fig 63. Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance des isolats solubilisateurs de phosphate aux 9 métaux lourds

Pour les deux paramètres nuls Fe^{++} et Hg^{++} , ces paramètres ne sont pas représentés car tous les isolats ont résisté à ces deux métaux pour toutes les concentrations utilisées.

En ce qui concerne le comportement des isolats vis-à-vis la résistance aux métaux lourds, nous pouvons les diviser en deux groupes :

➡ Le premier groupe comporte les isolats ayant résisté le plus aux différents métaux et qui sont représentés sur le côté droit de l'axe F2 : LnPG1, LnPF44, LnPG2, LnPF5, LnPF23, LnPF25, LnPC4 et LnPF22.

➡ Le deuxième groupe situé à l'opposé des axes comporte des isolats ayant un profil variable majoritairement moyen à faible qui sont : LnPF4, LnPF18, LnPF20, LnPF32, LnPF1, LnPC2, LnPF30, LnPF36, LnPF8, LnPF14, LnPF12, LnPF28, LnPF46, LnPF19, LnPF13, LnPF22, LnPC4, LnPF22.

Tableau 25. Corrélation entre les variables (Test de Pearson)

Variables	Zn ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Cr ^{VI+}	Co ⁺⁺	Cd ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Pb ⁺⁺
Zn ⁺⁺	1	0,671*	0,385	0,443*	0,582*	-0,044	0,142
Cu ⁺⁺	0,671*	1	0,336	0,221	0,717*	0,278	0,351
Cr ^{VI+}	0,385	0,336	1	0,034	0,288	0,407*	0,051
Co ⁺⁺	0,443*	0,221	0,034	1	0,082	-0,162	-0,102
Cd ⁺⁺	0,582*	0,717*	0,288	0,082	1	0,528*	0,310
Ni ⁺⁺	-0,044	0,278	0,407*	-0,162	0,528*	1	0,319
Pb ⁺⁺	0,142	0,351	0,051	-0,102	0,310	0,319	1

*Ces valeurs sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha = 0,05$

Les résultats de cette analyse montrent que les isolats LnPG1, LnPF44, LnPG2, LnPF5, LnPF23 et LnPF25 sont les plus performants pour la résistance aux métaux lourds testés, où les isolats LnPG1, LnPF44 et LnPG2 solubilisent le PR.

1.2. Tolérance au stress salin

Le test de la salinité est réalisé pour étudier la capacité des isolats (qui ont solubilisé le PR sur milieu liquide) à croître en présence de concentrations croissantes de NaCl : 0, 0.01, 1, 2, 2.5 et 5% (P/V).

Nous pouvons conclure à partir des résultats mentionnés sur le tableau 26 que les isolats à croissance rapide sont plus tolérants à la salinité que celles à croissance moyenne.

Tableau 26. Tolérance à la salinité des isolats solubilisateurs du PR

Isolats	Test de NaCl (P/V)				
	0%	0.01%	2% sur TA	2.5%	5%
LnPF13	+++	+++	+++	+++	+++
LnPF14	+++	+++	+++	+++	+++
LnPF18	+++	+++	+	+++	-
LnPF19	+++	+++	+++	+++	+++
LnPF32	+++	+++	+	+++	-
LnPF44	+++	+++	+++	+++	+++
LnPF46	+++	+++	+++	+++	+++
LnPG1	+++	+++	+++	+++	+
LnPG2	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Bonne croissance, + : Croissance faible, - : Pas de croissance

Les isolats à croissance rapide ont toléré des concentrations élevées de NaCl allant jusqu'à 5% (P/V) (Fig 64), et celles à croissance moyenne (LnPF18 et LnPF32) ont toléré que 2.5% de NaCl, ces deux isolats ont faiblement poussée sur TA additionné de 2% de NaCl. A l'exception de la LnPF19 qui est une rhizobactérie à croissance moyenne mais a toléré jusqu'à 5% de NaCl.

Les souches de référence utilisées *Burkholderia* sp, *Cupriavidus basilensis* et *Agrobacterium tumefaciens* C58, ont eu des tolérances différentes ; où *C. basilensis* n'a pas toléré le NaCl par contre *Burkholderia* sp a toléré 2.5% de NaCl et *Agrobacterium tumefaciens* (C58) a résisté jusqu'à 5% de NaCl avec une diminution de sa croissance à partir de 2.5% de NaCl.

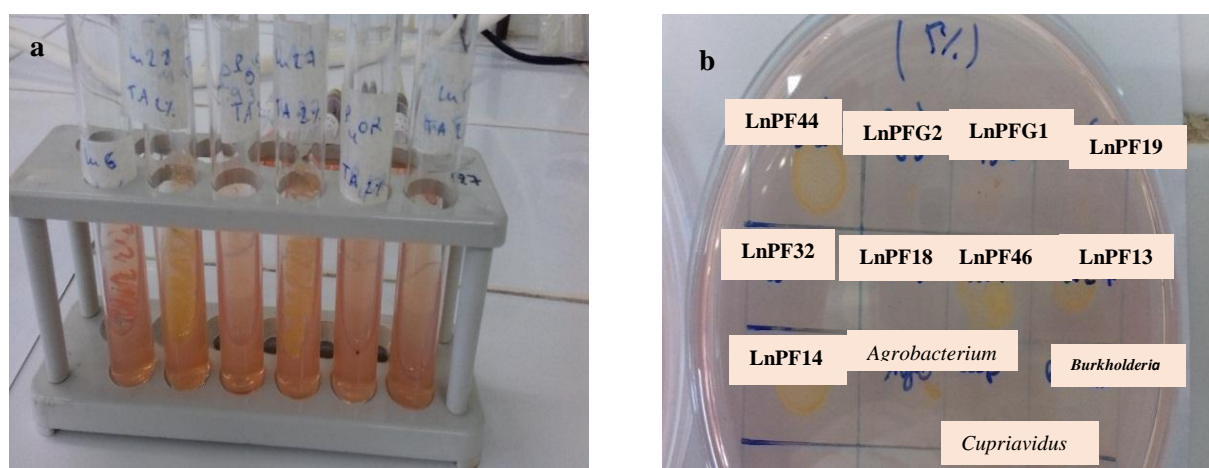


Fig 64. Tolérance des isolats solubilisateur du PR à la salinité, **a.** 2% de NaCl sur TA, **b.** 5% de NaCl

1.3. Relation entre résistance aux métaux lourds, solubilisation du PR et la tolérance à la salinité

L'analyse de l'ACP (Fig 65) est utilisée pour étudier la relation qui existe entre le comportement des individus (isolats) vis-à-vis les trois variables suivants : la résistance aux métaux lourds, solubilisation du PR sur milieu liquide et la tolérance à la salinité.

Selon la première composante principale (facteur 1) une variabilité de 40.86% a été enregistrée, où les quatre paramètres de la résistance au Zn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} et Cd^{++} sont bien représentés avec des coordonnées dans le cercle de corrélation de 0.97, 0.96, 0.45 et 0.79 respectivement.

Selon la deuxième composante principale (facteur 2) une variabilité de 30.65% a été enregistrée, dont les paramètres de la résistance au Cr^{VI+} et au Ni^{++} et la tolérance à 5% de NaCl, tolérance TA 2% et la solubilisation de PR sur milieu liquide sont bien représentées avec des coordonnées dans le cercle de corrélation de 0.7, 0.74, 0.95, 0.84 et 0.13 respectivement.

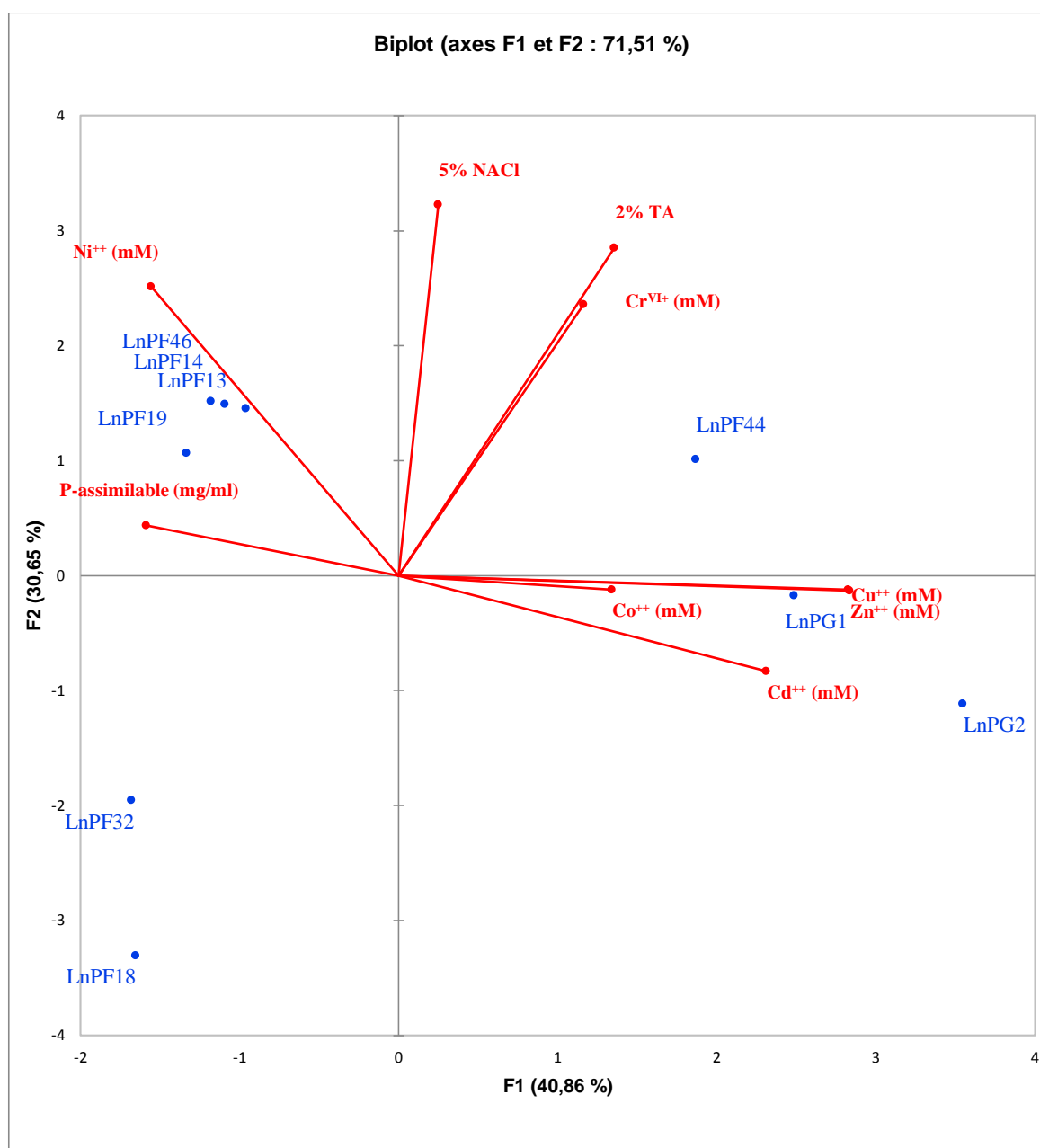


Fig 65. Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance aux métaux lourds, solubilisation du PR et la tolérance à la salinité

Pour les paramètres de résistance au Fe^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} , et la tolérance à 0%, 0.01%, 1%, 2%, 2.5% ne sont pas représentés sur l'ACP car tous les isolats se sont comportés de la même manière ; résistance aux trois métaux (Fe^{++} , Hg^{++} , Pb^{++}) à toutes les concentrations testées et tolèrent tous jusqu'à 2.5% (P/V) de NaCl.

L'étude de la corrélation entre les paramètres en utilisant le test de Pearson (Tableau 27) et la position des vecteurs sur l'ACP nous ont permis de tirer plusieurs informations :

► Une corrélation positive est encore confirmée entre le Cu^{++} , Zn^{++} et Cd^{++} . Nous avons pu voir que les deux paramètres Cu^{++} et Zn^{++} sont très liés et un peu moins avec le Cd^{++} .

► La solubilisation du PR est négativement corrélée avec la résistance au Zn^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} et Co^{++} .

► La résistance à la salinité jusqu'à 5% est corrélée positivement avec la résistance au Ni^{++} et au $\text{Cr}^{\text{VI}+}$.

Tableau 27. Corrélation entre les variables (Test de Pearson)

Variables	Zn^{++}	Cu^{++}	$\text{Cr}^{\text{VI}+}$	Co^{++}	Cd^{++}	Ni^{++}	2% TA	5% NaCl	P- assimilable
Zn^{++}	1	0,992*	0,409*	0,500*	0,653	-0,632	0,378	0,066	-0,392
Cu^{++}	0,992*	1	0,426*	0,390	0,667	-0,628	0,375	0,065	-0,436
$\text{Cr}^{\text{VI}+}$	0,409*	0,426*	1	0,063	0,082	0,159	0,653*	0,615*	0,198
Co^{++}	0,500*	0,390	0,063	1	0,193	-0,316	0,189	0,033	0,133
Cd^{++}	0,653*	0,667*	0,082	0,193	1	-0,413	0,247	-0,249	-0,747
Ni^{++}	-0,632	-0,628	0,159	-0,316	-0,413	1	0,478*	0,644*	0,134
2% TA	0,378	0,375	0,653	0,189	0,247	0,478*	1	0,844*	-0,284
5% NaCl	0,066	0,065	0,615*	0,033	-0,249	0,644*	0,844*	1	0,020
P- assimilable	-0,392	-0,436	0,198	0,133	-0,747	0,134	-0,284	0,020	1

*Ces valeurs sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha = 0,05$

Pour le comportement des isolats vis-à-vis la résistance aux métaux lourds, la solubilisation du PR et la tolérance à la salinité, nous pouvons les classer en trois groupes :

► Le premier groupe comporte les isolats ayant une forte résistance à la majorité des métaux lourds testés et tolèrent jusqu'à 5% de NaCl ; LnPF44, LnPG1 et LnPG2.

► Le deuxième groupe comprend des isolats ayant une forte tolérance à NaCl jusqu'à 5% et résistent au Ni⁺⁺ et au Cr^{VI+} mais ne résistent pas au Co⁺⁺, Zn⁺⁺ et Cd⁺⁺; LnPF14, LnPF19, LnPF46 et LnPF13.

► Le troisième groupe comporte des isolats qui résistent faiblement aux métaux (ne résistent pas au Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺) et ne tolèrent que 2.5% de NaCl; LnPF32 et LnPF18.

Nous pouvons donc conclure que les PSB qui ont résisté à presque tous les métaux lourds ont la capacité de tolérer des concentrations élevée en NaCl, donc une corrélation significative est confirmée entre le pouvoir de résistance à plusieurs métaux et la tolérance à la salinité.

Les isolats qui ont solubilisé le PR n'ont pas tous la capacité à résister à tous les métaux lourds testés.

2. Discussion

Bien que plusieurs métaux lourds constituent des éléments nécessaires pour les plantes à de faibles concentrations, les ions de ces métaux peuvent être hautement toxiques à des concentrations plus élevées pour les plantes et l'environnement.

Dans le but de la recherche des solutions alternatives pour détoxifier le sol et préserver l'environnement, nous avons réalisé le test de la résistance des isolats à plusieurs métaux lourds.

Les résultats du test de la résistance des isolats aux métaux lourds ont montré la capacité des isolats à résister à des concentrations croissantes de métaux lourds testés (Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Cr^{VI+}, Cu⁺⁺, Pb⁺⁺, Fe⁺⁺, Cd⁺⁺, Zn⁺⁺ et Hg⁺⁺) avec une CMT qui diffère d'un isolat à l'autre.

Tous les isolats ont résisté au Fe⁺⁺ à toutes les concentrations utilisées en raison de l'ajout du minerai de fer dans le sol de piégeage et dans le milieu d'isolement. Ensuite, tous les isolats résistent au Hg⁺⁺ à toutes les concentrations utilisées, résistent également bien au Pb⁺⁺, un peu moins pour le Cr^{VI+}, après Ni⁺⁺ et Cu⁺⁺, et peu résistants au Cd⁺⁺ et Co⁺⁺.

Donc les isolats résistent aux métaux selon l'ordre décroissant suivant : Co⁺⁺ < Zn⁺⁺ < Cd⁺⁺ < Ni⁺⁺ < Cu⁺⁺ < Cr^{VI+} < Pb⁺⁺ < Hg⁺⁺ < Fe⁺⁺.

Cet ordre de résistance des isolats aux métaux lourds peut être expliqué par le fait que les rhizobactéries développent une résistance vis-à-vis les métaux qui contaminent leur habitat.

Donc on suppose que le sol utilisé pour le piégeage est contaminé par les métaux dont les rhizobactéries ont résisté le plus surtout le Fe^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} .

Les CMT les plus élevées des trois isolats solubilisateurs du PR sont :

➔ **LnPG1** (32mM Zn^{++}), (2mM Cu^{++}), (0.7mM Cr^{VI}), (1mM Co^{++}), (0.8mM Cd^{++}), (3mM Pb^{++}), (20mM Hg^{++}) et (44.75mM Fe^{++}).

➔ **LnPG2** (32mM Zn^{++}), (2.5mM Cu^{++}), (1mM Cr^{VI}), (2.5mM Cd^{++}), (3mM Pb^{++}), (20mM Hg^{++}) et (44.75mM Fe^{++}).

➔ **LnPF44** (32mM Zn^{++}), (2.5mM Cu^{++}), (1mM Cr^{VI}), (3mM Pb^{++}), (20mM Hg^{++}) et (44.75mM Fe^{++}).

Les microorganismes appliquent divers types de mécanismes de résistance en réponse aux métaux lourds (Nies, 2003). Ces mécanismes, souvent basés sur des systèmes d'efflux d'ions métalliques à l'extérieur de la cellule, l'accumulation et la complexation des ions métalliques à l'intérieur de la cellule et la réduction des métaux toxiques en formes moins toxiques (Outten et al, 2000 ; Vidal, 2009).

Singh et al (2013) ont montré que les deux souches de *Pseudomonas* spp (YSY-13 et YSY19) ont résisté à 100 $\mu\text{g/ml}$ de Cr, 200 $\mu\text{g/ml}$ de Pb, 100 $\mu\text{g/ml}$ de Co. Aussi ces deux souches ont résisté respectivement à 100 et 50 $\mu\text{g/ml}$ de Hg, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de Cd et Zn, 200 et 25 $\mu\text{g/ml}$ de Cu.

Une autre étude réalisée par Saif et al (2013) qui a trouvé que *Pseudomonas*, *Azotobacter* et *Rhizobium* ont montré une tolérance maximale à de plusieurs métaux lourds, tandis que *Bacillus* spp a été tolérante dans une moindre mesure. Parmi tous ces genres les auteurs ont démontré que la plus grande tolérance à tous les métaux testés à l'exception du Ni pour lequel la tolérance maximale est affichée par *Rhizobium* spp. Les tolérances les plus élevées observées sont : 400 $\mu\text{g/ml}$ de Cd et Cr, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de Cu, 1200 $\mu\text{g/ml}$ de Pb, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de Ni et 800 $\mu\text{g/ml}$ de Zn.

Mesorhizobium metallidurans sp.nov (STM 2 683^T) (=CFBP 7147^T= LMG 24485^T) est une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium* isolée à partir de *Anthyllis vulneraria* qui pousse sur un sol pollué par les métaux (Languedoc, France) a tolérée des concentrations élevées de

métaux lourds, 16- 32 mM de Zn, 0.3 à 0.5 mM de Cd, tandis que *M. thianshanense* ORS 2640^T et *M. mediterraneum* ORS 2739^T sont capables de tolérer juste de faibles concentrations 0.05 - 0.5 mM de Zn et 0.05 de Cd (Vidal et al, 2009).

Ces niveaux élevés de tolérance par les microorganismes est dû à des mécanismes génétiques spécifiques conférant une résistance aux métaux lourds (Jayanthi et al, 2017).

Les souches de *Cupriavidus* sont connues pour leur résistance importante aux métaux lourds. Vicentin et al (2018) ont détecté que la souche *Cupriavidus spp* (UFLA01-659) était la souche la plus tolérante avec des concentrations maximales inhibitrices (CMI) de : 5, 4.95 et 14.66 mM/l pour le Cd, Cu et Zn respectivement.

Une autre étude (Zhao et al, 2012) a montré que la souche *Cupriavidus metallidurans* XXXKD-1, résistante aux métaux lourds dans des galeries souterraine dans la mine Qixiashan Pb-Zn, en Chine. *Cupriavidus metallidurans* XXXKD-1 a présentait des CMI très élevées pour divers métaux lourds : Cd²⁺ 1mM, Co²⁺ 2 mM, Cr³⁺ 2.5m, Ni²⁺ 3mM, Cu²⁺ 3.5 mM, Mn²⁺ 6mM et Zn⁺² 10mM.

En comparant nos résultats avec les résultats des autres études, nous pouvons conclure que nos isolats sont résistants à de fortes concentrations de métaux lourds surtout pour le Zn, Pb, Hg et Fe et nous pensons que le substrat sol utilisé est probablement pollué par ces métaux ce qui a permis aux isolats de résister à ces métaux lourds. Ces résultats sont confirmés par Gadd et Griffiths (1978) qui ont démontré qu'une résistance élevée est due à l'adaptation des microorganismes à la toxicité des concentrations élevées de métaux lourds qui existent dans la rhizosphère de la plante.

Les isolats solubilisateur du PR ont toléré jusqu'à 5% de NaCl, sans aucune inhibition de la croissance. A l'exception de LnPF32 et LnPF18 qui n'ont toléré que 2.5% de NaCl

Il existe peu de rapports sur des bactéries tolérantes au sel ou halotolérantes qui pourraient être tolérantes aux métaux lourds en même temps (Jiang et al, 2008).

CHAPITRE VII : CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)

1. Présentation des résultats

Les résultats obtenus avec Api 20NE, osmotolérance et tous les tests présomptifs ont été utilisés pour la caractérisation phénotypique avec *Burkholderia* sp., *Cupriavidus basilensis* et *Agrobacterium tumefaciens* C58 comme souches de référence.

L'analyse des caractères phénotypiques présentés sous la forme d'un dendrogramme de dissimilarité (CAH) sur la figure 66, et les résultats ont montré trois groupes distincts : G1, G2 et G3.

➡ Le groupe G1 : comprend les isolats LnPF13 (Fig 67), LnPF14, LnPF19 (Fig 68), LnPF44 (Fig 69), LnPF46 (Fig 70) et LnPG1 ; ce groupe appartiendrait aux gamma-protéobactéries (*Pseudomonas* sp.).

➡ Le groupe G2 : comprend LnPG2 (Fig 71), LnPF18 (Fig 72), LnPF32 (Fig 73) et les souches de référence *Burkholderia* sp. et *Cupriavidus basilensis* ; ce groupe appartiendrait à bêta-protéobactéries.

➡ Le groupe G3 : la souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* C58 se trouve seul dans ce groupe, ce qui confirme les résultats précédents à savoir que parmi nos isolats nous n'avons pas trouvé d'*Agrobacterium*.

2. Discussion

En se basant sur l'analyse des caractères phénotypiques nous avons pu apparenter nos isolats en trois genres : *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp et *Cupriavidus basilensis*.

Ces souches ont la capacité de solubiliser les phosphates inorganiques (PMC et PTC) sur milieu solide. Elles ont aussi la capacité à libérer des quantités importantes de phosphates assimilable en solubilisant le phosphate roche.

Parmi ces neuf souches, six sont avérées capables de former des nodules sur leur plante hôte « *L. ochrus* ». Ces souches ont montré une résistance importante à moyenne selon le métal utilisé.

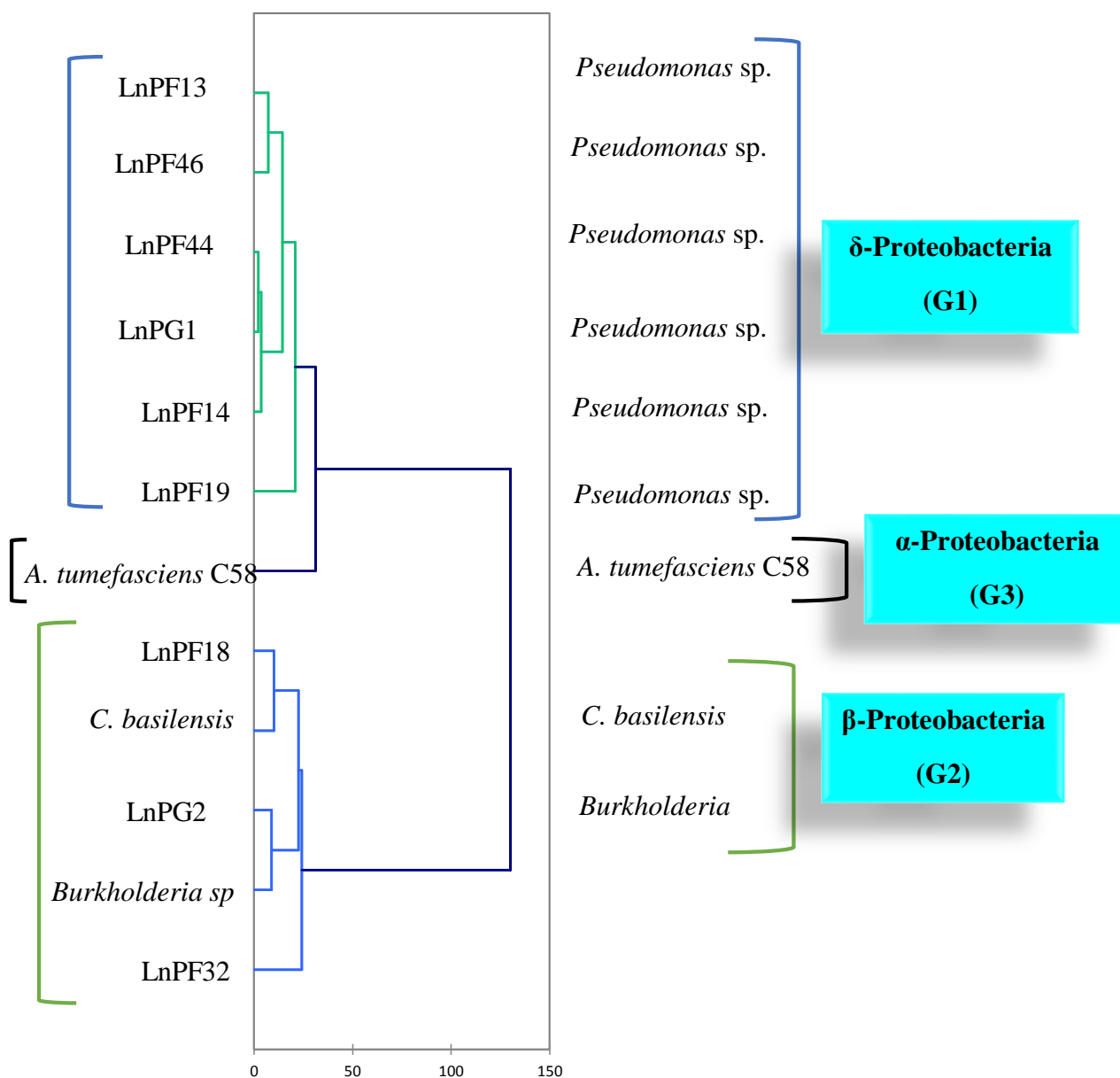


Fig 66. CAH dendrogramme des caractères phénotypiques des neuf isolats qui solubilisent PRA et leur genre d'appartenance

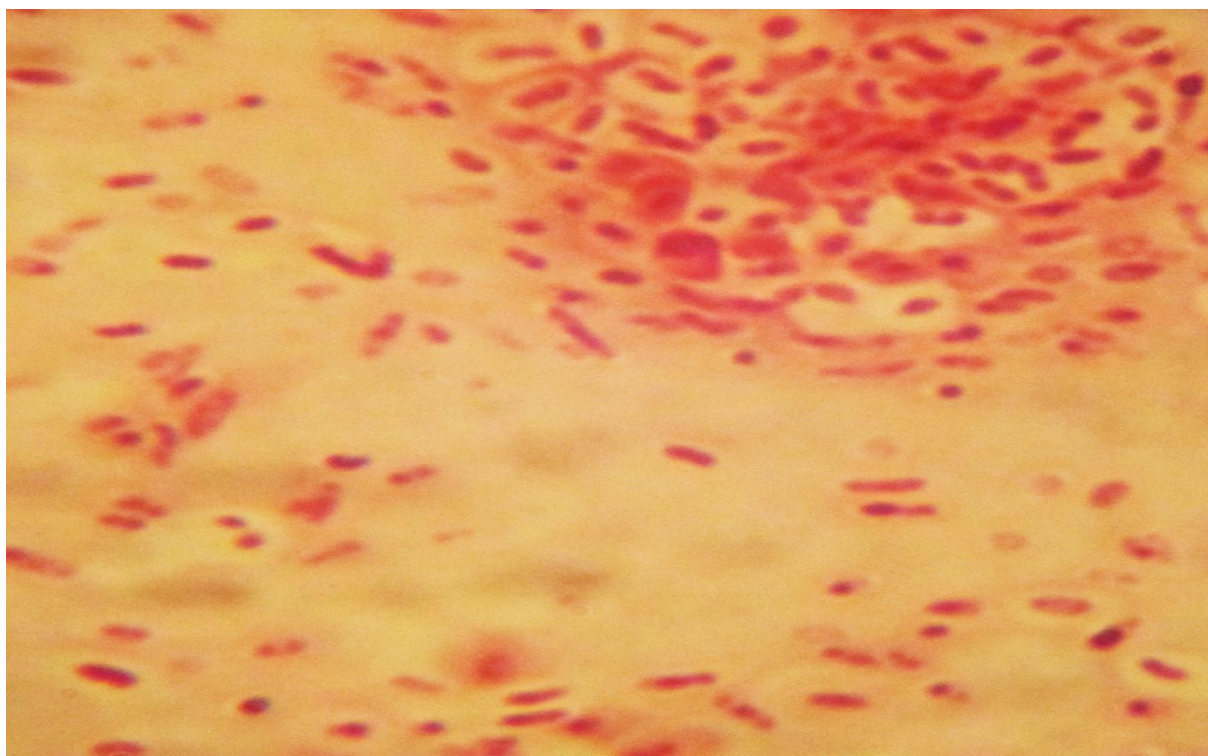


Fig 67. Observation microscopique de l'isolat LnPf13 (G \times 100)

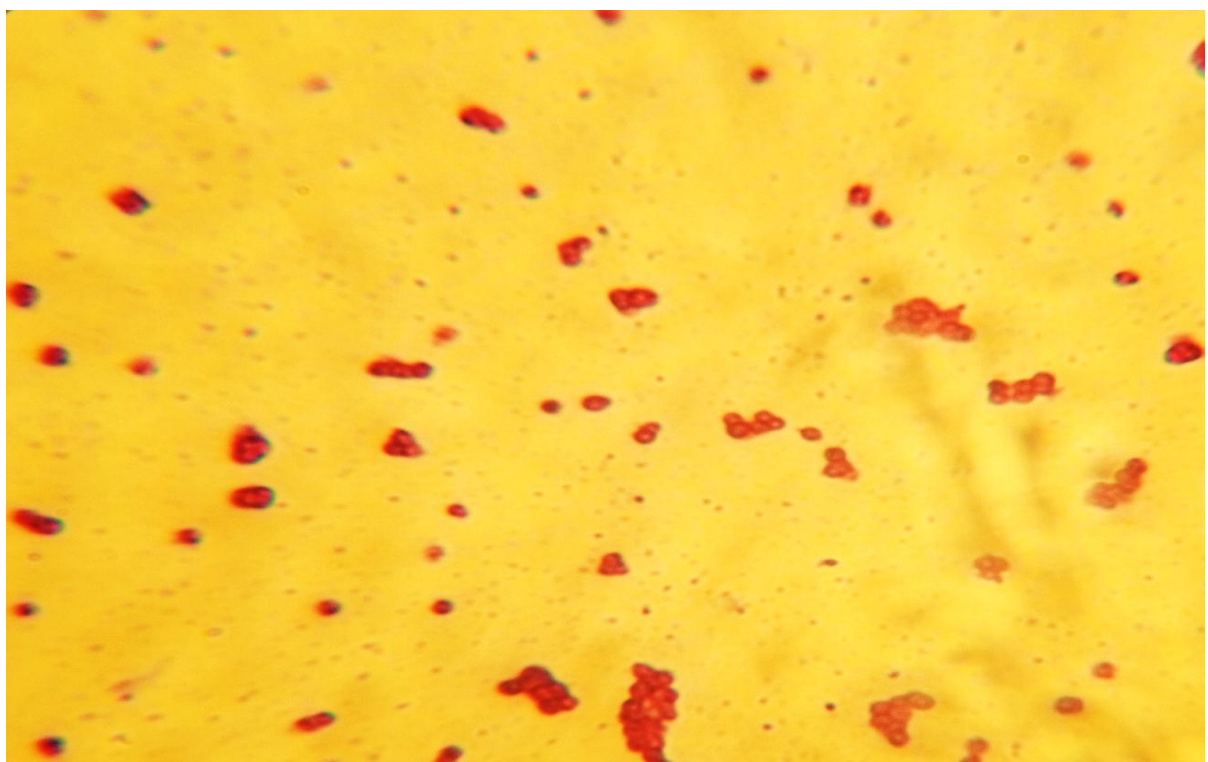


Fig 68. Observation microscopique de l'isolat LnPf19 (G \times 100)

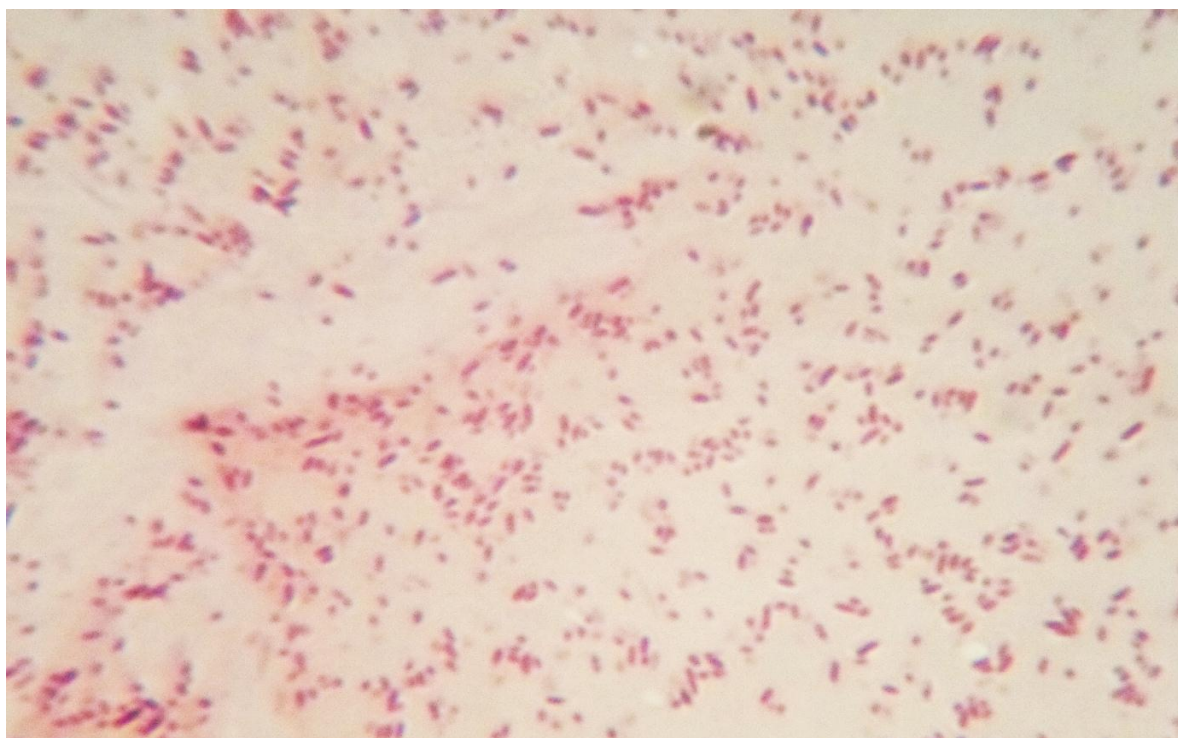


Fig 69. Observation microscopique de l'isolat LnPF44 (G \times 100)

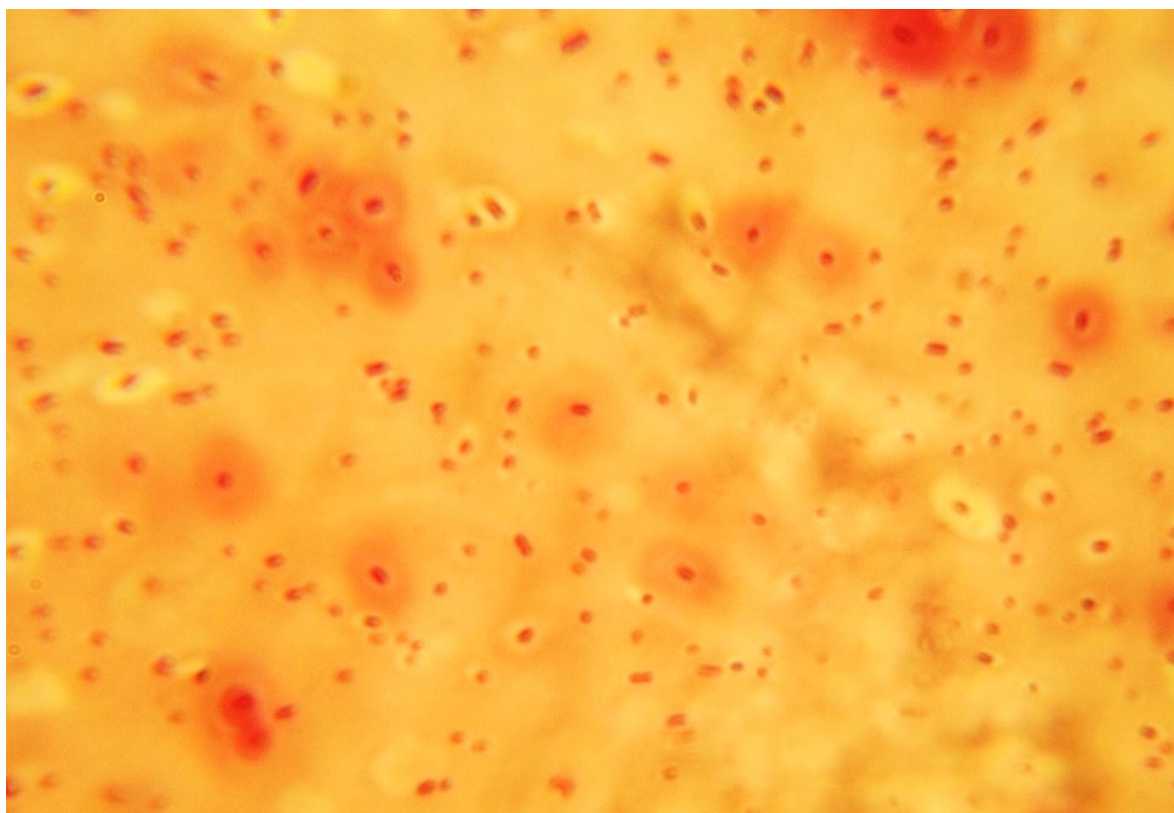


Fig 70. Observation microscopique de l'isolat LnPF46 (G \times 100)

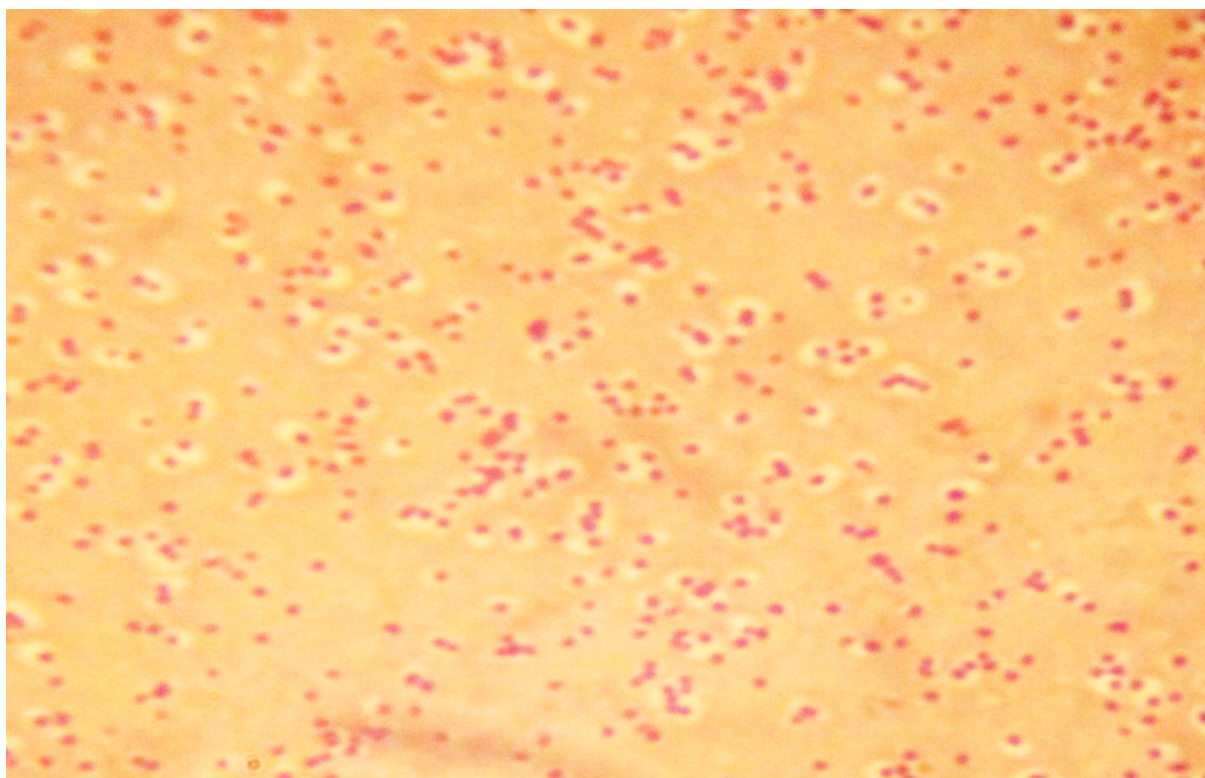


Fig 71. Observation microscopique de l'isolat LnPG2 (G \times 100)

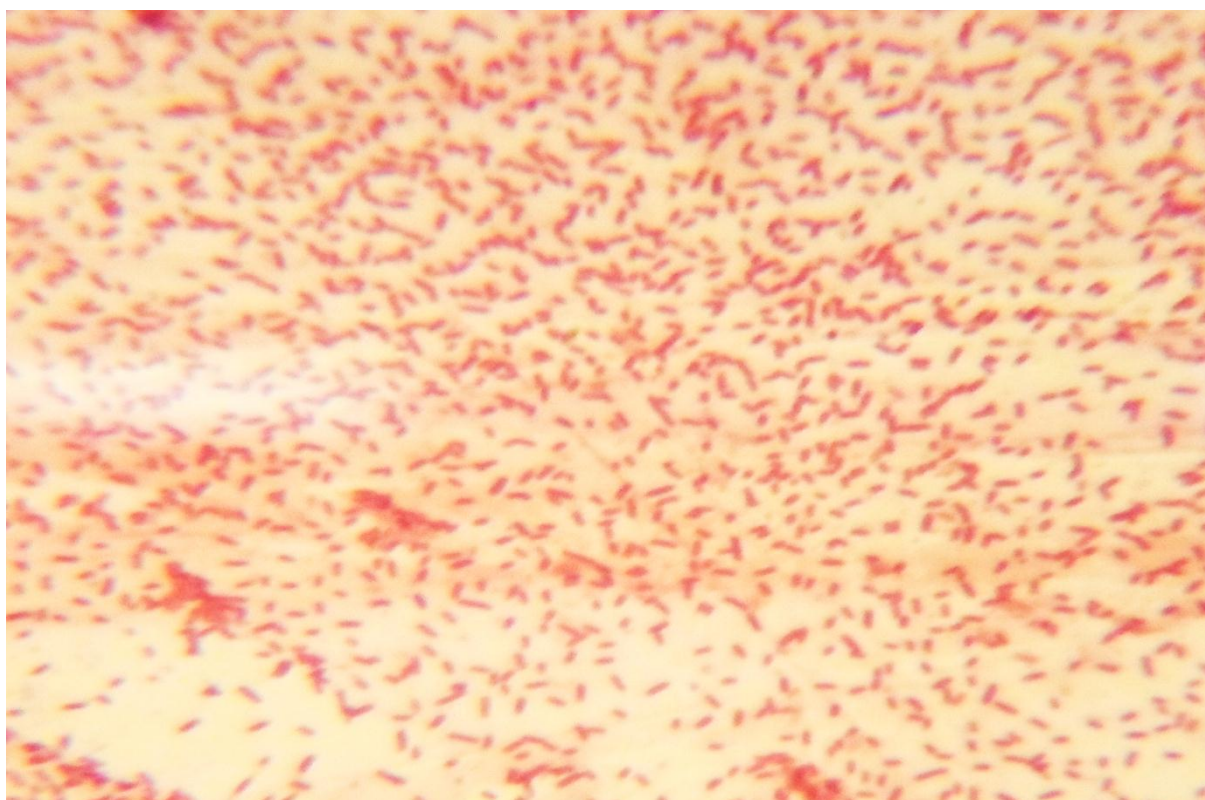


Fig 72. Observation microscopique de l'isolat LnPF18 (G \times 100)

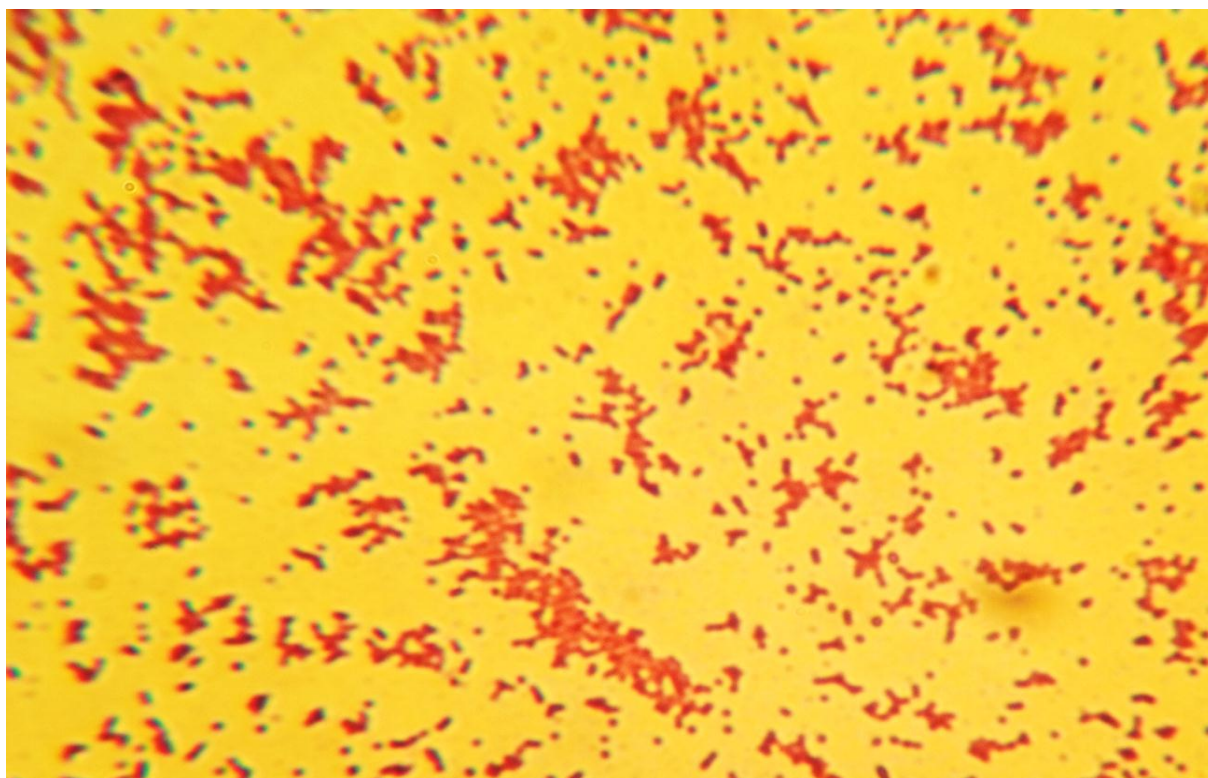


Fig 73. Observation microscopique de l'isolat LnP32 (G \times 100)

Les trois souches LnP1 (*Pseudomonas* sp), LnP2 (*Burkholderia* sp) et LnP44 (*Pseudomonas* sp) ont été sélectionnées comme les meilleurs isolats qui ont résisté aux métaux lourds, capables d'induire des nodules dans leur plante hôte et en plus leur capacité à solubiliser le PR ;

➔ **LnP1** : solubilise **152.69mg de P/l**, induit la formation de **7 nodules/plant** et des valeurs de CMT qui sont ; (**32 mM Zn⁺⁺**), (2 mM Cu⁺⁺), (0.7 mM Cr^{VI+}), (**1 mM Co⁺⁺**), (0.8 mM Cd⁺⁺), (3 mM Pb⁺⁺), (**20mM Hg⁺⁺**) et (**44.75 mM Fe⁺⁺**).

➔ **LnP2** : solubilise 36.69mg de P/l, induit la formation de **6 nodules/plant** et des valeurs de CMT qui sont ; (**32 mM Zn⁺⁺**), (2.5 mM Cu⁺⁺), (1 mM Cr^{VI+}), (2.5 mM Cd⁺⁺), (3 mM Pb⁺⁺), (**20mM Hg⁺⁺**) et (**44.75 mM Fe⁺⁺**).

➔ **LnP44** : solubilise **145.77mg de P/l**, induit la formation de **12 nodules/plant** et des valeurs de CMT qui sont ; (**32 mM Zn⁺⁺**), (2.5 mM Cu⁺⁺), (1 mM Cr^{VI+}), (3 mM Pb⁺⁺), (**20mM Hg⁺⁺**) et (**44.75 mM Fe⁺⁺**).

C'est le premier travail qui a étudié la caractérisation phénotypique et biochimique des rhizobactéries associées à la légumineuse indigène *Lathyrus ochrus*. Cette légumineuse malgré son importance écologique était durant plusieurs années négligées sur le plan microbiologique. Dans cette étude nous avons essayé de dévoiler les capacités importantes de la microflore existante à l'intérieur des nodules de la légumineuse *L. ochrus* et la possibilité de son utilisation dans les sols pollués et/ ou salin et les sols qui ont des déficits en nutriments notamment le phosphate et l'azote.

Nous n'avons pas d'études sur lesquels nous pouvons se baser pour l'étude des symbiotes de *L. ochrus*, mais plusieurs d'autres espèces ont été largement étudiées.

Les espèces du genre *Lathyrus* sont souvent nodulés par la souche *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Mazur et al., 2015), mais la présence de plusieurs autres rhizobia de la classe α , β et δ -Protéobactéries a été confirmée. *R. tropici* a été observée chez *L. sylvestris* et *L. vernus*, les nodules de *L. palustris* contenant des bactéries semblables à *Agrobacterium* sp.

Toutes les bactéries isolées à partir de *L. gemelinii* Fritsh ont été décrites comme étant similaires à *Phyllobacterium myrsinacearum* par la séquence du gène ADN_r16S (Baymiev et al, 2012).

Kuznetsova et al (2015), ont montré la présence de *Phyllobacterium* et *Burkholderia* sp et *Bosea lathyri* dans les nodules de *Lathyrus humilis*, De Meyer et Willems (2012) ont également mentionné la présence de *Bosea lathyri* dans les nodules de *Lathyrus latifolius*. Abdelkrim et al (2018) ont isolé plusieurs espèces voir même *Rhizobium* sp, *Sinorhizobium meliloti* et *Pseudomonas* sp. dans les nodules de *L. sativus*.

Ces études confirment nos résultats à savoir qu'à l'intérieur des nodules de *L.ochrus* nous pouvons trouvé des rhizobia de la classe β et δ -Protéobactéries qui peuvent être des rhizobia nodulant comme ceux qui appartiennent à la classe α -Protéobactéries.

Toutes ces études qui ont mis en évidence la présence de cette diversité bactérienne au sein des nodules du genre *Lathyrus* sont avérées incapables de former des nodules sur les racines de leur plante hôte.

Durant plusieurs années, les chercheurs ont admis que les légumineuses forment des symbioses avec des bactéries appartenant aux rhizobia classique (rhizobia de la classe α -

Protéobactéries), et la possibilité que ces légumineuses peuvent être nodulées par des espèces appartenant à la classe β et/ou δ -Protéobactéries était inacceptable. Vincent (1970) a mis en garde contre la possibilité d'isoler des « contaminants » non rhizobiens à l'intérieur des nodules.

En 2001 deux études ont été publiées (Moulin et al, Chen et al) suggérant que la nodulation de légumineuses ne peut pas se limiter à α -Protéobactéries.

Moulin et al (2001) ont démontré que deux souches *Burkholderia* STM678 et STM815 isolées respectivement des légumineuses Papilinoïdes « *Aspalathus carnosus* » (Afrique du Sud) et « *Machaerium lunatum* » (Guyane française) possèdent des gènes de nodulation et pourraient être des symbiotes nodulants des légumineuses. Ces deux souches n'ont pas été testées pour leur capacité à induire des nodules sur les racines de leur plante hôte ; bien qu'il est démontré qu'elles ont formé des nodules inefficaces sur l'hôte « *Macroptilium atropurpureum* ». Ces deux souches sont ensuite étudiées par Vandamme et al (2002) et sont décrites comme deux nouvelles espèces *B. tuberum* STM678T et *B. phynatum* STM815T, et se sont démontrées capable de noduler efficacement des légumineuses, mais étonnamment pas de leur hôte d'origine.

Des souches de *Burkholderia* et *Cupriavidus* ont été isolés de *Mimosa diplotricha* et *M. pudica* dans le district de Dehong de la province du Yunnan dans le sud subtropical en Chine, cette étude a confirmé que les gènes de nodulation de β -Protéobactéries sont séparés et distincts des gènes de nodulation chez les α -Protéobactéries (Liu et al, 2012).

Liu et al (2014) ont isolé à partir des nodules de *Dipogon lignosus* (Phaseoleae) plusieurs souches et qui selon les séquences des gènes ARNr16S, *recA*, *nifH*, *nodA* et *nodC* ont clairement identifié huit isolats appartenant au genre *Burkholderia* capables de produire des nodules fonctionnels sur les racines de leur plante hôte.

Donc les travaux récents ont confirmé que les espèces du genre *Burkholderia* peuvent noduler les légumineuses mimosoïdes et Papilinoïdes (*Phaseolus vulgaris* « le haricot commun » et *Cyclopia spp* « le thé Honeybush »), en fixant l'azote en tant que bactéroïdes dans les cellules nodulaires (Martinez-Hidalgo, 2017 ; Gayneqwar et al, 2011).

Ces travaux ont confirmé aussi que le genre *Cupriavidus* (surtout *C. taiwanensis*) peut être un véritable symbiote comportant des gènes *nodA* et d'autres gènes *nod* impliqués dans la

nodulation ce qui leur permette d'induire des nodules fonctionnels sur les racines de différentes légumineuses (Martinez-Hidalgo, 2017).

En ce qui concerne la classe des δ -Protéobactéries ce n'est que récemment qu'ils ont trouvé des souches induisant des nodules. Shiraishi et al (2010) ont signalés que les espèces de *Pseudomonas* et *Burkholderia* capables de noduler *Robinia pseudoacacia* (black locust) ; contenant les gènes *nodA* et *nodC*, *nifH* et *nif HD*, qui ont une similitude à ceux d'*Agrobacterium* et de *Mezorhizobium*, suggérant un transfert latéral des gènes.

Des souches du genre *Rhodococcus* isolées à partir des nodules de *Lotus corniculatus* et *Anthyllis vulneraria* en Suède, portent des gènes *nodA* et induisent des nodules sur les racines de *L. corniculatus* (Ampomah et Huss-Danell, 2011).

Le transfert horizontal de gènes de symbiose se produit principalement entre les différents genres de rhizobia commun (α -Protéobactéries) et ne se limite pas à de genres rhizobiens spécifiques. Ce transfert horizontal de gènes de symbiose peut permettre à des bactéries adaptées aux conditions de sol locales de devenir des symbiotes rhizobiens de légumineuses auparavant incompatibles poussant dans ces sols. Par contre le transfert horizontal de gènes de symbiose entre les deux classes α et β -Protéobactéries sont rares (Andrewse et al, 2018) et selon Bontemps et al (2010) ces deux classes ont une origine évolutive différentes ou qu'elles se sont éloignées d'un ancêtre commun.

La plupart des nouvelles bactéries nodulaires appartiennent à des genres qui ont au moins certaines espèces associées aux plantes et qui sont donc susceptibles d'avoir des stratégies moléculaires pour surmonter les défenses des plantes (Zakhia et al, 2006).

Des rapports récents confirment qu'il est fort probable que davantage de bactéries de ce type, capables d'exercer efficacement la nodulation, seront découvertes en dehors des rhizobia traditionnels (Barret et Parker, 2006, Rasolomampianina et al, 2005, Zakhia et al, 2006).

CHAPITRE VIII : L'ISOLAT-LEVURE LnPF38

1. Résultats

1.1. Isolement de LnPF38

Nous avons réussi à obtenir l'isolat LnPF38 à partir des nodules de *L. ochrus* piégés dans un substrat de sol pollué additionné de minerai de fer. L'isolement est réalisé sur milieu YMFP.

1.2. Caractérisation culturelle et morphologique de LnPF38

LnPF38 est un isolat à croissance rapide qui pousse en 24 à 48 heures sur milieu YMFP. Les colonies de l'isolat LnPF38 sont de formes rondes, bombées et lisses avec des bords réguliers, et de couleur blanche avec une taille moyenne de 2- 4mm de diamètre (Fig 74).

Tableau 28. Caractéristiques morphologiques et culturaux de LnPF38

LnPF38	Caractères cultureux	Caractères morphologiques	Sporulation
	Ronde et lisse	Cellules rondes à légèrement ovales	Absence d'ascospore
	Bords réguliers	Bourgeon apical	
	Colonies blanches	Noyau central	
	Croissance à 48 heures	Absence de thalle	
		Absence de pseudo-mycélium	
		Cellules libres	

L'observation microscopique montre des cellules de forme rondes à légèrement ovales, séparées les unes des autres, avec un bourgeon apical et un noyau central. Nous avons constaté l'absence de thalle et de pseudomycélium. Donc ; il s'agit d'une levure (Fig 75, 76 et 77).

Nous avons constaté aussi l'absence d'ascospores (Fig 78). Les résultats sont notés sur le tableau ci-dessus.

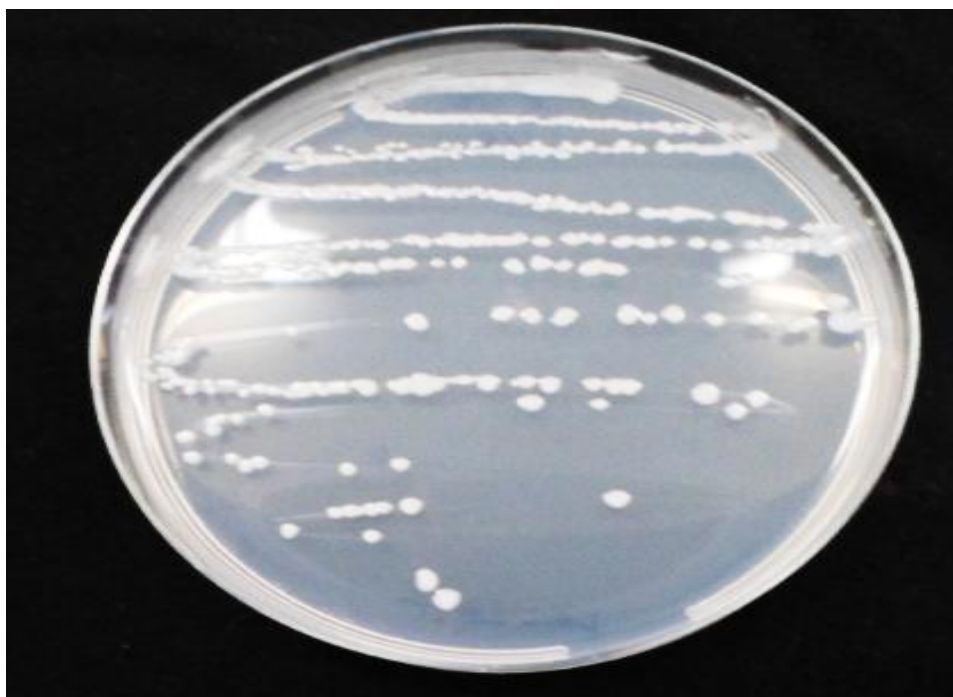


Fig 74. Aspect macroscopique de l'isolat LnPF38

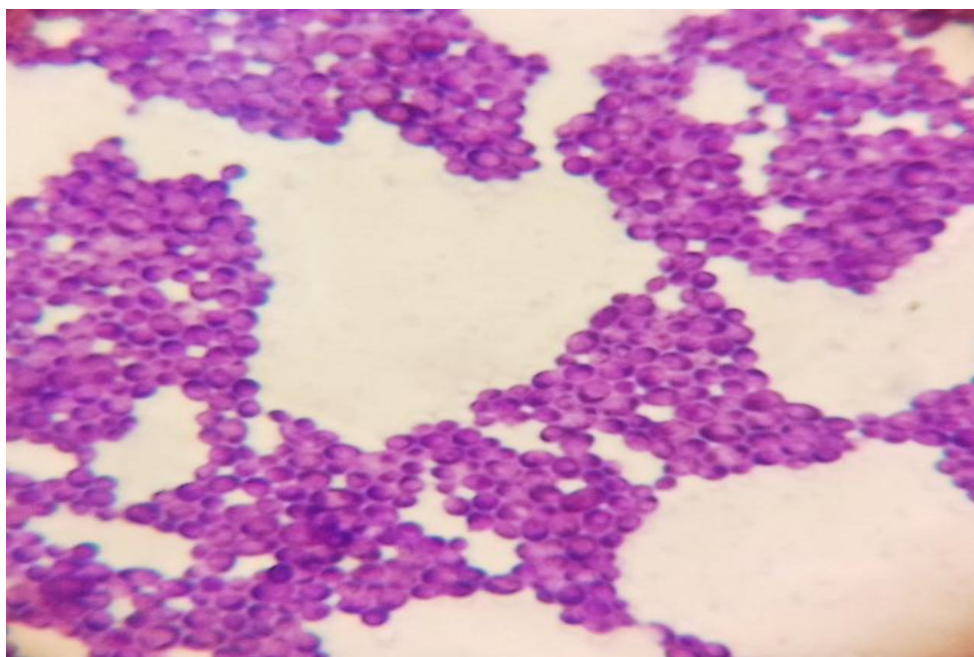


Fig 75. Coloration à la fushine des cellules de l'isolat LnPF38 (G×100)

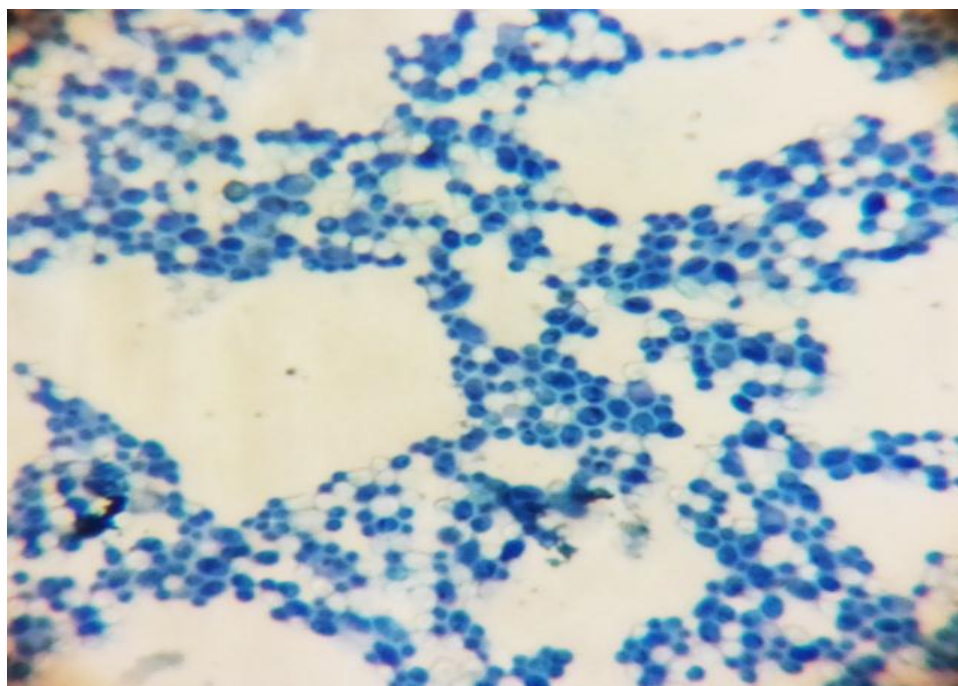


Fig 76. Coloration au bleu de méthylène des cellules de l'isolat LnPF38 (G×100)



Fig 77. Les cellules de l'isolat LnPF38 à l'état frais sous microscope photonique (G× 100)

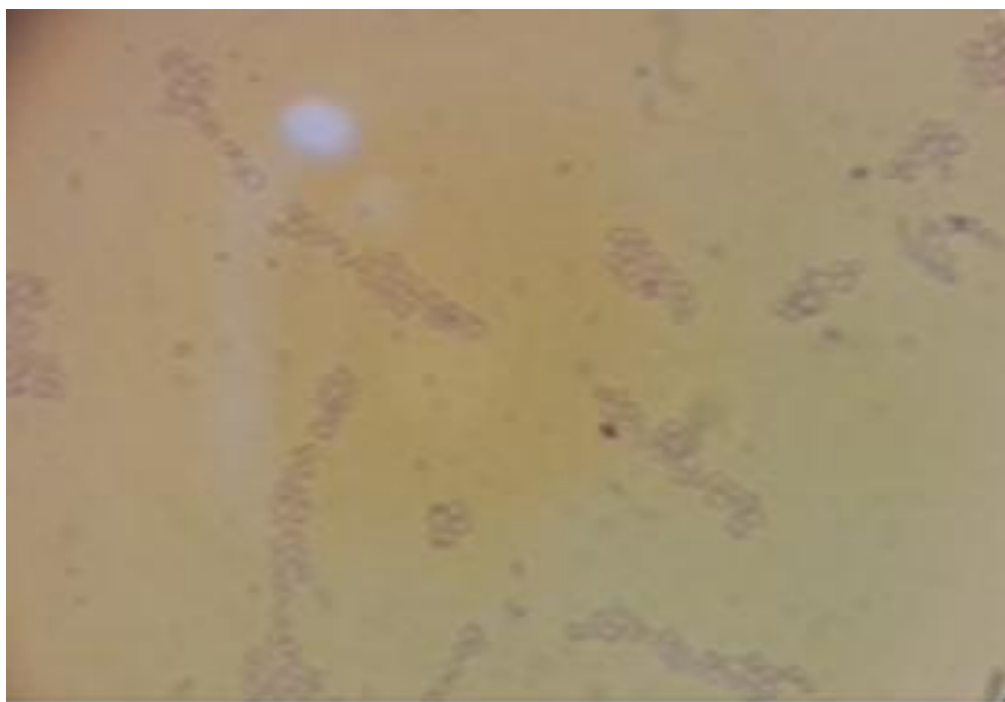


Fig 78. Absence d'ascospores chez la levure LnPF38 sous microscope photonique (G×40)

1.3. Caractéristiques biochimiques

La caractérisation biochimique est basée sur la capacité de l'isolat LnPF38 à assimiler et/ou fermenter 8 sucres : D- glucose, Lactose, D- fructose, D-galactose, Maltose D- saccharose et Amidon (Tableau 29).

Tableau 29. Assimilation et fermentation des glucides

Glucides	Assimilation	Fermentation
D- glucose	+	+
Lactose	+	-
D- fructose	+	+
D-galactose	+	+
Maltose	+	-
D- saccharose	+	-
Amidon	+	-

Les résultats ont montré une bonne croissance de l'isolat LnPF38 sur tous les sucres, ce qui confirme sa capacité à assimiler tous les sucres testés.

La levure LnPF38 ne fermente que trois sucres : le D-glucose, le D-fructose et le D-galactose avec libération de gaz dans la cloche de Durham.

Nous avons aussi observé la formation d'un film à la surface des tubes et autour de la cloche de Durham et cette croissance à la surface du milieu montre que l'isolat LnPF38 est une levure aéro-anaérobie facultative.

1.4. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds

1.4.1. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds sur milieu solide

Les résultats du test de la résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds, nous ont permis de noter la capacité de résistance importante à tous les métaux lourds testés et à toutes les concentrations utilisées sur milieu solide (Fig 79). Le tableau 30 résume les résultats obtenus.

Tableau 30. La concentration maximale de tolérance de l'isolat LnPF38 pour chaque métal testé

La levure LnPF38	
Métaux lourds	CMT (mM)
Zn ⁺⁺	32
Cu ⁺⁺	2.5
Cr ^{VI+}	1
Co ⁺⁺	3
Cd ⁺⁺	2.5
Ni ⁺⁺	2.5
Hg ⁺⁺	20
Pb ⁺⁺	10
Fe ⁺⁺	44.75

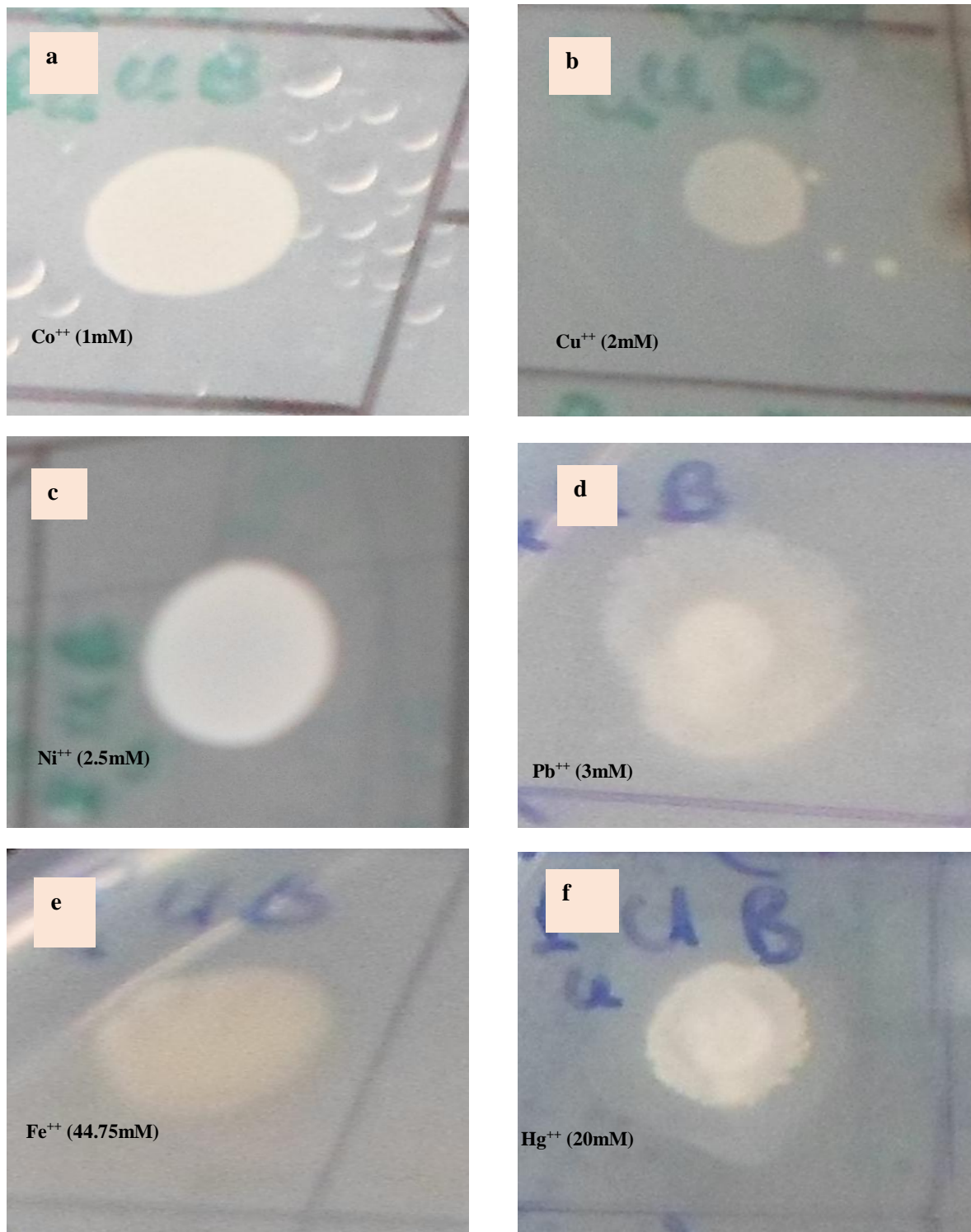


Fig 79. Résistance de la levure LnPF38 aux métaux lourds ; **a.** Co^{++} (1mM), **b.** Cu^{++} (2mM), **c.** Ni^{++} (2.5mM), **d.** Pb^{++} (3mM), **e.** Fe^{++} (44.75mM) et **f.** Hg^{++} (20mM)

Le graphique (Fig 80) représente la croissance de l'isolat LnPF38 pour chaque concentration de chaque métal testé.

L'estimation de la croissance est déterminée selon l'abondance de l'isolat : nous avons noté (3+) pour une bonne croissance, (2+) pour une croissance moyenne et (+) pour une faible croissance.

Le graphique (Fig 80) nous a montré que l'isolat LnPF38 malgré sa résistance à tous les métaux lourds testés, elle n'a pas gardé une bonne croissance pour toutes les concentrations testées. Nous avons remarqué une inhibition de sa croissance pour les concentrations en métaux lourds suivant : 16mM de $[Zn^{++}]$, 1mM de $[Cr^{VI+}]$, 3mM de $[Pb^{++}]$, 0.8mM de $[Cd^{++}]$, 2.5Mm de $[Cu^{++}]$ et 2Mm de $[Co^{++}]$.

1.4.2. Résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds sur milieu liquide

Nous avons testé la résistance de l'isolat LnPF38 à cinq métaux lourds sur milieu liquide ; Zn^{++} , Ni^{++} , Cr^{VI+} , Pb^{++} , Cd^{++} .

Les résultats du test de la résistance de la levure LnPF38 aux métaux lourds sont différents de ceux sur milieu solide.

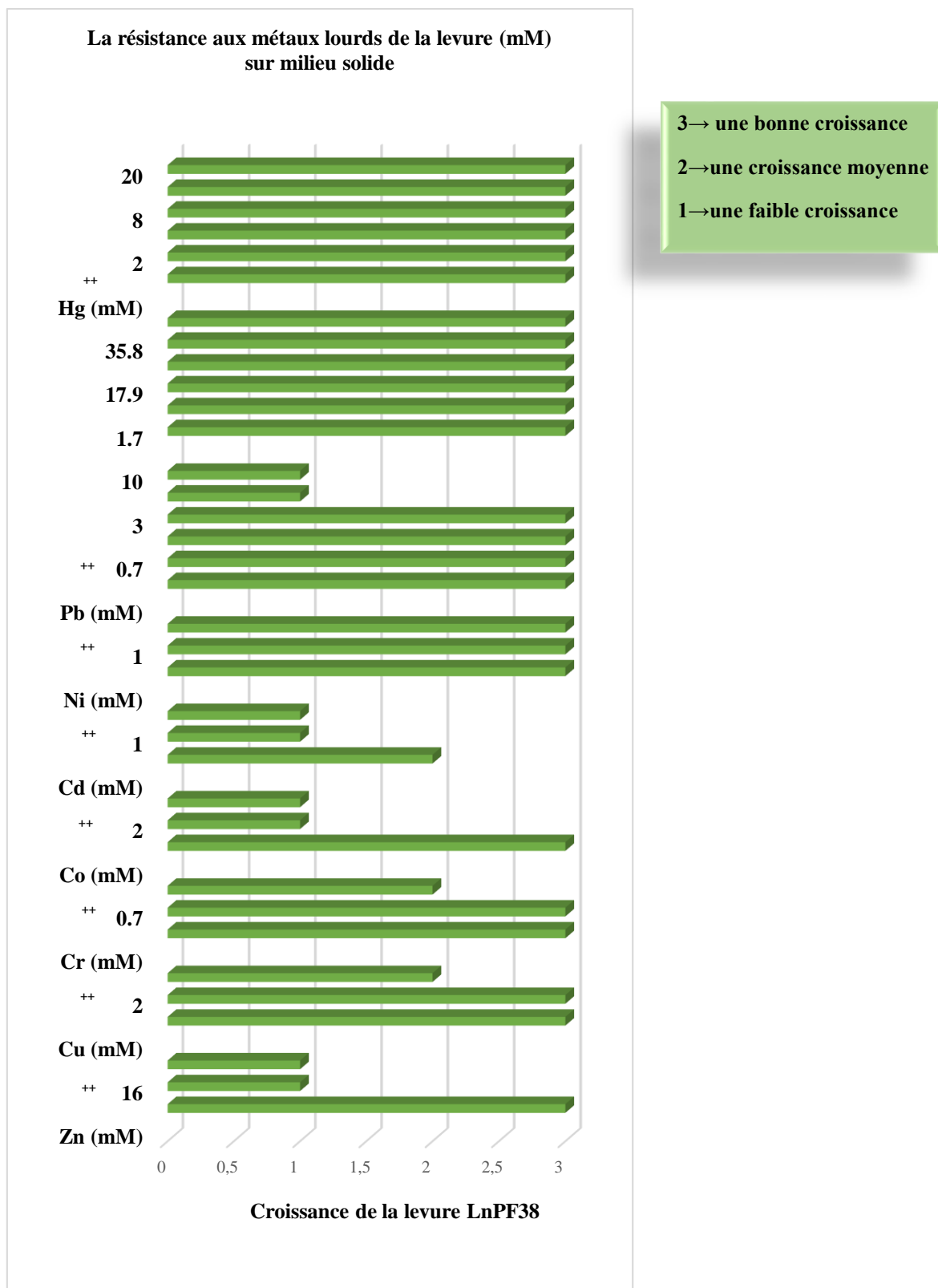


Fig 80. La résistance de la levure LnPF38 aux métaux lourds sur milieu solide

La levure LnPF38 a montré une résistance moins importante par rapport aux résultats notés sur milieu solide avec une inhibition significative de sa croissance. Les CMT de chaque métal sont représentées sur le tableau 31.

Tableau 31. La concentration maximale de tolérance de la LnPF38 pour les métaux

LnPF38				
CMT pour chaque métal sur milieu liquide (mM)				
[Zn ⁺⁺]	[Ni ⁺⁺]	[Cr ^{VI+}]	[Pb ⁺⁺]	[Cd ⁺⁺]
-	1	0.7	3	-

Trois concentrations croissantes ont été utilisées pour chaque métal testé. Les figures 81, 82, 83, 84 et 85 représentent les cinétiques de résistance de la levure LnPF38 en présence de chaque métal.

Chaque figure comporte quatre courbes : une courbe qui représente le blanc sans le métal, et trois courbes qui représentent chacune une concentration différente de chaque métal.

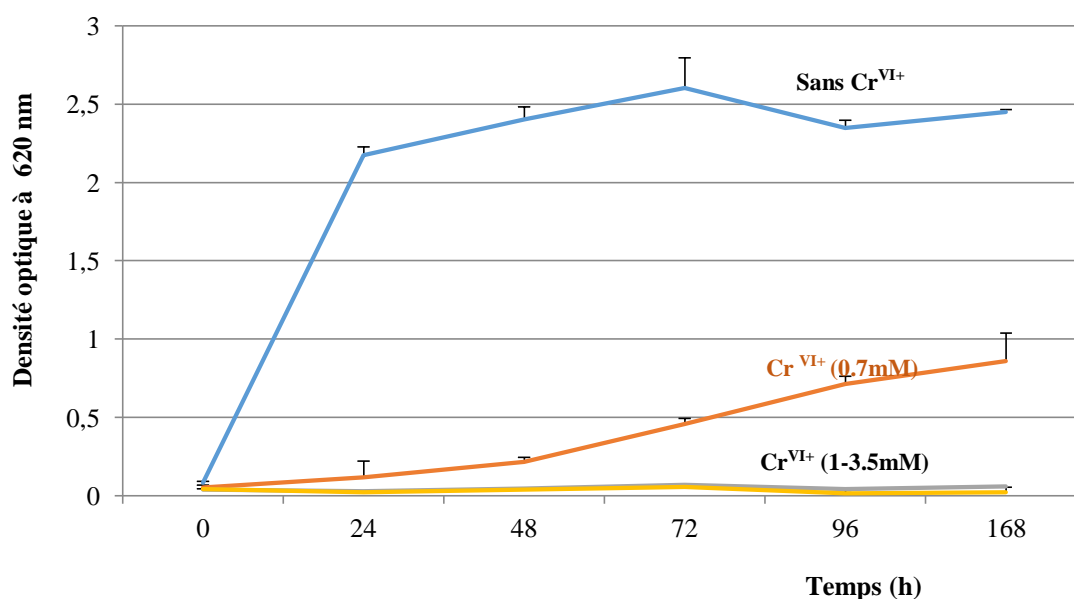


Fig 81. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Cr^{VI+}

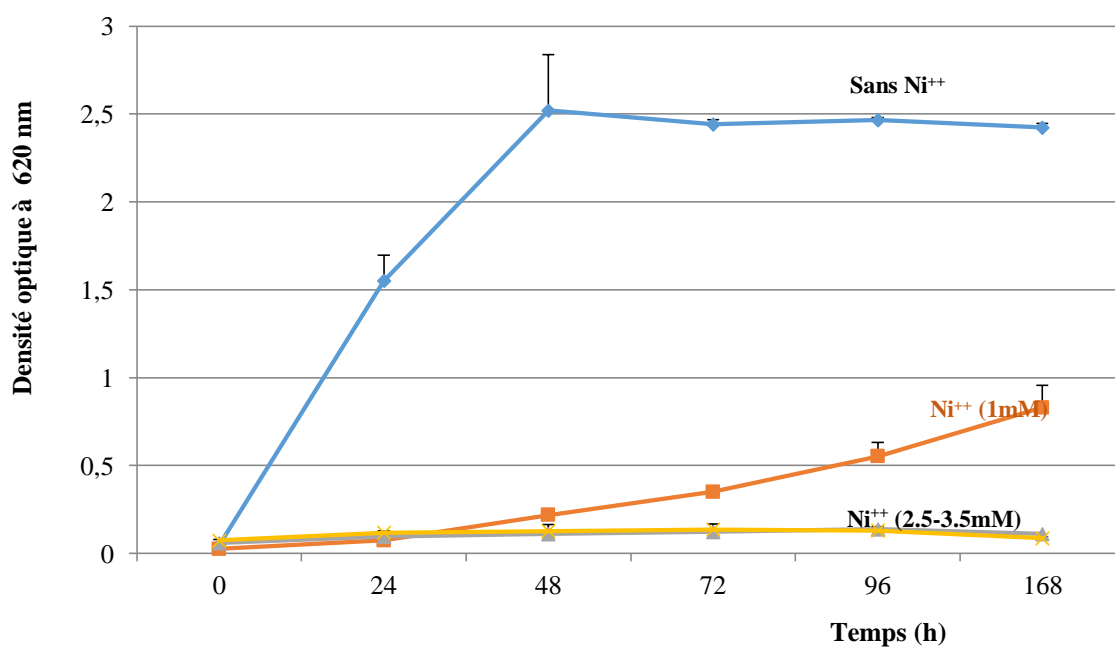


Fig 82. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Ni⁺⁺

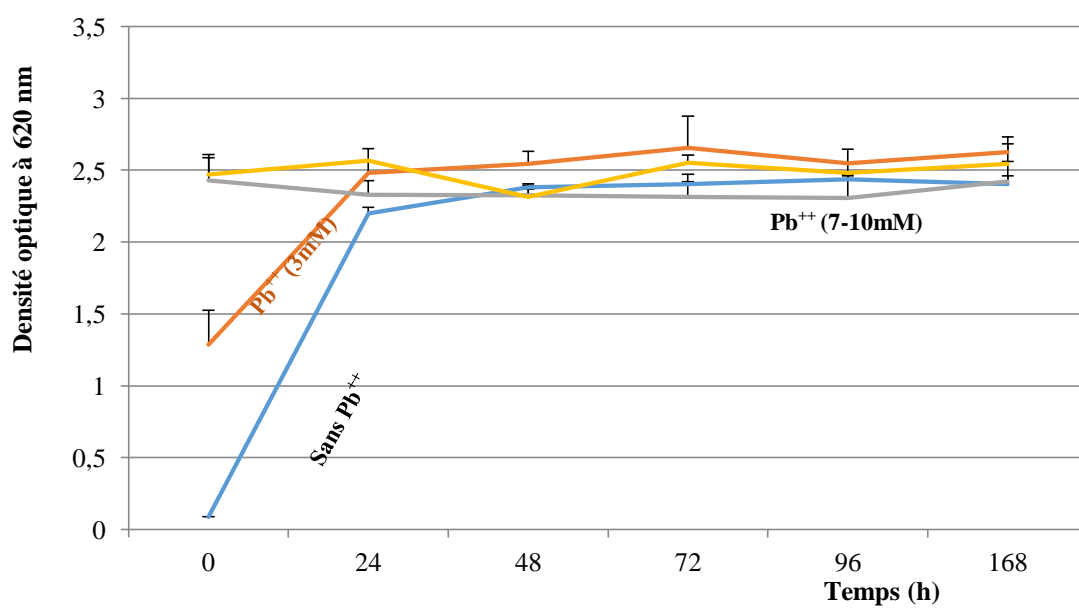


Fig 83. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Pb⁺⁺

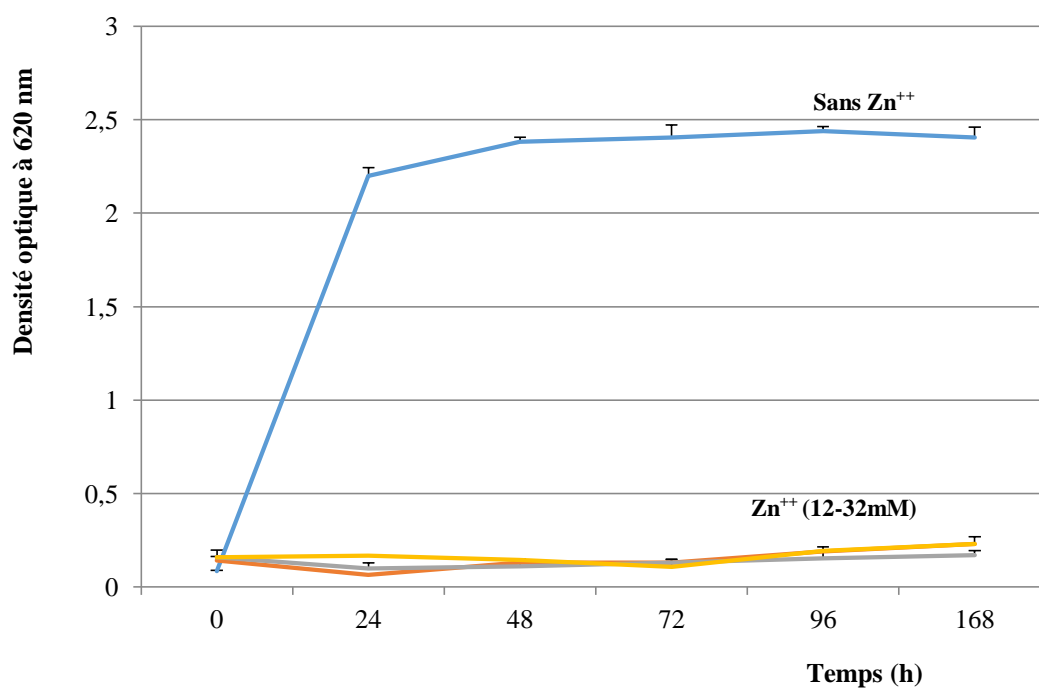


Fig 84. Courbes de résistance de l'isolat LnPF38 au Zn²⁺

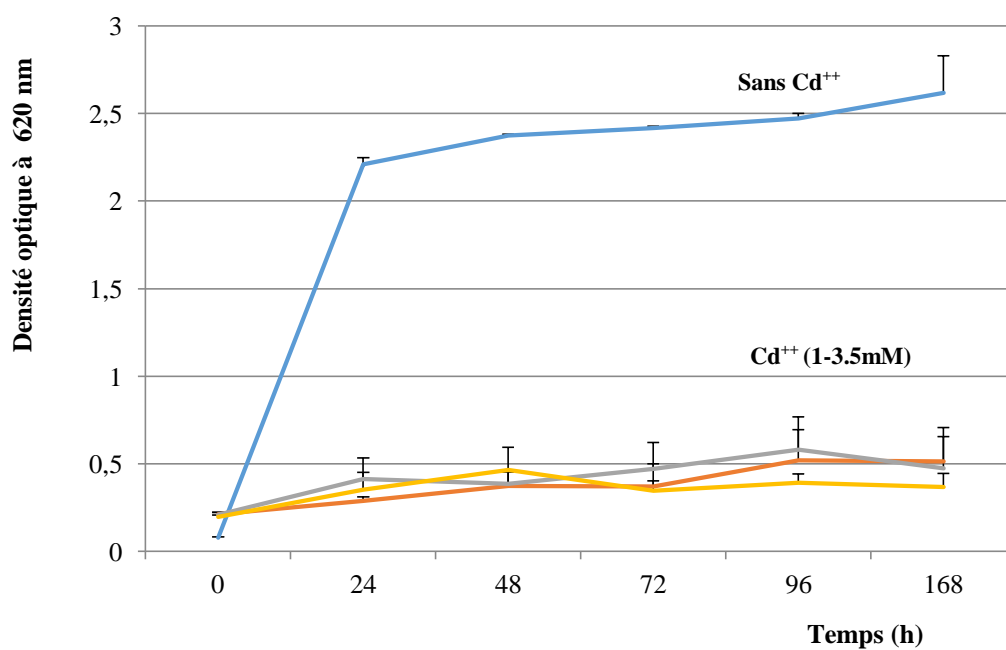


Fig 85. Courbes de résistance de la LnPF38 au Cd²⁺

Nous avons essayé de déterminer la différence entre la résistance de l'isolat LnPF38 aux métaux lourds sur milieu solide et sur milieu liquide. La figure 86 montre la différence de CMT des métaux sur milieu solide et liquide, où nous pouvons noter que la capacité de la levure LnPF38 à résister aux métaux était plus importante sur milieu solide que sur milieu liquide.

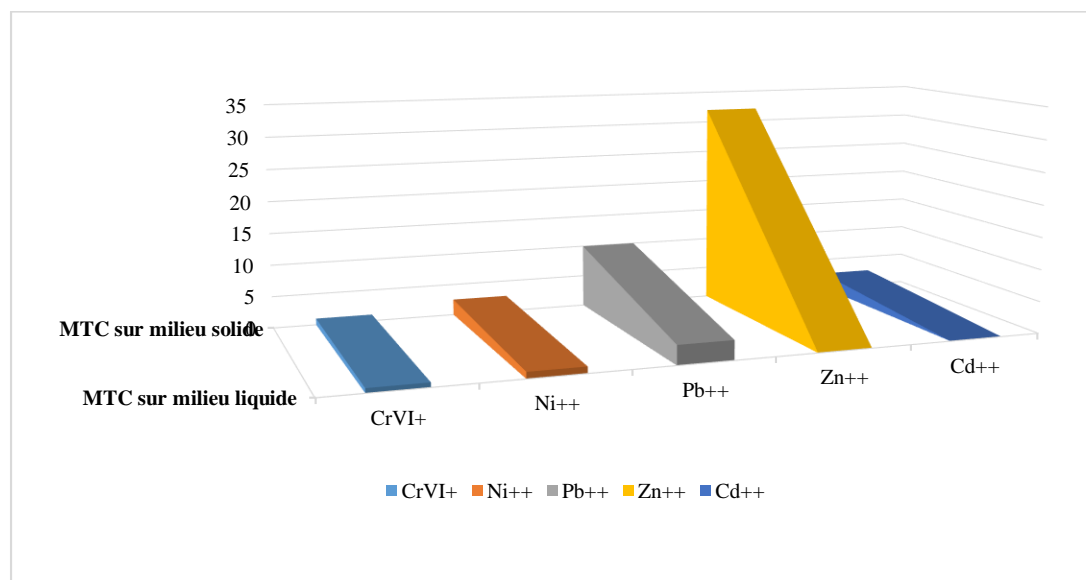


Fig 86. Différence entre les CMT sur milieu liquide et solide de cinq métaux lourds ($\text{Cr}^{\text{VI}+}$, $\text{Ni}^{\text{++}}$, $\text{Pb}^{\text{++}}$, $\text{Zn}^{\text{++}}$ et $\text{Cd}^{\text{++}}$)

Nous avons pu observer la chute des valeurs de CMT en présence de : $\text{Cr}^{\text{VI}+}$ de 1mM sur milieu solide à 0.7mM sur milieu liquide, $\text{Pb}^{\text{++}}$ de 10 à 3mM, $\text{Ni}^{\text{++}}$ de 2.5 à 1mM, et la grande inhibition était en présence de $\text{Zn}^{\text{++}}$ de 32mM sur milieu solide à l'inhibition totale sur milieu liquide et $\text{Cd}^{\text{++}}$ de 2.5mM à l'inhibition totale sur milieu liquide.

1.5. Solubilisation des phosphates inorganiques par l'isolat LnPF38

1.5.1. Solubilisation sur milieu solide

Le test de solubilisation des phosphates inorganiques sur milieu solide a montré une très faible capacité de la levure LnPF38 à solubiliser le CaHPO_4 (PMC) et le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PTC) (Fig 87).

La levure LnPF38 ne peut solubiliser les phosphates inorganiques que sur milieu NBRIP sans extrait de levure ; et l'addition de 0,1g/l d'extrait de levure n'a pas amélioré la solubilisation.



Fig 87. Zone claire autour de la colonie de l'isolat LnPF38 sur milieu NBRIP solide

1.5.2. Solubilisation sur milieu liquide

La solubilisation de PTC et de PMC sur milieu liquide par la levure LnPF38 a montré un pouvoir important de la solubilisation des phosphates inorganiques. La concentration de phosphate libéré dans le milieu est de **163,73mg/l** de phosphate libéré à partir de PMC et de **108,92mg/l** de phosphate libéré à partir de PTC (Figure 88).

La levure LnPF38 a acidifié le milieu de culture, les valeurs de pH mesurées ont diminué de 7 jusqu'à 5,18 (en utilisant le PMC comme seule source de phosphate) et 5,71 (en utilisant le PTC comme seule source de phosphate).

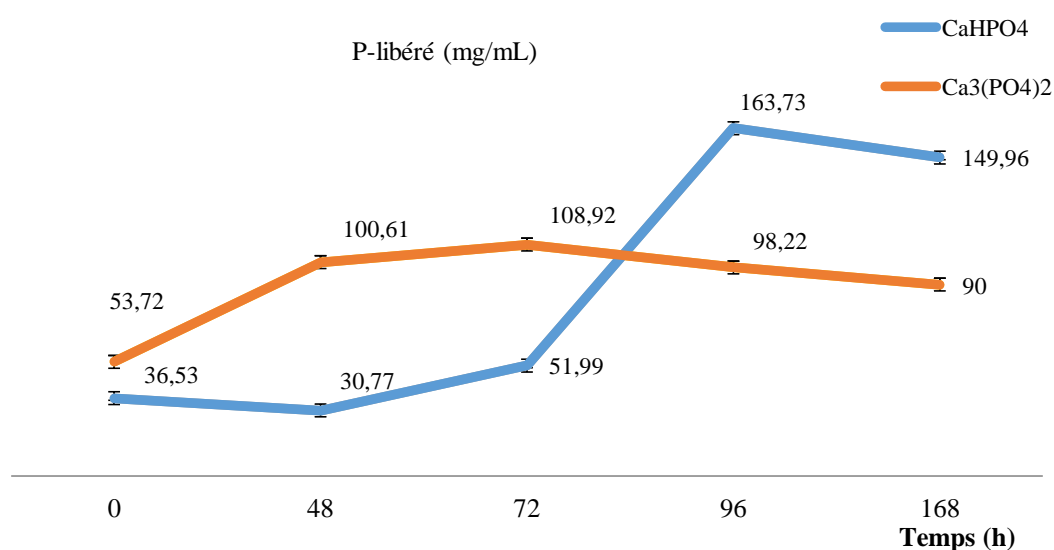


Fig 88. Solubilisation de PMC et PTC par la levure LnPF38

2. Discussion

Le nodule abrite plusieurs bactéries en tant que symbiotes ou endophytes et avec son apport abondant en nutriments et son environnement de protection fermé constitue une opportunité attrayant pour une grande variété de bactéries non symbiotiques capables de coloniser les plantes de manière opportunistes (Sprent, 2009).

Très peu de publications concernant la présence de levures dans les nodules racinaires des légumineuses. La levure LnPF38 est isolée à partir des nodules de *Lathyrus ochrus* dans un substrat de sol pollué additionné de minerai de fer avec une multitude d'autres bactéries.

Donc nous avons montré dans cette étude la présence de levure dans les nodules avec les rhizobia.

Des études ont montré que les levures possèdent plusieurs mécanismes de détoxification principalement ; l'immobilisation et la mobilisation utilisées pour la bioremédiation des métaux.

Vu l'intérêt croissant de l'application des levures comme bioinoculants dans l'agriculture pour améliorer la qualité des sols, et dans ce contexte nous avons étudié la capacité de la levure LnPF38 à résister aux métaux lourds et à solubiliser les phosphates inorganiques.

L'étude de la capacité de la levure LnPF38 à résister aux métaux lourds à des concentrations croissantes, a révélé sa capacité très importante à résister à tous les métaux testés et à toutes les concentrations utilisées sur milieu solide avec une inhibition de sa croissance pour les concentrations élevées.

Ces résultats nous ont incité à poursuivre nos tests sur milieu liquide pour confirmer cette résistance et pour estimer l'inhibition de la croissance de la levure LnPF38 induites en présence de métaux lourds.

D'après les résultats obtenus sur les courbes de résistance, nous pouvons conclure que l'inhibition de la croissance de l'isolat LnPF38 était très importante, ce qui explique la toxicité de ces métaux et la sensibilité de la levure.

Malgré cette grande toxicité, l'isolat LnPF38 a pu quand même résister à certaines concentrations plus au moins importantes.

Les CMT de la résistance de l'isolat LnPF38 sur milieu solide sont ; Zn⁺⁺ (32 mM), Cu⁺² (2.5mM), Cr^{VI+} (1mM), Co⁺⁺ (3mM), Cd⁺⁺ (2.5mM), Ni⁺⁺ (2.5mM), Hg⁺⁺ (20mM), Pb⁺⁺ (10mM), Fe⁺⁺ (44.75mM).

L'isolat LnPF38 a résisté au Fe⁺⁺, Hg⁺⁺ et Ni⁺⁺ à toutes les concentrations testées sans aucune inhibition de la croissance de l'isolat sur milieu solide. Par contre les autres métaux ont provoqué une forte inhibition de la croissance de l'isolat LnPF38 à partir des concentrations suivantes : Zn⁺⁺ (16 mM), Cu⁺⁺ (2.5mM), Cr^{VI+} (1mM), Co⁺⁺ (2mM), Cd⁺⁺ (0.8mM), Pb⁺⁺ (3mM).

Les CMT déterminées sur milieu liquide sont : Cr^{VI+} (0.7mM), Ni⁺⁺ (1mM), Pb⁺⁺ (3mM) avec une inhibition totale de la croissance de l'isolat LnPF38 en présence de Zn⁺⁺ et Cd⁺⁺. Cette grande inhibition peut être expliquée par le besoin de l'isolat LnPF38 à une période d'adaptation plus longue.

En conditions expérimentales, le test de la résistance aux métaux lourds sur milieu liquide est mené durant 7 jours, ce qui pourrait être une courte durée pour s'adapter à de telles concentrations élevées en métaux lourds.

Par contre en conditions naturelles, l'exposition de la levure LnPF38 aux métaux lourds va développer une forme d'adaptation qui est définie comme la période nécessaire durant laquelle la levure va s'adapter ou tolérer les métaux et peut même résister à ces métaux.

Une étude menée par Irawati et al (2016), montre que la levure ES10.4 a été isolée des eaux usées en Indonésie avec des CMI de : Cu⁺² (13mM), Hg⁺² (1.5mM), Cd⁺² (0.3mM), Pb⁺² (17mM).

Muneer et al (2007) ont isolé aussi trois levures d'effluents industriels de tanneries, ces isolats sont : CMBLY-Cr1 (*Candida etchellsii*), CMBLY-Cr4 (*Rhodotorula graminis*) et CMBLY-Cr8 (*Candida glabrata*). Ces levures résistent au ; Cr⁺⁶ (2mg/l), Hg⁺² (0.2mg/l), Pb⁺²(1-1.3mg/l), Cd⁺² et Cu⁺² (0.6-0.8mg/l), Co⁺² (0.4-0.5mg/l), Ni⁺² (0.3-0.6mg/l) et Zn⁺² (0.3-0.5mg/l).

En comparant nos résultats avec ceux des autres travaux, nous pouvons dire que l'isolat LnPF38 pourrait être un bon candidat qui peut être utilisé pour la détoxification des sols pollués par le Fe⁺⁺, Hg⁺⁺, Pb⁺⁺, Cr^{VI+} et Ni⁺⁺.

Pour la solubilisation des phosphates inorganiques, nous avons montré que la solubilisation des phosphates sur milieu solide était très faible en la comparant avec celle sur milieu liquide. Ceci peut être expliqué par la disponibilité des phosphates inorganiques sur milieu liquide par rapport au milieu solide.

La levure LnPF38 a provoqué une acidification du milieu de culture en diminuant les valeurs de pH de 7 jusqu'à 5.18 (en utilisant le CHP) et 5.71 (en utilisant le PTC). Ces résultats sont similaires avec ceux mentionné par Kuo et al (2018) ; ils ont trouvé que les phosphates solubles sont plus solubilisés dans le milieu à pH bas, les auteurs ont donc conclu que la capacité de solubilisation des phosphates par les levures sont étroitement liée avec la diminution des valeurs de pH du milieu.

Hesham et Hashem (2011) ont trouvé une grande variation dans la capacité des levures à solubiliser les phosphates inorganiques et ils ont expliqué cette variation par la nature des acides organiques produits et leurs concentrations. Selon les résultats de cette étude l'acide citrique est l'acide le plus actif dans la solubilisation des phosphates insolubles.

La levure LnPF38 fermente les glucides, donc elle a la capacité à produire des acides organiques.

Ce qui souligne l'importance des levures comme des micro-organismes bien connu pour la production d'acides organiques, ainsi que leur taux de survie élevé dans des conditions de sol extrêmes, dans la transformation de phosphates de roche et de carbonate insoluble, entraînant une augmentation du phosphore, du fer et des autres micronutriments disponibles (Vasileva et al, 2000).

La levure LnPF38 a libéré **163.73mg/l** et **108.92mg/l** de phosphate à partir de PMC et de PTC respectivement. Nous avons remarqué une chute de la concentration de phosphate libéré dans le milieu de 163.73 à 149.96mg/l de phosphate provenant de PMC et de 108.92 à 98.22 jusqu'à 90mg/l de phosphate provenant de PTC. Soit une diminution d'une concentration de 13.77 et 18.92mg/l pour le phosphate libre provenant de PMC et de PTC respectivement.

Cette concentration relativement importante est consommée par la levure LnPF38. Ce qui est confirmé par Kumar et al (2016) qu'au cours de la solubilisation des phosphates inorganiques, une partie du phosphore libéré est assimilée par les microorganismes, mais la

quantité solubilisée est supérieurs aux besoins des microorganismes et cet excédant de phosphore libéré est mis à la disposition des plantes.

La recherche menée par Nakayan et al (2013) a montré la capacité des levures à solubiliser le PTC, ils ont trouvé que *Meyerozyma guilliermondii* présentait la plus grande capacité de solubilisation du phosphate 190,9mg/l suivie de *M caribbica* 170,4mg/l et *Rhodotorula mucilaginosa* 97,7mg/l.

De plus, selon New et al (2013), la solubilisation du phosphate inorganique pour quatre levures se situe entre 100 et 110ppm. Même Mundra et al (2011) ont trouvé dans leurs études que *Rhodotorula* sp peut solubiliser 278,38mg/l de PTC. Al-Falih (2005) a montré que la levure *Geotrichum capitatum* a solubilisé 45mg/l, *Rhodotorula rubra* 38mg/l, *Geotrichum candidum* et *Rhodotorula minuta* 2 et 4mg/l respectivement.

En comparant ces résultats avec nos résultats nous pouvons conclure que la levure LnPF38 est un bon candidat pour la solubilisation des phosphates inorganiques avec des concentrations entre **163.73mg/l** et **108.92mg/l** de phosphate libéré à partir de PMC et PTC respectivement.

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

La recherche de solutions alternatives pour mettre fin à l'utilisation croissante des engrais chimiques et pesticides est l'une des préoccupations majeures dans le monde actuel et cela dans le but de préserver la qualité de l'environnement et la santé humaine.

L'utilisation des microorganismes symbiotiques ou endophytes présents dans les nodules racinaires des légumineuses est l'une des solutions les plus prometteuses. La capacité de ces microorganismes ne se limite pas uniquement à fournir une source d'azote assimilable aux plantes en fixant l'azote atmosphérique, mais plusieurs autres fonctions ont été mises en évidence par différentes études entre autre ; fournir une source de P assimilable aux plantes en libérant les phosphates liés dans le sol, la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds et la production de phytohormone.

Une quarantaine de plants de la légumineuse *Lathyrus ochrus* L. sont cultivés sur substrat composé de sol prélevé de la localité de Sidi Amar près du Complexe Sidérurgique « Sider El-Hadjar » et additionné de minerai de fer. Les nodules racinaires des plants développés ont servi à isoler des bactéries piégées.

Cinquante et une rhizobactéries et une levure sont piégées par les nodules de *Lathyrus ochrus*. Leur isolement est réalisé sur trois milieux différents ; YMFP (YEMA modifié additionné des deux minerais fer et PR), GA (Gélose à l'acétamide) et BCM115 (*Bosea Culture Medium 115*).

Ces rhizobactéries ont subi des tests pour évaluer leur capacité à solubiliser les phosphates inorganiques sur milieu solide et surtout le phosphate roche (minerai).

Le test de la solubilisation des phosphates sur milieux solides a permis de sélectionner 26 isolats, mais aucun isolat n'a pu solubiliser le phosphate roche sur milieu solide. Ce test a été suivi par le test de solubilisation du phosphate roche sur milieu liquide, pour déterminer les quantités de phosphate libres dans le milieu.

Neuf isolats ont le pouvoir de solubiliser le phosphate roche sur milieu liquide avec des valeurs allant jusqu'à 206.98mg/l.

Aussi ces 26 isolats ont été testés pour leur résistance aux métaux lourds : Co^{++} , Ni^{++} , Cr^{+VI} , Cu^{++} , Pb^{++} , Fe^{++} , Cd^{++} et Zn^{++} . Les résultats obtenus montre que 100% des isolats ont résisté au Fe^{++} jusqu'à 47mM et au Hg^{++} jusqu'à 20mM sans aucune inhibition de la croissance.

Pour les autres métaux les isolats ont suivi l'ordre de résistance suivant : $Pb^{++} > Cr^{+VI} > Cu^{++} > Ni^{++} > Cd^{++} > Zn^{++} > Co^{++}$ (de la résistance la plus importante jusqu'à la résistance la plus faible).

Nous avons aussi testé la tolérance à la salinité des neuf isolats et les résultats nous ont permis de classer ces isolats en trois groupes :

- Les isolats résistant aux métaux et qui ont toléré 5% de NaCl sont ; LnPF44, LnPG1 et LnPG2
- Les isolats résistant moyennement aux métaux et qui ont toléré 5% de NaCl ; LnPF14, LnPF19, LnPF46 et LnPF13.
- Les isolats résistant faiblement aux métaux et qui ont toléré que 2.5% de NaCl ; LnPF32 et LnPF18.

Nous pouvons dire que la majorité des isolats qui résistent aux métaux tolèrent de fortes concentrations en NaCl.

Les isolats ont également subi des tests d'infectivité par inoculation dans leur plante hôte et les résultats obtenus sont positifs et confirment que ce sont des symbiotes capables de noduler leurs plantes hôtes. L'ensemble des nodules formés sont de couleur blanche et en général les symbiotes non efficaces forment des nodules blancs.

Nous avons aussi étudié les caractères phénotypiques et biochimiques et ce pour les neuf isolats qui ont solubilisé le phosphate roche pour essayer de les identifier.

Nous avons observé que ces isolats sont en dehors du groupe de rhizobia traditionnel, et les résultats de l'Api 20E, l'Api 20NE, les tests de catalase, oxydase, croissance sur GPA, absorption du RC, alcalinisation ou acidification du milieu YEMA additionné de BBT et la tolérance à la salinité ont confirmé cette hypothèse.

Selon les résultats obtenus ; les neuf isolats appartiendraient aux genres *Pseudomonas*, *Burkholderia* ou *Cupriavidus* sp..

En ce qui concerne la levure, nous avons réalisé presque les mêmes tests que pour les rhizobactéries.

Nous avons commencé par des tests généraux cultureux et morphologiques, suivis par le test de la résistance aux métaux lourds où la levure a montré un pouvoir important pour la résistance aux métaux lourds sur milieu solide.

Nous avons ensuite poursuivi ces tests par la résistance aux métaux lourds sur milieu liquide, les résultats montrent qu'une grande inhibition de la croissance de la levure par rapport au témoin. Aussi les valeurs CMT sont plus basses par rapport au milieu solide ; Cr^{VI+} (0.7mM), Ni⁺⁺ (1mM) et Pb⁺⁺ (3mM) mais la levure a quand même conservé son pouvoir de résistance.

La capacité de la levure à solubiliser les phosphates inorganiques a été testée sur milieu solide et liquide, où nous avons observé une zone claire très réduite sur milieu solide, mais sur milieu liquide ; la levure a solubilisé les phosphates inorganiques jusqu'à des valeurs de 163.73mg/l de P libéré à partir de CaHPO₄ et de 108.92mg/l de P libéré à partir de Ca₃(PO₄)₂.

Nous pouvons ainsi conclure de notre étude que le *Lathyrus ochrus* est une légumineuse qui représente l'un des meilleurs hôtes pour isoler ces microorganismes qui ont des caractéristiques favorisant la croissance des plantes, la solubilisation des phosphates chimiquement purs et le PR, la résistance aux métaux lourds et l'osmotolérance.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le champ et pourraient également servir de base pour des travaux ultérieurs:

- Identification moléculaire des isolats (16S rDNA, ITS et gènes de ménage)
- Séquençage des gènes de nodulation (gènes *nod*) et de fixation d'azote (gènes *nif*)
- Séquençage des gènes de résistances aux métaux lourds
- Utilisation des isolats pour noduler d'autres espèces de légumineuses et surtout les espèces alimentaires
- Utilisation des isolats dans des essais de culture sans engrais phosphatés
- Utilisation des isolats dans des essais de dépollution des sols en culture sous serre puis au champ.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-alla M.H, Solubilization of Rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, *Folia Microbial*, 1994, 39 (1): 53-56.
- AbdelKrim S, Jebera S.H, Soudani O, Chiboub M, Abid G, Mannai k et Jebera M, Heavy metal accumulation in *Lathyrus sativus* growing in contaminated soils and identification of symbiotic resistant bacteria, *Archives of Microbiology*, 2018, <http://doi.org/10.1007/S00203-018-158-4>.
- Abou-Shanab R.A, Ghazlan H, Ghanem K, Moawad H et Behaviour of bacterial populations isolated from rhizosphere of *Diplachne fusca* dominant in industrial sites, *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21 (6-7): 1095–1101.
- Abu-Zaitoon Y et Sallal A.K, Ecological studies on nitrogen fixing bacteria from leguminous plants at the north of Jordan, *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (15): 3656-3661.
- Agrawal P.K, Agrawal S, Kundan R et Bhatt M, Application and perspective of plant growth promoting rhizobacteria in development of sustainable agriculture. *International Journal of current research*, 2014, 6 (10): 9044-9051.
- Ahemad M et Khan M.S, Toxicity assessment of herbicides quizalafop-p-ethyl and clodinafop towards *Rhizobium* pea symbiosis, *Bull Environ Contam Toxicol*, 2009a, 82: 761-766.
- Ahemad M et Khan M.S, Effect of insecticide-tolerant and plant growth promoting *Mesorhizobium* on the performance of chickpea grown in insecticide stressed alluvial soils, *J. Crop Sci. Biotechnol*, 2009b, 12: 213-222.
- Ahemad M et Khan M.S, Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium leguminosarum*, *Crop Prot*, 2010a, 29: 325-329.
- Ahemad M et Khan M.S, Ameliorative effects of *Mesorhizobium* sp. MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress, *Pestic. Biochem. Physiol*, 2010b, 98: 183-190.

- Ahemad M, Khan M.S, Improvement in the growth and symbiotic attributes of fungicide-stressed chickpea plants following plant growth promoting fungicide-tolerant Mesorhizobium inoculation, Afr. J. Basic Appl. Sci, 2010c, 2: 111-116.
- Ahemad M et Khan M.S, Insecticide-tolerant and plant growth promoting Rhizobium improves the growth of lentil (*Lens esculentus*) in insecticide-stressed soils, Pest Manag. Sci, 2010d, 67: 423-429.
- Ahemad M et Khan M.S, Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species, Ann. Microbiol, 2010e, 60: 735-745.
- Ahemad M et Khan M.S, Influence of selective herbicides on plant growth promoting traits of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* strain PS2, Res. J. Microbiol, 2010f, 5: 849-857.
- Ahemad M et Khan M.S, Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. Eurasia, J. Biosci, 2010g, 4: 88-95.
- Ahemad M et Khan M.S, Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea-*Rhizobium* symbiosis, Sci. Hortic, 2011a, 129: 266-272.
- Ahemad M, Khan M.S, Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lens esculentus*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRL3, Ecotoxicology, 2011b, 20: 661-669.
- Ahemad M et Khan M.S, Plant growth promoting fungicidetolerant Rhizobium improves growth and symbiotic characteristics of lentil (*Lens esculentus*) in fungicide-applied soil, J. Plant Growth Regul, 2011c, 30: 334-342.
- Ahemad, M et Khan M.S, Effect of pesticides on plant growth promoting traits of greengram-symbiont, *Bradyrhizobium* sp. strain MRM6, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 2011d, 86: 384-388.
- Ahemad M et Khan M.S, Insecticide-tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) improves the growth and yield of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticidestressed soils, Symbiosis, 2011e, 54: 17-27.

- Ahemad M et Khan M.S, Response of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] grown in herbicide-amended soil to quizalafop-p-ethyl and clodinafop tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) MRM6, J. Agric. Sci. Technol, 2011f, 13: 1209-1222.
- Ahemad M et Khan M.S, Effects of insecticides on plant growth-promoting activities of phosphate solubilizing *Rhizobacterium Klebsiella* sp. strain PS19, Pestic. Biochem. Physiol, 2011g, 100: 51– 56.
- Ahemad M et Khan M.S, Biotoxic impact of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Klebsiella* sp. isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere, J. Pest Sci., 2011h, <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-011-0402-1>.
- Ahemad M et Khan, M.S, Toxicological effects of selective herbicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Klebsiella* sp. strain PS19, Curr. Microbiol, 2011i, 62: 532–538.
- Ahemad M et Khan M.S, Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*) specific *Rhizobium* sp. strain MRP1. Emirates, J. Food Agric, 2012a, 24: 334-343.
- Ahemad M et Khan M.S, Effects of pesticides on plant growth promoting traits of *Mesorhizobium* strain MRC4, J. Saudi Soc. Agric. Sci, 2012b, 11: 63-71.
- Ahemad M et Khan M.S, Productivity of green gram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain, Acta Physiol Plant, 2012c, 34: 245-254.
- Ahemad M et Kibret M, Mechanisms and application of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University-Science, 2013, 26(2014): 20-1.
- Ahmad E, Zaidi A et Shaghir Khan M, Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation, Mohammad O (eds), Springer- verlag/Wien, 2012, pp.29-44.
- Aletor V.A, Abd-El-Moneim A.M et Goodchild A.V, Evaluation of the seeds of selected lines of three *Lathyrus* spp. for b-N-oxalyl amino-L-alanine (BOAA), tannins, trypsin inhibitor activity and certain in vitro characteristics, J. Sci. Food Agric, 1994, 65: 143-151.

- Al-Enzi R.M.J et Al-Charrakh A.H, Heavy metal resistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa* as a model, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012.
- Al-Falih A, Phosphate solubilisation in vitro by some soil yeasts, Qatar Univ. Sci. J, 2005, 25: 119-125.
- Alikhani H.A, Saleh-Rastin N et Antoun H, Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils, Plant and Soil, 2006, 287: 41-35.
- Alori E.T, Glick B.R et Babalola O.O, Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture, Frontiers in Microbiology, 2017, 8 (971):1-8.
- Ampomah, O. Y et Huss-Danell K, Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden, Syst. Appl. Microbiol, 2011, 34:267-275.
- Andrews M, De Meyer S, James E.K, Stepkows K.T, Hodges S, Simon M.F et Young J.P.W, Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance, 2018, 9 (321): 1-24.
- Annor G.A, Ma Z et Boye J.I, Crops legumes, Food processing, Principales and applications, second edition, edited by Clarck S, Jung S and Lamsal B. Jhon wiley and sons, Ltd, 2014, pp. 305-337.
- Antoun H, Beauchamp C.J, Goussard N, Chabot R et Lalande R, Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.), Plant Soil, 1998, 204: 57–67.
- Apostu A, Petriman N, Trăsnea, Mihasan M, Dunca S et Stephan M, Isolation and characterization of some rhizobacterial strains with phosphorus solubilizing capabilities, Analele Științifice Genetică Și Biologie Moleculară, TOMXI, 2010, 67-74.
- Arcand M.M et Schneider K.D, Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: Areview, Anais da Academia Brasileira de Ciência, 2006, 78 (4): 791-807.
- Arif M.S, Shahzad S.M, Yasmeen T, Riaz M, Ashraf M, Ashraf M.A, Mubarik M.S et Kausar R, Improving plant phosphorus (P) acquisition by phosphate solubilizing bacteria.

- Springer international publishing AG, Naeema N et al (eds). Essentiel plant nutrients, 2017, 513-556.
- Arora N.K, Kang S.C et Maheshwari D.K, Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut, *Curr. Sci*, 2001, 81: 673-677.
- Badr S.F, Karyotype analysis chromosome evolution in species of *Lathyrus* (Fabaceae), *Pakistan journal of biological sciences*, 2007, 10(2): 49-56.
- Badr S, Mustafa A.E, Taher W et Sammour R.H, Genetic variability in *Lathyrus spp.* As revealed by karyotype analysis, *The Japan Mendel Society*, 2009, pp. 101-111.
- Baig KS, Arshad M, Zahir ZA et Cheema MA, Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria, *Soil Environ*, 2010, 29: 82-86.
- Bargaz A, Caractérisation agrophysiologique et biochimique de symbioses haricot (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia performants pour la fixation symbiotique de l'azote sous déficit en phosphore, *Biotechnologie et bio-ingénierie de la production végétale, Physiologie végétale*, 2012, pp.1-142.
- Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya C.S et Kalra A, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) desaminase containing rhizobacteria protect *Ocimum Sanctum* plants during water logging stress via reduced ethylene generation, *Plant physiol biochem*, 2012, 58: 277-235.
- Barreto Figueiredo M.V, Seldin L, De Araujo F.F et Ramos Mariano R.L, Plant growth promoting rhizobacteria fundamentals and application, *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 2010, pp. 21-43.
- Barrett CF et Parker M, Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium sp* nodule bacteria on two *Mimosa spp*, In Costa Rica, *App. Environ. Microbiol*, 2006, pp. 1198-1206.
- Bauchamp C.J, Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potential de leur utilisation comme agent de lutte biologique, *Phytoprotection*, 1993, 74: 19-27.

- Baymiev A.K, Ptitsyn K.G, Muldashev A.A et Baymiev A.K, Genetic Description of Root Nodule Bacteria of *Lathyrus* species growing on the Territory of the Republic of Bashkortostan, Russian J of Genetics: Applied Research, 2012, pp. 122-126.
- Belimov A.A, Hontzeas N, Safronova V.I, Demchinskaya S.V, Piluzza G, Bullitta S et Glick B.R, Cadmium-tolerant plant growth promoting rhizobacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.), Soil Biol. Biochem, 2005, 37: 241– 250.
- Ben Brahim N, Combes D et Marrakchi M, Autogamy and allogamy in genus *Lathyrus*, *Lathyrus Lathyrism* Newsletter, n2, 2001, pp. 21-26.
- Beneduzi A, Ambrosini A et Passaglia L.M.P, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents, Genetics and molecular Biology, 2012, 35(4): 1044-1051.
- Bernaerts M.J et de Ley J, A biochemical test for crown gall bacteria, Nature, 1963, 197: 406-407, ISSN 0028-0836.
- Berraho E.L, Lesueur D, Diem H.G et Sasson A, Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium, World J. Microbiol. Biotechnol, 1997, 13: 501–510.
- Bharti P.K, Tyagi P.K et Singh V, Assessment of heavy metals in the water of Sahastradhara Hill stream at Dehradun, India, International Journal of Environment, 2014, 3(3): 2091-2854.
- Bhattacharrya P.N et Jha D.K, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in Agriculture, World J Microbiol Biotech, 2012, pp. 1327-1350.
- Biswas B et Gresshoff P.M, The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels, Int. J. Mol. Sci, 2014, 15: 7380-7397.
- Bontemps C, Elliot G.N, Simon M.F, Dod Reis Junior M.F, de Faria S.M, Sprent J.I, James E.K et Young J.P, *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes, Mol. Ecol, 2010, 19: 44-52.
- Boukecha D, Laouar-Hanifi L et Harek D, Drought tolerance in some populations of grass pea (*Lathyrus sativus* L.), Legume Research, Agricultural Research Communication Centre, DOI:10.18805/LR-346, 2017, pp:1-8.

- Braud A, Jézéquel K, Bazot S et Lebeau T, Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria, 2009, *Chemosphere*, 74: 280-286.
- Brunet J, Reppellin A, Varrault G, Terryn N et Zwily-Fodil Y, Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation Systems, *Plant Bio and Patho*, 2008, pp. 859-864.
- Bruning B et Rozema J, Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives for saline agriculture, *Environ Exp Bot*, 2012, pp. 1-10.
- Campbell C.G, Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 18, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome, Italy, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 91-1.
- Canbolat M.Y, Bilen S.C, akmakc R, Sahin F et Aydın A, Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora, *Biol. Fertil. Soils*, 2006, 42: 350–357.
- Chen P.S, Toriba T.Y et Warner H, Microdetermination of phosphorus, *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 1756-1758.
- Chen W.M, Laevens S, Lee T. M, Coenye T, de Vos P, Mergeay M et Vandamme P, *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2001, 51:1729-1735.
- Chen Y.P, Rekha P. D, Arunshen A. B, Lai W. A et Young C. C, Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities, *Appl. Soil Ecol*, 2006, 34:33-41.
- Cregut M, Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation de Colza et d'orge, Ecole doctorale RP2E/UMRINPL (ENSAIA)-INRA 1121Agronomie et environnement (Nancy université) INPL, 2009.
- Dary M, Chamber-Pérez M.A, Palomares A.J et Pajuelo E, “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria, *J. Hazard. Mater*, 2010, 177: 323–330.

- Dash N et Dangar T.K, Perspectives of Phosphate Solubilizing Microbes for Plant Growth Promotion, Especially Rice - A Review, International Journal of Biochemistry Research & Review, 2017, 18(3): 1-16.
- De La Rosa L et Martin I, Morphological characterization of Spanish genetic resources of *Lathyrus sativus* L. *Lathyrus* Lathyrism News Letter, 1995, 2: 31-34.
- De Meyer S.E et Willems A, Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea Lupini* sp.nov., *Bosea Lathyri* sp.nov. and *Bosea robiniae* sp.nov., isolated from legumes. Int J of Sys and Evol Microbiol, 2012, pp. 2505-2510.
- Desaunay A, Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun, Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et Environnement Ecole Doctorale Terre-Univers-Environnement, 2011, 1-248.
- Deshwal V.K, Pandey P et Kang S.C, Maheshwari, D.K., Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi, Indian J. Exp. Biol, 2003, 41: 1160-1164.
- Dey R, Pal K.K, Bhatt D.M et Chauhan S.M, Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiol. Res, 2004, 159: 371-394.
- Dey R, Pal K.K et Tilak K.V.B.R, Plant growth promoting rhizobacteria in Crop protection and challenges, Goyal A and Manoharachary C (eds), Future challenges in crop production against fungal pathogens, Fungal Biology, 2014, 31-58.
- Doye I.N, Dreyfus B et Truchet G, Infection et développement des nodules de racines de la légumineuse *Sesbania rostrata* par la souche ORS571 d'*Azorhizobium*, Interaction plantes microorganismes. Sénégal, 1992, 1-39.
- Drouin P, Prévost D et Antoun H, Classification of Bacteria Nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in Northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *Viciae*. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 1996, 1024-1016.

- Duan J, Muller K.M, Charles T.C, Vesely S et Glick B.R, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) desaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan, *Microb Ecol*, 2009, 57:423-436.
- Duhan, J.S, Dudeja, S.S et Khurana, A.L, Siderophore production in relation to N₂ fixation and iron uptake in pigeon pea-*Rhizobium* symbiosis, *Folia Microbiol*, 1998, 43: 421–426.
- FAO, Notions de nutrition des plantes et de fertilization des sols, Rome, 2005, 25p.
- Ferguson B.J, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M.H, Lin Y.H, Reid D.E et Gresshoff P.M, Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation, *Journal of international plant biology*, 2010, 52(1):61-76.
- Ferret C, Rôle des *Pseudomonas fluorescens* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol: application à la phytoremediation, Université de Strasbourg, Science du vivant, Aspects moléculaires et cellulaires de biologie, 2012, 1-345.
- Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S et Cliquet J.B, Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review, *Agron Sustain Dev*, 2009, 30 (2010): 57-66.
- Gadd, G. M et Griffiths A.J, Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microbial Ecology*, 1978, 4: 303-17.
- Ganesan V, Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. *Curr Microbiol*, 2008, pp. 403-407.
- Garcia-Fraile P, Menendez E et Rivas R, Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry, *Bioengineering*, 2015, 2(3): 183-205.
- Garg N, Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review, *Agronomy for sustainable Development*, Springer Verlag/EDP sciences/ INRA, 2007, 27(1): 59-68.
- Gayneshwar P, Hirsch A.M, Moulin L, Chen W.M, Elliott G.N, Bontemps C, Santos P.E.L, Gross E, Reis F.B, Sprent J.I, Young P.W et James E.K, Legume nodulating Betaproteobacteria, Diversity, Host Range and Future Prospects, The American Phytopathological Society, *Molecular plant interactions*, 2011, 24(11): 1276-1288.

- Genrich I.B, Dixon D.G et Glick B.R, A plant growthpromoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol*, 1998, 64: 3663-3668.
- Ghosh S, Penterman J.N, Little R.D, Chavez R et Glick B.R, There newly isolated plant growth promoting bacilli facilitate the seedling growth of Canola, *Brassica campestris*, *Plant physiol biochem*, 2003, 41:227-281.
- Glick B.R, *Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications*, Hindawi Publishing Corporation *advances in materials science and engineering*, 2012, 2012: 15-1.
- Glick B.R, Bacteria with ACC desaminase can promote plant growth and help to feed the world, *Microbial Res*, 2014, 169:30-39.
- Gobat J.M, Aragno M et Matthey W, *le sol vivant : bases de pédagogie, biologie des sols*, PPUR Presses polytechniques, 2010, pp.1-817.
- Gomes EA, Silva UDC, Marriel IE, De Oliveira CA et Paula lana UG, Rock phosphate solubilizing microorganisms Isolated from maize rhizosphere soil, *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2014, V.13, n1, p. 69-81.
- Goswami D, Thakker J.N et Dhandhukia P.C, Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Coagent Food and Agriculture*, 2016, 2 (1127500):1-19.
- Govindasamy V, Senthil Kumar M, Gaikwad K et Annapurna K, isolation and characterization of ACC desaminase gene from two plant growth promoting rhizobacteria. *Curr Microbiol*, 2008, 57(4): 312-317.
- Gupta A, Rai V, Bagdwal N et Goel R, In situ characterization of mercury resistant growth promoting fluorescent pseudomonads, *Microbiol. Res*, 2005, 160: 385–388.
- Gupta G, Parihar S.S, AhirwarN.K, Snehi S.K et Singh V, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbial and Biochemical Technology*, 2015, pp. 7-12.
- Halder A. K, Mishra A. K, Bhattacharyya P et Chakrabartty P. K, Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, *J. Gen. Appl. Microbiol*, 1990, 36: 81-92.

- Hameeda B, Reddy H.K, Rupela O.P et Kumar G.N et Reddy G, Effet of carbon substrates on rock phosphate solubilization by Bacteria from coposts and Macrofauna, *Current Microbiology*, 2006, 53: 298-302.
- Hameeda B, Harini G, Rupela O.P, Wani S.P et Reddy G, Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 2008, 163: 234-242.
- Handsa A, Kumar V, Anshumali et Usmani Z, Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective, *Recent research in science and technology*, 2014, 6(1): 131-134.
- Hao Y, Charles T.C et Glick B.R, ACC desaminase increase the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of commercial canola cultivars, *FEMS Microbiol let*, 2010, 307:185-190.
- Hayat R, Ahhmed I et Sheiradil R.A, An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture, Ashraf M et al (eds), *Crop production for agricultural improvement*, Springer science + business Media B.V, 2012, 557-579.
- Hedberg M, Acetamide Agar Medium Selective for *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Microbiology*, Copyright @ 1969 American Society for Microbiology Printed in U.S.A, 1969, 17 (3): 481.
- Hesham A.L et Hashem M.M, Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants, *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(1), 55-61.
- Hinsinger P, Les racines au cœur du fonctionnement de la rhizosphère, des connaissances pointues issues de la recherche aux applications possibles en AB/UMB 1222 Eco & Sols- Ecologie fonctionnelle et biogéochimie des sols et agro-écosystèmes (Montpellier SupAGRO-INRA-IRD/ALTERAGRI N°101), 2010.
- Howieson J.G et McInnes A, The legume-rhizobia symbiosis, Does it vary for the tropics relative to the Mediterranean basin. In: Gomide JA, Matto WRS, da Silva SC, editors. *Proceedings of the international glasslands congress, Brazil*. Brazil: Brazilian Society of Animal Husbandry, 2001, p. 585-590.

- Hu F.B, Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview, *American journal of clinical nutrition*, 2003, 78(3) 544-551.
- Huang X.F, Chaparro J.M, Reardon K.F, Zhang R, Shen Q et Vivanco J.M, Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities, NRC Research Press, Botany, 2014, 92: 267-275.
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M et Sa T.M, Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), *Curr. Microbiol*, 2008, 56: 327–333.
- Ingle K.P et Padole D.A, Phosphate solubilizing microbes. An overview. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 2017, 6(1): 844-852.
- Irawati W, Wijaya, Christian S et Djojo E.S, Characterization of heavy metals resistant yeast isolated from activated sludge in Rungkut, Surabaya, Indonesia as Biosorbent of mercury, copper, and lead, Towards the sustainable use of biodiversity in a changing environment: From basic to applied research, *AIP conf Proc* 1744, 020061-1-020061-8, doi:10.1063/1.495535, 2016.
- Ishizawa S et Toyoda H, Comparative study on effective and ineffective nodules of leguminous plants, *Soil and plant Food*, 1955, 1 (1): 47-48.
- Islam M.T, Deora A, Hashidoko Y et Rahman A, Ito T et Tahara S, Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizoplane of *Oryza sativa* L.cv. BR29 of Bangladesh; *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, 2007, 62: 103-110.
- Ivanova R, Bojinova D et Nedialkova K, Rock phosphate solubilization by soil bacteria, *J of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 2006, 41: 297-302.
- Jain P et Singh D, Study on the role of phosphate solubilizing Fungi in phosphorous bioavailability and growth enhancement of Potato, *Chemical Science Review and Letters*, 2015, 4(13) : 101-108.
- Jayanthi B, Emenike C.U, Auta S.H, Agamuthu P et Fauziah S.H, Characterization of induced metal responses of bacteria isolates from active non-sanitary landfill in Malaysia, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2017, 119: 467-475.

- Jeon J, Lee S, Kim H, Ahn T et Song H, Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms, *J. Microbiol*, 2003, 41: 271–276.
- Jha P.N et Kumar A, Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3, *J. Appl. Microbiol*, 2007, 103: 1311-1320.
- Jha Y, Subrmanian R.B et Mishra K.K, Role of plant growth promoting rhizobacteria accumulation of heavy metal in Metal contaminated soil, *Emergent life sciences Research*, 2017, 3(1): 48-56.
- Jiang C.Y, Sheng X.F, Qian M et Wang Q.Y, Isolation and characterization of a heavy metal resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil, *Chemosphere*, 2008, doi: 10.1016/j, 1-8.
- Jing Y, He Z et Yang X, Role of soil contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2007, 8: 192-207.
- Johnston A et Steén I, Understanding phosphorus and its use in agriculture, European fertilizer manufacturers association, 2000, pp. 1-38.
- Jordan D.C, "Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL" In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st éd. (N. R.) Krieg, (J. G.) Holt éds, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984, pp. 234-256.
- Kahraman A, Çildir H, Dogan M, Güneş F et Celep F, Pollen morphology of the genus *Lathyrus* L.(Fabaceae) with emphasis on its systematic implications, *Australian journal of crop science*, 2012, 6(3): 559-566.
- Kenneth O.C, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Abioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy, *Int J Adv Res Biol Sci*, 2017, 415: 123-142.
- Khan M.S, Zaidi A et Aamil M, Biocontrol of fungal pathogens by the use of plant growth promoting rhizobacteria and nitrogen fixing microorganisms, *Ind. J. Bot. Soc*, 2002, 81: 255-263.
- Khan M.S, Zaidi A, Wani P.A et Oves M, Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils, *Environ. Chem. Lett*, 2009, 7: 1-19.

- Khan M.S, Zaidi A et Ahmad E, (eds.) Phosphate Solubilizing Microorganisms, DOI 10.1007/978-3-319-08216-5_2, © Springer International Publishing Switzerland, 2014.
- Kloepper J.W, Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems), In: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum*/Plant Associations, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1994, pp. 111-118.
- Kshetрил L, Pandey P et Sharma G.D, Solubilization of inorganic Rock phosphate by rhizobacteria of *Allium hookeri* Thwaites and influence of carbon and Nitrogen sources Amendments, Journal of pure and applied Microbiology, 2017, 11 (4): 1899-1908.
- Kumar V, Behl R.K et Narula N, Establishment of phosphate solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions, Microbiol. Res, 2001, 156: 87-93.
- Kumar G et Trhipathi R.B, Lead-Induced cytotoxicity and Mutagenicity in Grass Pea, Turk J Biol, 2008, 32: 73-78.
- Kumar A, Kumari B et Mallick M.A, Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016, 8(2): 37-40.
- Kumari K et Phogat V.K, Rock phosphate: its availability and solubilisation in the soil-Areview, Agric Rv, 2008, 29(2): 108-116.
- Kundan R, Pant G, Jadon N et Agrawai P.K, Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective, Journal of fertilizers and pesticides, 2015, 6(2):1-9.
- Kuznetsova I.G, Sazanova A.L, Safronova V.I, Pinaev A.G, Verkhozina A.V, Tikhomirova N.Yu, Osledkin Yu.S et Belimov A.A, Genetic diversity among microsymbionts of *Lathyrus* , *Vicia*, *Oxytropis* and *Astragalus* legume species from Baikal region, Agricultural Biology, 2015, 50: 352-345.
- Lajtha K, Driscoll C.T, Jarell W.M et Elliott E.T, Soil phosphorus characterization and total element analysis, dans Standard Soil Methods for long-term ecological research, New York, Oxford, University Press, 1999, pp.115-142.
- Lapeyronie A, Les productions fourragères méditerranéennes (Eds), g-P Maisonneuve et Larousse, 1982, pp. 356-358.

- Ledin M. Bioaccumulation of metal by microorganisms-processes and importance for soil systems, *Earth Sci Rev*, 2000, 51:1-31.
- Lines-Kelly R, The rhizosphere, *Soil biology basics, profitable and sustainable primary industries*, 2005.
- Liu X.Y, Weis S, Wang F, James E.K, Guo X.Y, Zagar C, Xia L.G, Dong X et Wang Y.P, *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp, Are the preferred symbionts of *Mimosa* spp in Southern China, *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 80: 417-426.
- Liu W.Y.Y, Ridgway H.J, James T.K, James E.K, Chen W.M, Sprent J.I et Young J.P.W, Andrews M, *Burkholderia* sp Induces Functional Nodules on the south African Invasive legume *Dipogon lignosus* (Phaseoleae) in New Zealand soils, *Microbial*, 2014, DOI/10.1007/s00248-014-0427-0, 1-14.
- Ma Y, Rajkumar M, Luo Y et Freitas H, Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake, *J. Hazard. Mater*, 2011a, 195 : 230-237.
- Ma Y, Rajkumar M, Vicente J.A et Freitas H, Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops, *Int. J. Phytoremediation*, 2011b, 13: 126-139.
- Mahdavi B, Modarres Sanavy S.A.M et Aghaalikhani M, Nodulation and Root Traits in Four Grass-Pea (*Lathyrus sativus*) Ecotypes under Root-Zone Temperatures, *Pakistan J of Biol Sciences*, 2007, pp. 1243-1249.
- Malusá E et Vassilev N.A, Contribution to set a legal framemork for biofertilisers, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98:6599-6607.
- Martinez-Hidalgo P, The nodule microbiome: N₂-fixing Rhizobia do not alone, *Phytobiomes*, The American Phytopathological- Society, 2017, 1-13.
- Marzouki L, Medjeldi S, Aouani E et Amri M, Evaluation des consequences sanitaires de la pollution industrielles engendrée par un site sidérurgique en Algérie, *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement*, 2005, 219-225.

- Masson-Boivin C, Bontemps C, Golfier G, Gris-Liebe C et Talini L, Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia, Les Actes du BRG, 2006, 6: 97-110.
- Mazur A, De Meyer S.E, Tian R, Wielbo J, Zebrachi K, Seshadri R, Reddy T, Markowitz V, Ivanova N.N, Pati A, Woyke T, Kyrpides N.C et Reeve W, High-quality permanent draft genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae strain GB30; an effective microsymbiont of *Pisum sativum* growing in Poland, Standards in Genomic sciences, 2015, 10:36.
- McClutchan J.S, A brief history of grass pea and its use in crop improvement, *Lathyrus Lathyrism* News Letter, 2003, (3): 18-23.
- Mega Rusydi M.R, Noraliza C.W, Azrina A et Zulkhairi A, Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties, International food research journal, 2011, 18: 705-713.
- Mehnaz S, Baig D.N et Lazarovits G, Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan, J. Microbiol. Biotechnol, 2010, 20: 1614-1623.
- Meliani A et Bensoltane A, Biofilm-Mediated heavy metals bioremediation in PGPR *Pseudomonas*. Journal of Bioremediation and Biodegradation, 2016, 7(5):1-9.
- Meyer J, Sugarcane Nutrition and Fertilization, South African Sugarcane Research Institute, 2013, 133-180.
- Mikić A et Mihailović V, Significance of genetic resources of cool season annual legumes, II Neglected and under utilised crops, review paper/pregledni članak. Ratar Provrta, 2014, 51(2).
- Mohammadi K et Sohrabi Y, Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: A review. ARPJ of Agricultural and Biological Science, 2012, pp. 307-316.
- Moulin L, Mumive A, Dreyfus B et Bovin-Masson C, Nodulation of legumes by members of the beta-Susclass of Proteobacteria, 2001, Nature 411: 948-950, Erratum in nature 412:926.
- Mullins G, Phosphorus, agriculture and the environment, Reviewed by Wade Thomason. Crop and soil environmental sciences, 2009, pp.1-11.

- Mundra S, Arora R et Stobdan T, Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India, *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27:2387–2396 DOI 10.1007/s11274-011-0708-4
- Muneer B, Shakoori F, Rehman A et Shakoori A.R, Chromium Resistant yeast with multi-metal resistance isolated from industrial effluents and their possible use in microbial consortium for bioremediation of wastewater, *Pakistan J Zool*, 2007, 39(5): 289-297.
- Naees M, Ali Q, Shahbaz M, et Ali F, Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals: An overview, *International Research Journal of Plant Science*, 2011, 2(8): 220-232.
- Naik M.M et Dubey S.K, Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA, *Curr. Microbiol*, 2011, 62: 409-414.
- Nakayan P, Hameed A, Singh S, Young I.S. et Young C.C, Phosphate-Solubilizing Soil Yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 Improves Maize (*Zea mays* L.) Productivity and Minimizes Requisite Chemical Fertilization. *Plant and Soil*, 2013, 373: 301-315, <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1792-z>.
- Nap J.P et Bisseling T, Developmental biology of plant prokaryote symbiosis: The legume root nodule, *Science*, 1990, 250: 948-954.
- Nautiyal C.S, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilising microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170: 265-270.
- New M.T, Yu S.S et Latt Z.K, Study on phosphate solubilisation of salt tolerant soil yeast isolates and effects on Maize germination and growth, *International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)*, 2013, 2(3): 157-164
- Nies D.H, Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol*, 2003, 27: 313-339.
- Nieuwenhuis R et Nieuwelink J, Cultivar of soya and other legumes, *Agrodok 1Q* edit by Rienk Nieuwenhuis and Marten Voogd, Digigrafi, Wageningen. The Netherlands, 2005, 1-69.

- Noel T.C, Sheng C, Yost C.K, Pharis R.P et Hynes M.F, *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting *Rhizobacterium*: direct growth promotion of canola and lettuce, Can. J. Microbiol, 1996, 42: 279-283.
- Olaniran AO, Balgobind A et Pillay B, Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies, Int J Mol Sci, 2013, 14(5):10197–10228.
- Oskoueiyar R, Osaloo S.K et Amirahmadi A, Molecular phylogeny of the genus *Lathyrus* (Fabaceae- Fabeae) based on cpDNA matK sequence in Iran, Iran J Biotech, 2014, 12(2), e10315, 41-48. 2015.
- Outten FW, Outten CE, Hale JA et O'Halloran TV. Transcriptional activation of an Escherichia coli copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. J Biol Chem 2000;275: 31024-9.
- Palma F, Tejera NA et Lluch C, Nodule carbohydrate metabolism and polyols involvement in the response of Medicago Sativa to salt stress, Environ Exp Bot, 2013, 85:43-49.
- Pandey A, Trivedi P, Kumar B et Palni L.M.S, Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of Pseudomonas putida (B0) isolated from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya, Curr. Microbiol, 2006, 53: 102–107.
- Patel P.P, Shaikh S.S et Sayyed R.Z, Dynamism of PGPR in Bioremediation and Plant Growth Promotion in heavy metal contaminated soil. Indian journal of Experimental Biology, 2016, 54: 286-290.
- Patto M.C.V et Rubiales D, Resistance to Rust and Powdery Mildew in *Lathyrus* Crops, Czech J. Genet. Plant Breed, 2014, 50 (2): 116-122.
- Peix A, Ramírez-Bahena M.H, Velázquez E et Bedmar E, Bacterial associations with legumes. Critical reviews in plant sciences, 2015, 34: 1-3.
- Pervin S, Jannat B, Al Sanjee S et Farzana T, Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Lablab purpureus* and *Vigna sinensis* in Bangladesh, Turkish Journal of Agriculture, Food science and Technology, 2007, 5(1): 14-17.
- Pérez-Montano F, Alias-Villegas C, Bellongin R.A, Delcerrop, Espuny M.R, Jliménez-Guerrero I, Lopez-Baena F.J, Ollero F.J et Cubo T, Plant growth promotion in cereal

- and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiology Research*, 2014, pp. 293-301.
- Phi Quyet.-Tien, Yu-Mi, P, Keyung-Jo S, Choong-Min R, Seung-Hwan P, Jong-Guk K et Sa-Youl G, Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper, *J. Microbiol. Biotechnol*, 2010, 20: 1605–1613.
- Piergiovanni A.R et Damascelli A, L-Homoarginine Accumulation in Grass Pea (*Lathyrus Sativus*) Dry Seeds, *Food and Nutrition Sciences*, 2011, 2: 207-213.
- Pihlanto A et Korhonen H, Bioactive peptides and proteins, *Advances food and nutrition research*, 2003, 47: 175-276.
- Pikovskaya R.I, Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species, *Microbiol*, 1948, 17: 362-370.
- Pommereschke P et Hansen S, Examining root nodule activity on legume, *Fertil crop Technical Not*, 2017, pp. 1-4.
- Poonguzhali S, Madhaiyan M et Sa T, Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants, *J. Microbiol. Biotechnol*, 2008, 18: 773–777.
- Prashar P, Kapoor N et Sachdeva S, Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2013.
- Quezel P et Santa S, *New flora of Algeria and the southern desert regions*, 1 and 2 tomes, Paris, CNRS, 1962, 1170-1.
- Rai A et Nabti E, *Plant growth promoting bacteria: importance in vegetable production*, springer international publishing AG, Zaidi A, Khan M.S (eds). *Microbial strategies for vegetable production*, 2017, pp.23-48.
- Rajkumar M, Nagendran R, Lee K. J, Lee W. H et Kim S. Z, Influence of plant growth promoting bacteria and Cr6+ on the growth of Indian mustard, *Chemosphere*, 2006, 62(59): 741–748.

- Rajkumar M, Ma Y et Freitas H, Characterization of metalresistant plant-growth promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal, *J. Basic Microbiol*, 2008, 48: 500-508.
- Ramachandran K, Srinivasan V, Hamza S et Anandaraj M, Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings, Velazquez E and Rodriguez-Barrucco C (eds), First international meeting on microbial phosphate solubilisation, Springer, 2003, 325-331.
- Rani A, Souche Y.S et Goel R, Comparative assessment of in situ bioremediation potential of cadmium resistant acidophilic *Pseudomonas putida* 62BN and alkalophilic *Pseudomonas monteilli* 97AN strains on soybean, *Int. Biodet. Biodegrad*, 2009, 63: 62-66.
- Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiarison R, Rabevohitra R, Bena G, Ramaroson L, Raherimandimby M, Moulin L, De Lajudie P, Dreyfus B et Avarre JC, Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume tress (*Dalbergia spp.*) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Mol. Ecol*, 2005, 14: 4135- 4146.
- Reyes-Moreno C, Paredes-López O et Gonzalez E, Hard-to-cook phenom in common beans: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1993, 33 (3): 227-286.
- Rigaud J et Puppo A, Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids, *Journal of General Microbiology*, 1975, 88 (975): 223-228.
- Rival P, Coordination entre l'épiderme et le cortex dans l'établissement des endosymbiose racinaires chez *Medicago truncatula* : rôle du gène DMI3 codant une protéine Kinase calcium et calmoduline dépendante, Doctorat de l'université de Toulouse, 2013.
- Rodrigues E.P, Rodrigues L.S, De Oliveira A.L.M, Baldani V.L.D, Teixeira K.R.S, Urquiaga S et Reis V.M, *Azospirillum amazonense* inoculation : effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Soil*, 2008, 302: 249-261.
- Rodriguez H et Fraga R, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology Advances*, 1999, 17: 339-319.

- Roger P, Gues Y.D, Balandreau J, Dreyens B et Sougoufara B, La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement, conference débat de l'ORSTOM, 1996.
- Rokhbakhsh-Zamin F, Sachdev D, Kazemi-Pour N, Engineer A, Pardesi K.R, Zinjarde S, Dhakephalkar P.K et Chopade B.A, Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*, J. Microbiol. Biotechnol. 2011, 21, 556-566.
- Rubiales D et Mikic A, Introduction: Legumes in sustainable agriculture, Plant sciences, 2015, 1-7.
- Saharan B.S et Nehra V, Pant growth promoting rhizobacteria: A critical review, life sciences and medicine research, LSMR, 2011, 21:1-30.
- Saif S et Khan M.S, Assessment of heavy metals toxicity on plant growth promoting Rhizobacteria and seedling characteristics of *Pseudomonas putida* SFB3 Inoculated Green gram, Acta Scientific Agriculture, 2013, 1(2): 47-56.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S et Bhatti A.S, Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC desaminase in stress agriculture, J. Ind Microbiol Biotechnol, 2007, 34:635-648.
- Sammour R.H, Mustafa A.E, Badr S et Tahr W, Genetic variability of some quality traits in *Lathyrus* spp. Germplasm, Acta agriculturae Slovenica, 2007, 90(1):33-43.
- Sandilya S.P, Bhuyan P.K, Gogi D.K et Kardong D, Phosphorus solubilization and plant growth promotion ability of Rhizobacteria of *R.communis* L growing in Assam, India, Proc Nath Acad Sci, India. Sect BBiol Sci, 2016, pp.1-8, DOI: 10.1007/s40011-016-0833-9,
- Saravanakumara D, Vijayakumar C, Kumar N et Samiyappan R, PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease, Crop Prot, 2007, 26: 556–565.
- Saravanan V.S, Madhaiyan M et Thangaraju M, Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*, Chemosphere, 2007, 66: 1794–1798.
- Schuster-Gajzágó I, Nutritional Aspects of legumes, Cultivated Plants, Primary as Food Sources, ©Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), 1998, 1: 1-7.

- Second National Report on the State of Plant Genetic Resources, National Institute of Agronomic Research of Algeria, United Nations Food and agriculture, 2006.
- Selvakumar G, Mohan M, Kundu S, Gupta A.D, Joshi P, Nazim S et Gupta H.S, Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*) , Lett. Appl. Microbiol, 2008, 46:171–175.
- Shaharoon B, Arshad M et Zahir Z.A, Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean, Lett. Appl. Microbiol, 2006, 42: 155-159.
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M et Zahir Z.A, Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.), Appl. Microbiol. Biotechnol, 2008, 79: 147-155.
- Shakeela S, Padder S.A et Bhat Z.A, Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant picrorhiza Kurroa, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2017, 6(3):157-168.
- Shamseldin A, The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation-Review, Global journal of biotechnology and biochemistry, 2013, 8(4): 84-94.
- Sharma S.B, Sayyed R.Z, Trivedi M.H et Gobi T.A, Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soil, Springer plus, 2013, 2: 14-1.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li M, Chen X, Zhang W et Zhang F, Uptade on phosphorus dynamics in the soil-plant continuum, Phosphorus dynamics: From soil to plant. Plant physiology, 2011,156: 997-1005.
- Shinwari K.I, Slah A, Afridi M.I, Zeeshan M, Hussain H, Hussain J, Ahmad O et Jamil M, Application of plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of heavy metal polluted soil. Asian journal of multidisciplinary studies, 2015, 3(4) : 179-185.
- Shiraishi, A, Matsuhita, N et Hougestsu, T, Nodulation in balck locust by the Gamma-proteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Beta-proteobacteria *Burkholderia* sp. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33: 274-269.

- Shneider A et Huyghe C, Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables, (Eds) Quae RD 10, 70826 Versailles Cedex, 2015, pp. 1-473.
- Sillero J.C, Cubero J.I, Fernandez-Aparicio M et Rubiales D, Search for resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in *Lathyrus* Lathyrism News Letter, 2005, 4: 4-9.
- Silva Filho GN et Vidor C, Phosphate solubilization by microorganisms in the presence of different carbon sources, R. Bras. Ci. Solo, 2000, 24: 311-319.
- Singh Y, Ramteke P.W et Shukla P.K, Isolation and characterization of heavy metals resistance *Pseudomonas* spp and their plant growth promoting activities, Pelagia Research Library, 2013, 4(1): 269-272.
- Somasegaran P et Hoben H G, Methods in Legume Rhizobium Technology, United States Agency for International Development (USAID), 1985.
- Sperber J.I, The incidence of apatite by solubilising organisms in the rhizosphere and soil, Aust J Agri Res, 1958, 9: 778-781.
- Sprent J.I, Legume nodulation: a global perspective, Oxford, UK: WileyBlackwell, 2009.
- Sprent J.I, Ardley J et James K, Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts, New Phytologist, 2016, 215: 40-56
- Sugiyama A et Yazaki K, Root Exudates of legume plants and their involvement in interactions with soil microbes, Vivanco J.M, Baluška F (eds), VII, 2012, pp.27-48.
- Sy A, Girand E, Jourand P, Garcia N, Willems A, De Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C et Dreyfus B, Methylophilic *Methylobacterium*-bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes, J. Bacteriol, 2001, 183: 214-220.
- Tajma R, Lee O.N, Abe J, Lux A et Morita S, Nitrogen-Fixing Activity of root nodules in relation to their size in Peanut (*Arachis hypogaea*), Plant Prod. Sci, 2007, 10(4): 423-429.
- Tak H.I, Ahmad F et Babalole O.O, Advances in the application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals, D.M. Whitacre (ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 33 Reviews of Environmental

Contamination and Toxicology 223, DOI 10.1007/978-1-4614-5577-6_2, © Springer Science+Business Media New York, 2013, pp. 33-52.

Tank N et Saraf M, Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR, *J. Basic Microbiol*, 2009, 49: 195–204.

Thakur D, Kaushal R et Shyam V, Phosphate solubilizing microorganisms: Role in phosphorus nutrition of crop plants: A review, *Agricultural Research Communication centre*, 2014, 35(3):159-171.

Thakuria D, Talukdar N.C, Goswami C, Hazarika S, Boro R.C et Khan M.R, Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam, *Curr Sci*, 2004, 86: 978-985.

Tharanathan R et Mahadevamma S, Gain legumes a boon to human nutrition, *Trends in food science and technologie*, 2003, 14(12): 507-518.

Toklikishvili N, Dandurishvili N, Vainstein A, Tediashvili M, Giorgobiani N, Lurie S, Szegedi E, Glick B.R et Chemin L, Inhibitory effect of ACC desaminase producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. *Plant Pathol*, 2010, 59:1023-1030.

Tombozara N, Relation entre la disponibilité de l'azote et du phosphore des sols, la mineralomasse (NETP) de la plante et la nodulation du haricot : cas d'essai multilocal dans les parcelles paysannes du moyen ouest de Madagascar, *Sciences agronomiques*, 2014.

Tripathi M, Munot H.P, Shouch Y, Meyer J.M et Goel R, Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9, *Curr. Microbiol*, 2005, 5: 233–237.

Tsavkelova E.A. Cherdyntseva T.A et Netrusov A.I, Auxin production by bacteria associated with orchid roots, *Microbiology*, 2005, 74: 46-53.

U.S. Geological Survey, Mineral commodity summaries 2016: U.S. Geological Survey, 2016, pp. 202, <http://dx.doi.org/10.3133/70140094>.

- Vadafar F, Amooaghaie R et Otroshy M, Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*, *J of Plant Interactions*, 2014, 1:128-136.
- Vandamme P, Goris J, Chen W.M, De Vos P et Willems A, *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes, *Syst. Appl. Microbiol*, 2002, 25: 507- 512.
- Van Rhijn P et Vanderleyden J, The *Rhizobium*-Plant symbiosis, *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 124-142.
- Vassileva M, Azcon R, Barea JM et Vassilev N, Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochem*, 2000, 35: 693-697.
- Vassilev N, Medina A, Azcon R et Vassileva M, Microbial solubilizing of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and soil*, 2006, 287:77-84.
- Vejan P, Abdullah R.A, Khadiram T, Ismail S et Boyce A.N, Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability a review, *Molecules*, 2016, 21 (573): 1-17.
- Verma A, Kukreja K, Pathak D.V, Suneja S et Narula N, In vitro production of plant growth regulators (PGRs) by *Azrobacter chroococcum*, *Indian J. Microbiol*, 2001, 41: 305-307.
- Verma D.P.S, Hu C.A et Zhang M, Root nodule development: origin, function, and regulation of nodulin genes, *physiologia Plantarum*, 1992, 253-265.
- Vicentin R.P, Santos J.V, Laory C.R.G, Costa A.M, Moreira F.M.S et Aves E, Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*, *Revista Brasileira de ciencia dosolo*, 2018, 42: e0170080, 1-12.
- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Mauré L, Escarré J, Béna G, Brunel B et Cleyet-Marel J.C, *Mesorhizobium metallidurans* sp.nov., a metal- resistant symbiont of *Anthyllis Vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France, *Int J of Sys and Evol Microbiol*, 2009, 59: 850-855.
- Vincent J.M, A manual for the practical study of root nodule bacteria, IBP handbook 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

- Viruel E, Erazzù L.E, Martinez Calsina L, Ferrero M.A, Lucca M.E et Sineriz F, Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield, *Journal of soil science and plant nutrition*, 2014, pp. 819-831.
- Vivas A, Biro B, Ruiz-Lozano J.M, Barea J.M et Azcon R, Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn toxicity, *Chemosphere*, 2006, 52: 1523-1533.
- Walpola B.C et Yoon M.H, Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorus uptake of mung bean (*Vigna radiate* [L.] R.Wilczek), *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2013, 73: 281-275.
- Wani P.A, Khan M.S et Zaidi A, Co inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea, *Acta Agron. Hung.*, 2007a, 55: 315-323.
- Wani P.A, Khan M.S et Zaidi A, Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants, *Chemosphere*, 2007b, 70: 36-45.
- Wani P.A, Khan M.S et Zaidi A, Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea, *J. Plant Nutr. Soil Sci*, 2007c, 170: 283-287.
- Wani P.A, Khan M.S et Zaidi A, Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil, *Biotechnol. Lett*, 2008, 30: 159-163.
- Wani P.A et Khan M.S, *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils, *Food Chem. Toxicol*, 2010, 48: 3262–3267.
- Wekesa C, Okun D, Juma K, Shitabule D, Okhoth P, Nyongesa P, Katoo A, Mulama S, Wamalwa E, Mahalo C, Koyo M, Rotich A, Kawaka F et Muoma J, Abundance and symbiotic potential of common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodule associated bacteria in Western Kenya soil, *MAYFEB Journal of Agricultural Science*, 2016, pp.1-9.
- Whitelaw M.A, Growth promoting of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi, *Advances in Agronomy*, 1999, 69: 99-151.

- Wickerham L.J et Burton K.A, Carbon assimilation tests for the classification of yeasts, *Journal Bacteriology*, 1948, 56(3): 363-371.
- Wickerham L.J, *Taxonomy of yeasts*, Technical Bulletin of the US Department of Agriculture, 1951, 1-55
- Wittenberg J.B, Wittenberg B.A et Day D.A, Udvardi M.K et Appleby C.A, Siderophore bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodules, *Plant Soil*, 1996, 178: 161–169.
- Xiao C, Chi R, Pan X, Liu F et He J, Rock phosphate solubilisation by four yeast strains, *Ann Microbial*, 2013, 63: 173-178.
- XinHua S, LiLi H, EnTao W, Feng J, YiHai L et WenXin C, Novel associations between rhizobial populations and legume species within the genera *Lathyrus* and *Oxytropis* grown in the temperate region of China, *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(2): 182-192.
- Yamamoto K, Fujwara T et Blumenreich I.G, Karyotypes and morphological characteristics of some species in the genus *Lathyrus* L. *Japan. Breed*, n.34, 1984, pp. 273-284.
- Yoro E, Suzaki T, Toyokura K, Miyazawa H, Fukaki H et Kawaguchi M, A positive Regulator of nodule organogenesis, nodule inception, Acts a negative regulator of rhizobial infection in *Lotus japonicas*, *Plant Physiology*, 2014,165:747-758.
- Yuan Z, Yi H, Wang T, Zhang Y et Zhu X, Application of phosphate solubilizing bacteria in immobilization of Pb and Cd in soil, *Environ. Sci. Pollut. Res*, 2017, 24: 21877-21884.
- Zaidi A, Usmani S, Singh B.R et Musarrat J, Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*, *Chemosphere*, 2006, 64: 991-997.
- Zahir Z.A, Shah M.K, Naveed M et Akhter M.J, Substratedependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions, *J. Microbiol. Biotechnol*, 2010, 20: 1288-1294.
- Zahrán H.H, *Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology*, *J Biotechnol*, 2001, 91:143-153.

Zakhia F, Jeder H, Willems A, Dreyfus B et De Lajudie P, Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and First report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*, *Microb Ecol*, 2006, 51: 375-393.

Zhao X.Q, Wang R.C, Lu X.C, Lu J.J, Li J et Hu H, Tolerance and Biosorption of heavy metals by *Cupriavidus metallidurans* strain XXKD-1 isolated from a Subsurface Laneway in the Qixiashan Pb-Zn Sulfide Minery in Eastern China, *Geomicrobial J.*29, 2012, 274-286.

Zhuang X, Chen J, Shin H et Bai Z, New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation, *Environment international*, 2007, 33: 406-413.

ANNEXES

Annexe I

Tableau 1. Composition du milieu YMFP

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Mannitol	10
Extrait de levure	1
NaCl	0.05
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.1
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.05
Minerai de fer	1
Minerai de phosphate	0.5
Agar	17

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, pH est de 6.8

Tableau 2. Composition du milieu YEMA

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Mannitol	10
Extrait de levure	0.5
NaCl	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.5
Agar	15

Tableau 3. Composition du milieu *Bosea* Culture Medium 115 (BCM115)

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Extrait de levure	10
Charbon actif	2
Cystéine chlorhydrate	0.4
Minerai fer	1
Agar	17

Tableau 4. Composition du milieu Gélose à l'acétamide

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Poudre de la gélose acétamide	24

Tableau 5. Composition du milieu Tryptone Yeast Agar (TYA)

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl₂	10
Agar	17

Tableau 6. Composition du milieu Gélose Nutritive Agar (GNA)

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Extrait de levure	10
Glucose	20
Carbonate de calcium	20
Agar	17

Tableau 7. Composition du milieu Gélose au Lactose (GL)

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Lactose	10
Extrait de levure	1
Agar	17

Tableau 8. Composition du Réactif de Benedict

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Citrate de sodium	17.3
Carbonate de sodium	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.73
Eau distillée	100

Tableau 9. Composition du milieu NBRIP

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	10
Source de phosphate (CaHPO ₄ ou Ca ₃ (PO ₄) ₂ ou RP)	5
MgCl ₂ .6H ₂ O	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
KCl	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
Agar	15

Le pH est ajusté à 7.

Tableau 10. Composition du milieu MNBRI

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	20
Source de phosphate (CaHPO ₄ ou Ca ₃ (PO ₄) ₂ ou RP)	5
MgCl ₂ .6H ₂ O	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
KCl	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
Extrait de levure	0.1
Agar	15

Le pH est ajusté à 7.

Tableau 11. Composition du milieu Sperber

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	10
Ca₃(PO₄)₂	2.5
CaCl₂	0.1
MgSO₄.7H₂O	0.25
Extrait de levure	0.5
Agar	15

Le pH est ajusté à 7.

Tableau 12. Composition du milieu PVK

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	10
Ca₃(PO₄)₂	5
(NH₄)₂SO₄	0.5
MgSO₄.7H₂O	0.1
Extrait de levure	0.5
KCl	0.2
NaCl	0.2
FeSO₄.7H₂O	0.002
MnSO₄.7H₂O	0.002
Agar	15

Le pH est ajusté à 7.

Tableau 13. Composition du milieu Murashige et Skoog (MS)

Ingrédients macroéléments	Concentrations (g/l)
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.9
CaCl ₂ H ₂ O	0.44
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.370
KH ₂ PO ₄	0.170
Ingrédients Microéléments	Concentrations (mg/l)
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ 4 H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,025
Fer	Concentrations (g/l)
FeSO ₄ 7 H ₂ O	2,78
Na ₂ EDTA	3,73

Annexe II

Tableau 1. Types et quantités de polluants issus de l'usine « Sider El-Hadjar » (Mebirouk et al, 2018).

Polluants	Quantité (tonnes/an)
Poussières issues de la propagation du minerais	35
Oxyde de soufre	4100
Matières en suspension	6000
Ammoniac	3000

Tableau 2. La teneur en métaux lourds dans le sol de Sidi Amar (Benselhoub et al, 2015)

Couche (cm)	Métaux lourds dans le sol (mg/kg)							
	Pb		Cu		Zn		Cd	
	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB
0-5	79.82	10.89	7.43	0.41	34.38	6.49	0.43	0.27
5-10	73.13	8.43	6.69	0.46	21.4	4.18	0.34	0.24
10-20	23.32	4.4	7.46	0.42	13.8	1.89	0.27	0.16

Couche (cm)	Métaux lourds dans le sol (mg/kg)							
	Fe		Mn		Ni		Co	
	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB	1N HNO ₃	AAB
0-5	1152.43	3.99	646.79	82.86	5.8	1.12	5.42	1.01
5-10	787.47	4.51	431.56	72.1	6.22	1.14	5.28	0.95
10-20	1105.0	5.41	391.14	55.69	6.84	0.88	5.5	0.52

1N HNO₃ : Acide nitrique, AAB : Ammonium acetate buffer (Tampon d'acétate d'ammonium)

Tableau 3. Paramètres statistiques des analyses chimiques des classes granulométriques des quatre types de minerais du gisement de phosphate de Kef Essennoun Djebel Onk- Tébéssa (Dassamiour, 2012)

Composants	T1	T2	T3	T4	Composants	T1	T2	T3	T4
P₂O₅ (%)	25.33	21.59	29.47	13.6	Fe₂O₃ (%)	0.1	0.06	0.46	0.05
CO₂ (%)	9.50	16.01	5.92	23.56	F (%)	2.51	2.21	3.90	1.17
MgO (%)	2.83	5.38	0.71	10.32	Cl (ppm)	461.21	177.12	448.52	249.27
CaO (%)	46.01	45.79	49.94	30.61	Cd (ppm)	20.73	22.01	-	16.42
SiO₂ (%)	7.25	3.18	3.82	9.28	Zn (ppm)	131.92	29.98	-	128.35
Na₂O (%)	1.53	1.40	1.32	0.80	Cu (ppm)	11.70	14.62	-	52.13
K₂O (%)	0.16	0.09	0.11	0.08	As (ppm)	10.73	9.86	-	11.83
SO₃ (%)	1.70	5.22	3.48	3.26	Mn (ppm)	73.35	63.32	-	119.39

Tableau 4. Composition du minerai de fer utilisé dans cette étude qui est fourni par le complexe sidérurgique « Sider El-Hadjar » Annaba

Composants	Pourcentage
Fe	60.75
Si	1.73
Ca	3.92
Mg	0.57
Al	0.28
Ti	0.13
Mn	0.08
P	1.61
S	0.021
Na	0.11
K	0.11
F	0.29
V	0.12

Annexe III

Tableau 1. Composition du milieu Mac Clary

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	1
KCl	1.8
Extrait de levure	2.5
Acétate de sodium	8.2
Agar	15

Tableau 2. Composition du milieu Fowells

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Acétate de sodium trihydraté	5
Agar	20

Tableau 3. Composition du milieu Gordkowa

Ingrédients	Concentrations (g/l)
Glucose	1
Peptone	10
NaCl	5
Agar	20

Annexe IV

Tableau 1. Caractères généraux et culturaux des souches de références

Caractères	Souches de référence		
	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Temps de croissance	48h	48h	48h
Absorption du RC	Absorbe peu le RC	Absorbe peu le RC	Absorbe peu le RC
Croissance sur BBT	Alcalinisante	Alcalinisante	Acidifiante
Croissance sur GPA	Positive	Positive	Positive

Tableau 2. Identification biochimiques en utilisant API 20E des rhizobactéries associés à *L. ochrus*

Isolats	Forme	Identification	Pro (%)	IT
LnPF1	Court bâtonnets	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	74.7	0.6
LnPF2	Cocci	Non fermenteur spp	33.2	1
LnPF3	Petits bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	41.2	0.9
LnPF4	Petits bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF5	Cocci	ND	-	-
LnPF6	Gros bâtonnets	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75.9	0.81
LnPF7	Large bâtonnets	<i>Actinomycètes</i>	-	-
LnPF8	Bâtonnets	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	26.3	1
LnPF9	Gros cocci	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF10	Gros cocci	ND	-	-
LnPF11	Gros cocci	ND	-	-
LnPF12	Petits bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF13	Bacilles	<i>Burkholderia cepacia</i>	84.4	-0.05
LnPF14	Bacilles	<i>Burkholderia cepacia</i>	57.6	0.88

LnPF15	Cocci	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF16	Petits cocci	ND	-	-
LnPF17	Cocci	ND	-	-
LnPF18	Bâtonnets	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	26.3	1
LnPF19	Bâtonnets	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	26.3	1
LnPF20	Cocci	ND	-	-
LnPF21	Courts bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	90.7	1
LnPF22	Très courts bâtonnets	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11.9	0.82
LnPF23	Très courts bâtonnets	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11.9	0.82
LnPF24	Petits bâtonnets	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	33.7	0.9
LnPF25	Petits bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF26	Cocci	ND	-	-
LnPF27	Cocci	ND	-	-
LnPF28	Cocci	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92.7	0.5
LnPF29	Cocci	Non fermenteur spp	33.2	1
LnPF30	Cocci	ND	-	-
LnPF31	Court bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF32	Petits cocci	<i>Methylobacterium mesophilum/</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.7 75.5	0.4 0.84
LnPF33	Très court bâtonnets	<i>Ochrobactrum anthrapi</i>	26.3	1
LnPF34	Cocci	ND	-	-
LnPF35	Cocci	ND	-	-
LnPF36	Petits bâtonnets	<i>Alcaligenes / Bordetella /</i> <i>Moraxella spp</i>	43.3	0.9
LnPF37	Petits bâtonnets	<i>Chryseobacterium indoligenes</i>	35	0.9
LnPF39	Court bâtonnets	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11.9	0.82
LnPF40	Cocci	ND	-	-

LnPF41	Cocci	ND	-	-
LnPF42	Cocci	ND	-	-
LnPF43	Cocci	ND	-	-
LnPF44	Bâtonnets de taille moyenne	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	75.7	0.69
LnPF45	Petits cocci	<i>Burkholderia cepacia</i>	50.4	0.94
LnPF46	Court bâtonnets	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67.6	0.2
LnPC1	Cocci	ND	-	-
LnPC2	Petits cocci	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92.7	0.9
LnPC3	Gros cocci	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74.4	0.41
LnPC4	Long bacilles	<i>Ochromobactrum anthropi</i>	26.3	1
LnPG1	Cocci	<i>Aeromonas salmonicida spp</i>	88.8	0.56
LnPG2	Court bâtonnets	<i>Enterobacter cloaceae</i>	94.3	0.45

Pro : probabilité, IT : indice de typicité

Rock Phosphate Solubilization and Heavy Metals Resistance of Rhizobacteria Isolated from Nodules of *Lathyrus ochrus*

Chama Lemboub and Djamel Chekireb

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Faculty of Sciences,
Department of Biochemistry, University Badji Mokhtar -Annaba 23000- Algeria.

<http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.2.05>

(Received: 02 March 2018; accepted: 27 April 2018)

Fifty-one rhizobacteria were isolated from root nodules of the wild legume *Lathyrus ochrus*, wild legume growing in a polluted soil around the Steel Factory Sider El-Hadjer in the north east of Algeria. These isolates characterized for their ability to dissolve inorganic phosphate and their tolerance to the following heavy metals cadmium, cobalt, chromium, copper, mercury, nickel, lead, iron and zinc. Sixty per cent of the isolates solubilize $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and CaH_2PO_4 on solid agar media. The solubilization of an Algerian rock phosphate (ARP) carried out on liquid media (National Botanical Research Institute) and the higher concentrations of phosphate released by isolates LnPF46 and LnPF32 are respectively 150.22 and 206.98 mg/L. The test of the tolerance to heavy metals show that isolates LnPF44, LnPG1 and LnPG2 are resistant to high concentrations of iron, zinc, mercury, lead and copper.

Keywords: ARP, heavy metals, *Lathyrus ochrus*, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), phosphate solubilization.

One of the main concerns of the world today is the sustainability of agricultural systems without compromising the quality and conservation of the environment¹. Phosphorus (P) is the essential mineral for plant development and growth, it is the second chemical compound used in agriculture in the world².

One of the main reasons for using PGPRs in agriculture is their secretion of metabolites that directly stimulate plant growth³ and among them solubilization of inorganic phosphate⁴, and improvement plant resistance to stress, salinity and heavy metals toxicity⁵⁻⁶. The PGPR use several P solubilization mechanisms as, dissolving inorganic phosphate by organic acids⁷, liberation of extracellular enzymes and phosphate release during substrate degradation⁸. Some legumes such

as *Lathyrus* species play an important role in the natural ecosystem by occupying various habitats because of their higher adaptability to all types of soils and climatic conditions⁹.

In Algeria, twenty-one species and subspecies of *Lathyrus* sp. are recorded¹⁰ essentially cultivated for human and animal nutrition¹¹.

The aim of this work is the study of PGPR associated with indigenous *Lathyrus ochrus*, endemic in the Northeast region of Algeria. The PGPRs isolated were tested for their ability to solubilize inorganic P on solid and liquid media, and their resistance to different concentrations of Cd^{++} , Co^{++} , Cr^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Ni^{++} , Pb^{++} , Fe^{++} and Zn^{++} .

MATERIALS AND METHODS

Plant material and rhizobacteria trapping tests

The soil samples taken from a polluted area and used for rhizobacteria trapping tests collected at Sidi Amar El-Hadjer locality at the

* To whom all correspondence should be addressed.

Tel.: 05 59 48 60 51;

E-mail: chama.88@hotmail.fr

Northeast of Algeria. The origin of the metallic pollution of the soil in this area is the redeposit dusts from Steel Industry (Sider El-Hadjar). Twenty jars were used and filled by soil samples (1 Kg), supplemented with 200 g of iron ore. Each jar sown with two germinated seeds of *Lathyrus ochrus* and a period of two months is required for growth and nodulation of plants. Then the plants carefully uprooted and the root nodules were surface sterilized by immersion 4 min in a sodium hypochlorite solution (2%) and washed six times with sterile distilled water. Root nodules were crushed aseptically with glass rod and the suspension obtained was then streaked on three solid media; YMFP [Yeast Extract Mannitol supplemented with iron ore and ARP (33% of P)], acetamide agar and charcoal medium¹².

Screening for phosphate solubilizing bacteria (PSB) on solid media

The aim of this test is the evaluation and appreciation of the ability of the isolates to solubilize various forms of inorganic P. Isolates were tested on five solid media; YMA (yeast extract mannitol agar)¹², PVK¹⁴, SP (basal Sperber medium)¹⁵, MNBRI and NBRIP¹⁶. Using the drop method, plates were inoculated with 7 μ L of the crushed suspension and incubated at 28°C during 15 days as time growth. The rhizobacterial isolates obtained were tested on three media, NBRIP medium supplemented with 5 g/L of Ca₃(PO₄)₂ (TCP), CaHPO₄ (CHP) and ARP, as insoluble P source.

A comparative test done with MNBRI and NBRIP media with and without yeast extract. The first medium composition is as follow; 20 g/L of glucose, 10 g/L of MgCl₂ and 0.1 g/L of yeast extract, and the second medium contains 10 g/L of glucose and 5 g/L of MgCl₂, using CHP as the insoluble source of P.

ARP solubilization

Twenty-six selected isolates used to quantify the ARP solubilization on NBRIP and MNBRI liquid media by using Erlenmeyer flasks containing 50mL of the medium. This test done in triplicate with 2 mL of rhizobacterial isolate suspensions ($\approx 8.10^8$ CFU/mL) and an uninoculated medium used as a control.

The cultures incubated on rotary shaker at 28°C with an agitation speed of 150 rpm for one week. The cultures were harvested by

centrifugation at 6000 rpm for 20 min. Phosphate released is estimated by the method described by Chen et al¹⁷.

Heavy metals resistance

Twenty-six phosphate-solubilizing isolates selected for heavy metal resistance ability. The concentrations of heavy metals are as follow; [Zn⁺⁺], 12, 16 and 32 mM; [Cd⁺⁺], 0.8, 1 and 2.5 mM; [Ni⁺⁺], 0.7, 1, 2.5 mM; [Co⁺⁺], 1, 2 and 3 mM; [Cu⁺⁺], 1, 2 and 2.5 mM; [Cr⁺⁺], 0.2, 0.7 and 1mM; [Fe⁺⁺], 1.7, 8.95, 17.90, 26.85, 35.8 and 44.75 mM; [Hg⁺⁺], 1, 2, 5, 8, 15 and 20 mM, [Pb⁺⁺], 0.4, 0.7, 1, 3, 8 and 10 mM.

Each metal concentration tested in duplicate and the culture incubation is at 28°C for two weeks.

Plant nodulation test

Seeds of *Lathyrus ochrus*, were germinated on Murashige and Skoog medium under sterile conditions using the method described by Brunet et al¹⁸. Three seeds planted in plastic jars containing sterile sand. The inoculation suspensions were prepared with isolates at the exponential growth phase and the growth of the inoculated plants done under natural conditions and watered with the solution of Rigaud and Puppo¹⁹. After eight weeks, the plants uprooted and the presence of nodules on the roots recorded. Four replications carried out for inoculated plants and two replications for non-inoculated jars (negative control).

Phenotypic characterization of ARP-solubilizing isolates

Nine isolates were characterized for catalase, oxidase, growth on glucose peptone agar medium (GPA), acid or alkali production and API20NE standardized systems. The isolates tested for their growth on YMA medium supplemented by 1, 2.5 and 5% (w/v) of NaCl, and on TA medium containing 2% (w/v) of NaCl²⁰. *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia* sp. and *Cupriavidus* sp. used as reference strains.

Statistical analysis

The Principal Component Analysis (PCA) was performed to examine the relationships between the tolerance of isolates in vitro to high concentrations of heavy metals, ARP solubilization and salinity, and a phenogram was constructed by the Agglomerative Hierarchical Clustering method (AHC). Computations, graphical display and a computer cluster analysis phenotypic variables

carried out using the XLSTAT software package (<http://www.xlstat.com>).

RESULTS AND DISCUSSION

Trapping and rhizobacteria isolation

Forty *Lathyrus ochrus* plants show a well-developed aerial part and a highly branched root system and the number of nodules is between 24 to 50 nodules with red or white color, and mainly located in the upper part of the roots. *Lathyrus ochrus* plants are well adapted to soil enriched with iron ore used. The nodulations, in this trapping test,

are due to the presence of free rhizobia capable of inducing nodulation.

In this study, fifty-one strains were isolated from nodules of *Lathyrus ochrus* developed on the mixture of soil and iron ore. These isolates are different in their growth time ranged between 48 h and 5 days (Table 1) and macroscopic characters of colonies as colours (white, red, pink, yellow, and egg yolk); aspect, smooth or rough, translucent or opaque and circular colonies. The diameter of the colonies varied between 1 and 5 mm and even punctuate after 3-7 days of incubation. The isolates did not produce polysaccharide. This variety of

Table 1. Growth time of isolates

Growth time (days)	Isolates (%)	Isolates
Group A : 2	37.25	LnPF2, LnPF3*, LnPF4, LnPF5, LnPF8, LnPF13, LnPF14, LnPF18*, LnPF22*, LnPF26, LnPF42, LnPF44, LnPF46, LnPC1, LnPC2, LnPC3, LnPC4, LnPG1*, LnPG2*
Group B : 3-4	33.33	LnPF7, LnPF9, LnPF11, LnPF12, LnPF19, LnPF20, LnPF21, LnPF23, LnPF24, LnPF25, LnPF30, LnPF32, LnPF34, LnPF35, LnPF39, LnPF43, LnPF45
Group C : 5	29.41	LnPF1, LnPF6, LnPF10, LnPF15*, LnPF16, LnPF17, LnPF27, LnPF28, LnPF29, LnPF31*, LnPF33, LnPF36, LnPF37, LnF40, LnPF41.

*Colonies with metallic reflects

Table 2. ANOVA of the solubilization of inorganic P (TCP, CHP, ARP) on the solid media Mean values (cm) are ratio of dissolution halo (DH)/colony diameters (CD)

Medium	DH/CD	Inorganic P Degree of freedom	Mean square
NBRIP	0.62a	2	0.094
MNBRI	0.55b		
PVK	0.44b		
NBRI(TCP)	0.44c	2	3.69
NBRI(CHP)	0.93d		
NBRI(ARP)	0a		
NBRIP*	0.93f	2	0.38
NBRIP**	0.79g		
MNBRI	0.73g		

Mean values (cm) are ratio of dissolution halo (DH)/colony diameters (CD)

*: without yeast extract, **: with yeast extract (0.1mg/L)

Results are mean of three replicates. Means followed by the same letter are significantly at $P < 0.01$

morphological characteristics of isolates reflects the diversity of rhizobacteria inside nodules of *Lathyrus ochrus*.

Growth of isolated phosphate solubilizing rhizobacteria

The solubilization of TCP tested on YMA and the results shows that isolates LnPF3, LnPF12, LnPF14, LnPF20, LnPF23, LnPF25, and LnPG1 exhibit a low solubilization of TCP. This observation could be explained by the effect of carbon sources on solubilization of phosphate; it is known that mannitol is not a good source of C for P mobilization studies²¹ and generally, the solubilization of P is better when glucose is used as carbon source²². The second solubilization test done with SP medium shows a clear but not complete solubilization of P by isolates LnPC2, LnPF4, LnPF5, LnPF8, LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF23, LnPF31, LnPF44, LnPF46, LnPG1 and LnPG2.

The media NBRIP, PVK and MNBRI, give a better solubilization of P and the number of

isolates are respectively 12, 13 and 16 as presented in the Fig. 1. There is a similarity in chemical composition between these three media and the analysis of the results presented in Table 2 shows that the solubilization of TCP on these media is similar with a significant relationship between MNBRI and PVK ($P < 0.01$).

The isolates solubilize CHP better than TCP on NBRIP medium and no strain could solubilize ARP on solid media. The solubilization of P is also affected by yeast extract, the isolates LnPF5, LnPF20, LnPF25 and LnPF37 required yeast extract for solubilizing P and the others like LnPF19, LnPF28, LnPF31 and LnPF32 did not need yeast extract. Nautiyal¹⁴ demonstrate that a concentration higher than 0.5 g/L of yeast extract can inhibit the solubilization of P and in our study, we note that solubilization of P is inhibited with only 0.1 g/L of yeast extract.

The interpretation of the results (Table 2) gives the significant relationship between only NBRIP (with yeast extract) and MNBRI, with $P < 0.005$. According to these results, we selected MNBRI and NBRIP media without yeast extract to carry out the other tests of solubilization. These results allowed us to select 26 solubilizing phosphate isolates on solid media used.

ARP solubilization on liquid media

The results of the solubilization of ARP

on NBRIP and MNBRI media used in this test, have allowed to select the following nine isolates; LnPF18, LnPF46, LnPF13, LnPF14, LnPF44, LnPF19, LnPG1, LnPG2 and LnPF32. The two groups of rhizobia strains G1 (LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF44, LnPF46, LnPG1) and G2 (LnPG2, LnPF18 and LnPF32) Fig. 2 released an average of 136.84 and 118.62 respectively of P from ARP. These quantities were significantly ($P < 0.005$) correlated. According to Fig. 2, the solubilization activity of ARP by all strains tested was significantly ($P < 0.05$) increased with time and then the higher concentration of P solubilized achieved after 90 hours for G1 and 162 hours for G2.

The P solubilization activities by G1 strains are as follow; LnPF13, 115.91 mg/L; LnPF14, 136.64 mg/L; LnPF44, 145.77 mg/L; LnPF46, 150.22 mg/L; LnPF19, 168.23 mg/L; LnPG1, 152.69 mg/L. The G2 strains have better activities of P solubilization. Indeed, the concentrations of phosphate released in the liquid medium are respectively for LnPF32, 206.98 mg/L higher than LnPF18, 112.21 mg/L and LnPG2; 36.69 mg/L.

The release of available P leads to a decrease of the pH values of the liquid media from 7 to 3.88 and 3.97 for LnPF46 and LnPG1 respectively. This inverse relationship observed

Table 3. Maximal tolerance concentration (MTC) of Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Cr⁺⁺, Co⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺, Pb⁺⁺, Hg⁺⁺ and Fe⁺⁺ in (mM) towards isolates solubilizing ARP

MTC (mM)	Isolates solubilizing ARP								
	LnPF13	LnPF14	LnPF18	LnPF19	LnPF32	LnPF44	LnPF46	LnPG1	LnPG2
12 ≤ [Zn ⁺⁺] ≤ 16	-	-	-	-	-	+	-	+	+
12 ≤ Zn ⁺⁺ ≤ 16	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1 ≤ Cu ⁺⁺ ≤ 2	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1 ≤ Cu ⁺⁺ ≤ 2.5	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Cr ⁺⁺ ≤ 0.2	+	+	-	+	+	+	+	+	+
0.2 ≤ Cr ⁺⁺ ≤ 0.7	+	+	-	+	-	+	+	+	+
0.7 ≤ Cr ⁺⁺ ≤ 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Co ⁺⁺ ≤ 1	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cd ⁺⁺ ≤ 0.8	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Cd ⁺⁺ ≤ 2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.7 ≤ Ni ⁺⁺ ≤ 1	+	+	-	+	-	-	+	-	-
0.4 ≤ Pb ⁺⁺ ≤ 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 ≤ Hg ⁺⁺ ≤ 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.7 ≤ Fe ⁺⁺ ≤ 44.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : resistant, - : sensitive

between the pH and soluble P concentration indicates that organic acids plays a significant role in the acidification of the medium facilitating the P solubilization by these phosphate solubilizing bacteria strains²³, such as gluconate, oxalate, citrate, acetate, lactate, tartarate, succinate, ketogluconate and glycolate²⁴. The two groups of rhizobia strains have a strong significant (G1: $P < 0.001$, G2: $P < 0.05$) inverse correlations (G1: $r = -0.8$, G2: $r = -0.7$) were observed between the pH of the cultures and their soluble P content.

Heavy metals resistance test

The results shown on Fig. 3 indicate the percentage of isolates resistance at different concentrations of nine heavy metals. We note that all the isolates resist to Fe, Hg, Pb > Cr > Cu > Ni > Cd > Zn.

Isolates LnPF44, LnPF23, LnPF5, LnPF36, LnPG1 and LnPG2 are the most resistant isolates to all heavy metals tested and LnPG1 is the only isolate that resist to Co at 1mM.

The results presented in Table 3 show the resistance of nine isolates to heavy metals on solid

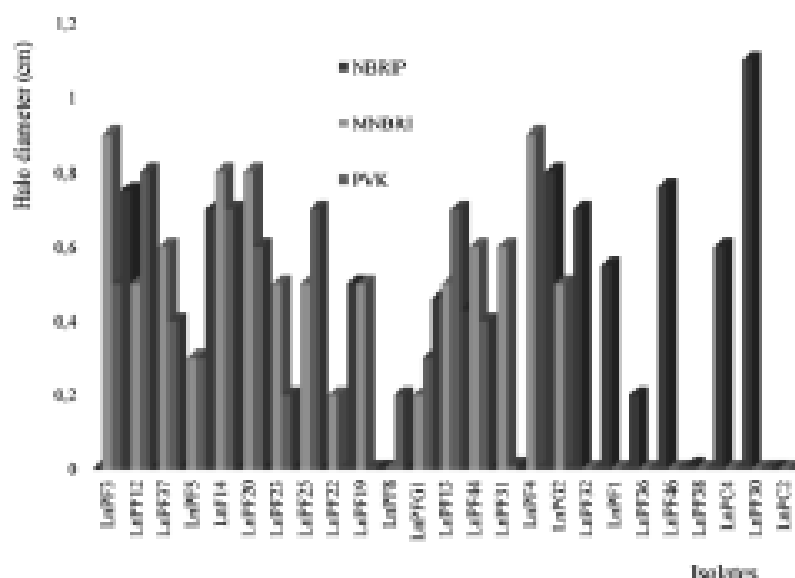


Fig. 1. Comparative test between solubilization of TCP on NBRIP, MNBR1 and PVK solid media

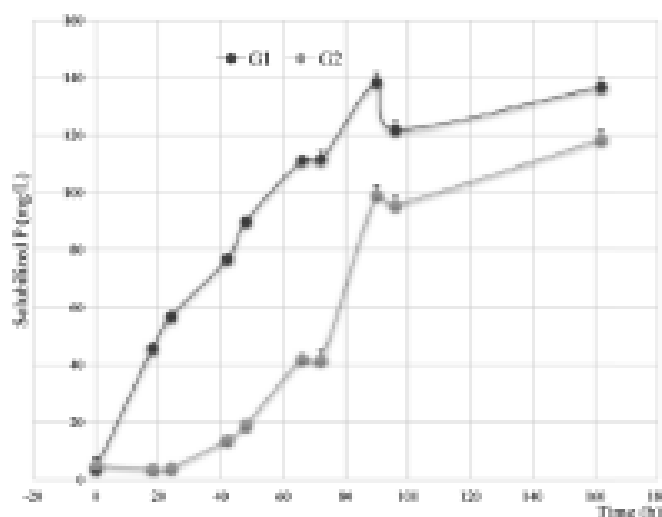


Fig. 2. Solubilization of ARP in the liquid NBRIP and MNBR1 media by bacterial isolates belonging to the following groups: (G1), LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF44, LnPF46, LnPG1 and (G3), LnPG2, LnPF18 and LnPF32. Error bars are ± standard error (n = 3)

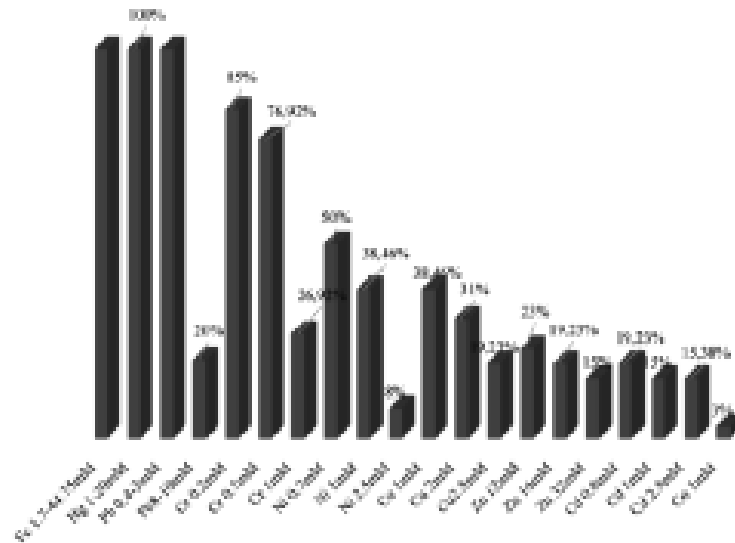


Fig. 3. Resistance percentage of isolates to different concentrations of heavy metals on solid medium

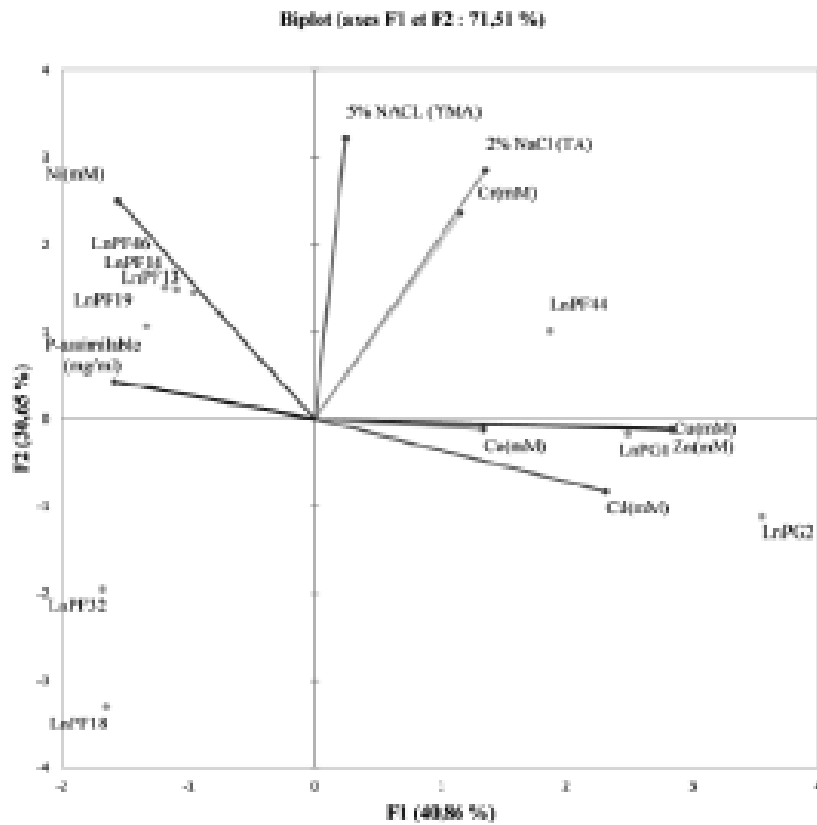


Fig. 4. PCA showing the relationship between heavy metals, ARP solubilisation and tolerance to salinity on liquid media

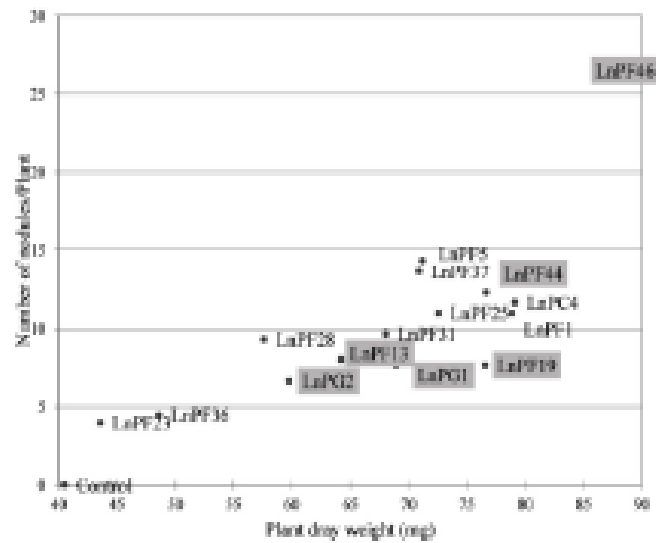


Fig. 5. The number of nodules induced by *Lathyrus ochrus* isolates versus plant dry matter, framed isolates correspond to those solubilize the P on liquid medium

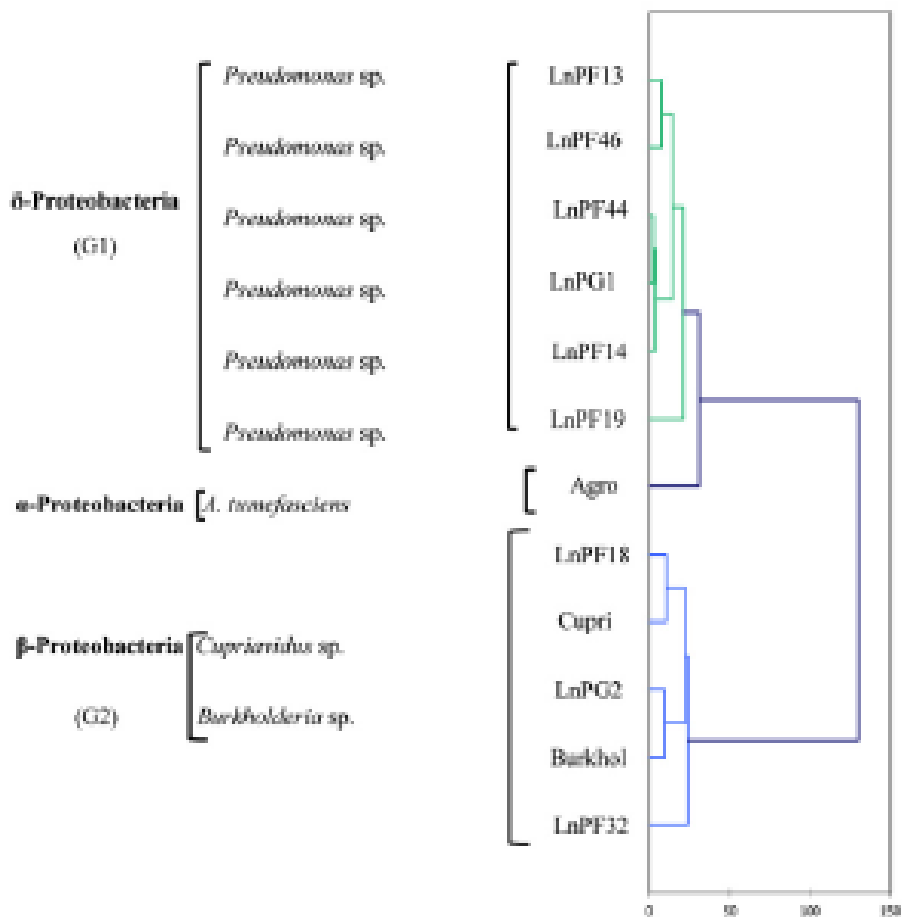


Fig. 6. AHC dendrogram of phenotypic characters of isolates solubilizing ARP and their belonging genus

media and their maximal tolerance concentration (MTC) described by Al-Enzi and Charrakh²³ as the highest metal concentration at which the growth of bacteria was still observed. The isolates tolerate heavy metals according to this order Fe, Hg, Pb > Cr > Ni > Zn, Cu > Cd > Co.

The toxicity of heavy metals evaluated as low for Fe, medium for Zn, Ni, Cu, Co, Cr and high for Cd, Hg, Pb²⁶, and our isolates have resisted to these three degrees of heavy metal toxicity.

The PCA graphs in Fig. 4 showed that the direction of the axis variables reflects the strong relationship between resistance to heavy metals and solubilization of ARP. This relation was confirmed by Seob et al.²⁷ and reported that all PSB strains were tolerant to heavy metals (Cd, Pb and Zn). In addition, *Burkholderia* sp. resistant to heavy metals isolated from contaminated soil with heavy metals is capable of solubilizing inorganic P²⁸.

According to the correlation study between the parameters using the Pearson test revealed a significant correlation between all the parameters studied. The ARP solubilization activity negatively correlated with the resistance to Zn, Cu, Cd, and Co. On the other hand, the tolerance to salinity significantly correlated with the resistance to Ni and Cr.

For the behavior of the isolates with regard to the resistance to heavy metals, the ARP solubilization activity and the tolerance to the salinity, we can classify them into three classes:

- The first group contains LnPF44, LnPG1 and LnPG2 isolates with high resistance to the majority of heavy metals tested and tolerate 5% of NaCl.
- The second group comprises LnPF14, LnPF19, LnPF46 and LnPF13 isolates having a high tolerance to NaCl 5% and resistant to Ni and Cr but they do not resist to Co, Zn and Cd.
- The third group includes LnPF32 and LnPF18 isolates that are poorly resistant to metals (not resistant to Co, Zn, Cd and Ni) and tolerate only 2.5% of NaCl.

In this study, we note that fast growing isolates were generally more tolerant to high NaCl concentrations and more resistant to heavy metals than slow growing one.

Nodulation test

Fifty seven per cent of the isolates have induced nodulations in the host plant *Lathyrus ochrus*. The observation of nodules showed that

nodules are white and their number varied from 4 to 26. Experiments carried out on the mutant of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize the δ -aminolevulinic acid (ALA) precursor of the heme produced white nodules incapable of fixing nitrogen²⁹, which may be due to the metallic pollution or absence of genes Fix (bacteria *nod+* and *fix-*) which produces white nodules unable to fix atmospheric nitrogen.

The Fig. 5 shows the relationship between dry matter (dry weight of the aerial parts of the nodulated plants) and the number of nodules. We observed that the dry matter increased proportionally with the number of nodules, this explain that these bacteria were able to develop the aerial part of *Lathyrus ochrus* and thus increase its growth.

Among nine ARP-solubilizing isolates, LnPF13, LnPF19, LnPF44, LnPF46, LnPG1 and LnPG2 isolates are able to infect their host plant and LnPF46 isolate produce the highest number of nodules up to 26 nodules.

Phenotypic characterization for isolates solubilizing ARP

The nine isolates solubilizing ARP were Gram-negative, Catalase and oxidase-positive. Furthermore, the majority of colonies obtained in YMA-CR were retained their initial color and/or absorbed little CR and color change of pH indicator to yellow was detected of the majority of isolates tested except LnPF18 and LnPF32 which have alkalinized the medium.

The results obtained of API20NE, osmotolerance and all presumptive tests were used for phenotypic characterization with *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp. and *Agrobacterium tumefaciens* as reference strains.

The analysis of phenotypic characters presented as a dendrogram of dissimilarity HAC in Fig. 6, and the results showed three separate groups (G1, G2 and G3). G1 group comprise LnPF13, LnPF14, LnPF19, LnPF44, LnPF46 and LnPG1 isolates and belong to gamma-Proteobacteria (*Pseudomonas* sp.). The reference species *Agrobacterium tumefaciens* C58 constitute a separate group then the isolates do not belong to the genera *Agrobacterium*. G2 group comprise LnPG2, LnPF18, LnPF32 and reference species *Burkholderia* sp. and *Cupriavidus* sp.; this group belong to beta-Proteobacteria. According to the

study carried out by Shiraishi et al¹⁰, *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. form nodules on Black locust and developed differentiated nodule tissue. A phylogenetic analysis of *nodA* and *nodC*, *nifH* and *nifHD* genes revealed that these symbiotic genes of *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. have high similarities with rhizobial species. These results indicate the importance of horizontal gene transfer for establishing symbiotic interactions in the rhizosphere.

Lathyrus sp. are commonly nodulated by *Rhizobium leguminosarum viciae*¹¹, but the presence of *R. tropici* were found in *L. sylvestris* and *L. vernus*, the nodules of *L. palustris* were shown to contain bacteria similar to *Agrobacterium* sp. All bacteria isolated from Gmelinlathyrus (*L. gemelini Fritsch*) were shown to be similar to *Phyllobacterium myrsinacearum* by the 16SrDNA gene sequence¹². Kuznetsova et al¹³, they found the presence of *Phyllobacterium* and *Burkholderia* sp and *Bosea lathyri* in *Lathyrus humilis* nodules, also De Meyer and Willems¹⁴ have a gain mentioned the presence of *Bosea lathyri* in a nodules of *Lathyrus latifolius*.

In conclusion, we showed that the *Lathyrus ochrus* developed in the mixture of soil contaminated with redeposit dusts from Steel Industry (Sider El-Hajar) from the Northeast of Algeria and iron ore, represent one of the best host traps to isolate rhizobacterial strains which have an important PGPR characteristics, solubilization of ARP, resistance to heavy metals and osmotolerance. The phenotypic characteristics studied shows that these rhizobacterial strains are outside the traditional rhizobia and/or belong to fast growing rhizobia; may represent new genospecies that need further characterization to assess for their taxonomical status.

REFERENCES

1. Khalid, A., Arshad, M., Shaharouna, B., Mahmood, T.: Plant growth promoting Rhizobacteria and sustainable agriculture. In: Microbial strategies for crop improvement (ed). Berlin: Heidelberg Springer-Verlag, 2009; pp.133-160.
2. Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O.P., Wani, S.P., Reddy, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.*, 2008; 163: 234-242.
3. Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercilis, S., Donmez, M.F., Turan, M., Gunes, A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown Strawberry. *Sci. Hortic.*, 2010; 124: 62-66.
4. Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Hindawi. Pub. Corp. sci.*, 2012; 2012: 1-15.
5. Ahemad, M. and Kibret, M. Mechanisms and application of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King. Saud. Univ. Sci.*, 2014; 26: 1-20.
6. Wakwa, C., Okun, D., Jama, K., Shitabula, D., Okhoth, P., Nyongosa, P., Katoo, A., Mbulama, S., Wamalwa, E., Mahalo, C., Koyo, M., Rotich, A., Kawaka, F., Muoma, J. Abundance and symbiotic potential of common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodule associated bacteria in Western Kenya soil. *MAYFEB. Journal of Agricultural Science.*, 2016; 1:1-9.
7. Ivanova, R., Bojinova, D., Nedialkova, K. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *J. Chem. Technol. Metall.*, 2006; 41: 297-302.
8. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soil. Springer plus., 2013; 2: 587.
9. Campbell, C.G.: Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 18. In: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome: Italy, 1997; pp 1-91.
10. Quézel, P. and Santa, S.: New flora of Algeria and the southern desert regions, 1 and 2 tomes. Paris: CNRS, 1962; pp1-1170.
11. Second National Report on the State of Plant Genetic Resources. National Institute of Agronomic Research of Algeria. United Nations Food and agriculture., 2006.
12. De Meyer, S.E. and Willems, A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea Lupini* sp.nov., *Bosea Lathyri* sp.nov. and *Bosea robustae* sp.nov., isolated from legumes. *Int.J. Sys. Evol. Microbiol.*, 2012; 62: 2505-2510.
13. Vincent, J.M. (ed): A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: IBP handbook 15 Blackwell Scientific Publications, 1970; pp1-164.
14. Piskovskaya, R.I.: Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species., *J. Microbiol.*, 1948; 17: 362-

- 370.
15. Sperber, J.I. The incidence of apatite by solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agri. Res.*, 1958; 9: 778-781.
 16. Nautiyal, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999; 170: 263-270.
 17. Chen, P.S., Toriba, T.Y., Warner, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 1956; 28: 1756-1758.
 18. Brunet, J., Reppellin, A., Varrault, G., Terryn, N., Zwily-Fodil, Y. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus L.*): a novel plant for phytoremediation Systems. *C. R. Biol.*, 2008; 331: 859-864.
 19. Djedidi, S., Yokoyama, T., Ohkama-Ohtsu, N., Chandra-Prasad-Risal, C., Abdolly, C., Hitoshi-Sakimoto H. Stress tolerance and symbiotic and phylogenetic features of root nodule bacteria associated with Medicago species in different bioclimatic regions of Tunisia. *Microbes. Environ.*, 2011; 26: 36-45.
 20. Thami-Alami, I., Elboutahiri, N., Udapa, S.M. Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *Options. Mediterr. Séria. A. Méditerran. Sémin.*, 2010; 92:265-269
 21. Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., Antoun, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant. Soil.*, 2006; 287: 35-41.
 22. Silva Filho, G.N. and Vidor, C. Phosphate solubilization by microorganisms in the presence of different carbon sources. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.*, 2000; 24: 311-319.
 23. Chen, Y.P. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil. Ecol.*, 2006; 34: 33-41
 24. Walpola, B.C. and Yoon, M.H. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorus uptake of mung bean (*Vigna radiata [L.] R. Wilczek*). *Chil. J. Agri. Res.*, 2013; 73: 275-281.
 25. Al-Enzi, R.M.J. and Al-Charrakh, A.H.: Heavy metal resistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa* as a model. In: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012; pp 1-93.
 26. Nies, D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999; 51:730-750.
 27. Seob, J., Walpola, B.C., Chung, D.Y., Yoon, M.H. Heavy Metal Resistant Phosphate Solubilizing Bacteria. *Korean. J. Soil. Sci. Fertil.*, 2012; 45: 817-821.
 28. Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemed, M., Oves, M. Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 2009; 56: 263-284.
 29. Hopkins, W. G. and Häser N. P. A.: Introduction to plant physiology. New York: University of Western Ontario, John Wiley and sons.; 2008; pp 1-503.
 30. Shiraiishi, A., Matsuhita, N., Hougetsu, T. Nodulation in balck locust by the Gamma-proteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Beta-proteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2010; 33(3): 269-274.
 31. Mazur, A., De Meyer, S.E., Tian, R., Wislbo, J., Zembrachi, K., Seshadri, R., Reddy, T., Markowitz, V., Ivanova, N.N., Pati, A., Woyke, T., Kyripides, N.C., Reeve, W. High-quality permanent draft genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae strain GB30; an effective microsymbiont of *Pisum sativum* growing in Poland. *Genomic. sci.*, 2015; 10:36.
 32. Baymiev, A.K., Ptityra, K.G., Muldashen, A.A., Baymiev, A.K. Genetic Description of Root Nodule Bacteria of *Lathyrus* species growing on the Territory of the Republic of Bashkortostan. *Russ. J. Genet.*, 2012; 2: 122-126.
 33. Kuznetsova, I.G., Sazanova, A.L., Saffronova, V.I., Pinaev, A.G., Verkhovzina, A.V., Tikhomirova, N.Ya., Osledkin, Yu.S., Balimov, A.A. Genetic diversity among microsymbionts of *Lathyrus*, *Vicia*, *Oxytropis* and *Astragalus* legume species from Baikal region. *Agricultural Biology*, 2015; 50: 345-352.