

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث 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

Spécialité : Microbiologie

THEME

**Isolement et identification génotypique des
rhizobactéries associées aux légumineuses de sols
miniers. Résistance aux métaux lourds et séquençage des
gènes de résistance**

Présentée par : Mlle RAHAL Sarah

Directeur de thèse : CHEKIREB Djamel

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Membres de Jury:

Présidente : Mme GACEMI-KIRANE Djamila

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Examinatrice : Mme BENBOUZID Houneida

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Examinatrice : Mme AOUN Leila

Prof., Université Chadli Bendjedid El-Tarf

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience pour surmonter toutes les difficultés et l'endurance qu'il m'a fourni pour accomplir ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **CHEKIREB Djamel**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir dirigé cette thèse de doctorat. Je lui adresse ma plus sincère reconnaissance pour son aide, sa grande disponibilité, ses conseils perspicaces, sa confiance et ses qualités humaines et scientifiques qui m'ont permis de bien mener ce travail.

Mes remerciements vont particulièrement à Madame **GACEMI-KIRANE Djamila**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Mon appréciation et ma gratitude vont à Madame **BENBOUZID Houneida**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Ma gratitude va aussi à Madame **AOUN Leila**, Professeur à l'Université d'El-Taref, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur **GOURION Benjamin** chargé de recherche au laboratoire des interactions plantes- microorganismes (LIPM) à Toulouse pour son aide dans les expériences et ses conseils extrêmement utiles.

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

Je remercie tous mes amis, il est difficile de décrire en quelques lignes à quel point je suis reconnaissante pour tous les bons moments partagés lors de toutes ces années d'études.

Finalement, mon plus grand merci revient à mes parents, mes frères Abdelaziz et Abdenour et ma sœur Kaoutar, je n'en serai pas las sans ma famille, merci de m'avoir soutenu tout au long de ce parcours, de m'avoir permis d'en arriver là et surtout me supporter tout au long de cette période !

SOMMAIRE

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

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Ecosystèmes miniers	4
1. 1. Généralités sur les légumineuses des sols miniers	4
1. 2. Genre <i>Trifolium</i>	5
1. 2. 1. Description botanique	5
1. 2. 2. Origine et répartition	6
1. 2. 3. Intérêts	7
1. 3. Microorganismes dans les sites miniers	7
1. 4. Classification et minéralogie des mines de Plomb-Zinc	10
1. 4. 1. Gisement dans les sédiments	10
1. 4. 2. Gisement de sulfure massif volcanogène	10
1. 4. 3. Gisement de skarn (roche calcaro-silicatée)	10
1. 4. 4. Gisement de porphyre	10
1. 4. 5. Gisements épithermaux	11
1. 4. 6. Gisements de type Manto	11
1. 4. 7. Gisements aurifères orogéniques et mésothermiques filoniens	11
1. 4. 8. Gisements d'oxyde de fer, de cuivre et d'or	11
1. 5. Gites en Algérie	11
1. 5. 1. Différents types de minéraux	12
1. 5. 2. Ressources géologiques	13
2. Métaux lourds	14

2. 1. Définition des métaux lourds	14
2. 2. Origines des métaux lourds	14
2. 2. 1. Origines naturelles	14
2. 2. 2. Origines anthropiques	14
2. 3. Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux lourds	15
2. 3. 1. pH	15
2. 3. 2. Température	15
2. 3. 3. Matière organique	15
2. 4. Dépollution des sols pollués par phytoremediation	16
3. Résistance aux métaux lourds	17
3. 1. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds	17
3. 1. 1. Bioaccumulation	18
3. 1. 2. Système d'efflux	18
3. 1. 3. Conversion enzymatique	18
3. 1. 4. Résistance par imperméabilité	19
3. 1. 5. Résistance par séquestration	19
3. 1. 5. 1. Séquestration extracellulaire	19
3. 1. 5. 2. Séquestration intracellulaire	20
3. 2. Mécanismes de résistance des plantes aux métaux lourds	20
3. 2. 1. Restriction de l'absorption et du transport des métaux	21
3. 2. 2. Complexation des métaux à l'interface paroi cellulaire - membrane	21
3. 2. 3. Complexation et compartimentation des métaux avec les cellules	21

II. MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de la région d'étude	23
1. 1. Site d'échantillonnage des plantes de <i>Trifolium</i> sp.	23
1. 2. Collecte des plantes	24
1. 3. Conservation des nodules	24

2. Isolement et purification des microorganismes	24
2. 1. Désinfection de la surface des nodules	24
2. 2. Isolement des microorganismes à partir des nodules	25
2. 3. Purification des isolats	25
2. 3. 1. Observation macroscopique	25
2. 3. 2. Observation microscopique	25
2. 4. Conservation des isolats	26
2. 4. 1. Conservation à court terme	26
2. 4. 2. Conservation à long terme	26
3. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats	26
3. 1. Test d'absorption du colorant Rouge Congo sur milieu YEMA	26
3. 2. Test du bleu de bromothymol (BTB)	26
3. 3. Croissance des isolats sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)	27
3. 4. Test de la catalase	27
4. Evaluation des activités PGPR des isolats	27
4. 1. Test de solubilisation des phosphates	27
4. 2. Production des sidérophores	27
4. 3. Production d'enzymes	28
4. 3. 1. Activité uréasique	28
4. 3. 2. Activité cellulolytique	28
4. 3. 3. Activité amylolytique	28
4. 3. 4. Activité protéasique	28
4. 3. 5. Activité estérasique (Tween 20)	28
4. 4. Activité antifongique	29
4. 4. 1. <i>In vitro</i>	29
4. 4. 2. <i>In vivo</i>	29
5. Caractérisation de l'isolat- levure RSRod01	30
5. 1. Croissance de l'isolat- levure sur milieu sans source d'azote	30
5. 2. Test de réduction de l'acétylène (ARA)	30

6. Résistance des isolats aux stress métalliques et salin	31
6. 1. Tests de résistance aux métaux lourds	31
6. 1. 1. Sur milieu solide	31
6. 1. 2. Sur milieu liquide	32
6. 2. Tests de résistance à la salinité	33
6. 2. 1. Sur milieu solide	33
6. 2. 2. Sur milieu liquide	33
7. Identification et caractérisation moléculaire des isolats	33
7. 1. Amplification de l'ADN	33
7. 1. 1. Fragments d'ADN à analyser	33
7. 1. 2. Lyse cellulaire	33
7. 1. 3. Amorces utilisées	34
7. 1. 4. Solution mixte pour l'amplification des gènes d'intérêt	35
7. 1. 5. Conditions de l'amplification par PCR des gènes d'intérêt	35
7. 1. 6. Electrophorèse sur gel d'agarose	36
7. 2. Obtention des échantillons d'ADN	36
7. 2. 1. Purification des produits PCR	36
7. 2. 2. Dosage de l'ADN	37
7. 3. Analyse des données	37
7. 3. 1. Séquençage et corrections des séquences	37
7. 3. 2. Analyse phylogénétique des gènes ARNr 16S, ITS, <i>nodC</i> et <i>nifH</i>	37
7. 3. 3. Analyse phylogénétique des gènes de résistance aux métaux lourds	37
8. Analyse statistique	38

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement, caractérisation morphologique et culturale des isolats	39
1. 1. Isolement des rhizobactéries	39
1. 2. Temps de croissance	39

1. 3. Caractéristiques morphologiques	40
1. 3. 1. Observation macroscopique	40
1. 3. 2. Observation microscopique	40
1. 4. Caractéristiques culturelles	42
1. 4. 1. Croissance sur milieu YEMA additionné de Rouge Congo (RC)	42
1. 4. 2. Croissance sur milieu YEMA additionné de bleu de Bromothymol (BBT)	43
1. 4. 3. Croissance sur milieu GPA	45
1. 5. Test de la catalase	45
1. 6. Discussion	46
2. Identification et caractérisation moléculaire des isolats bactériens	48
2. 1. Analyses phylogénétiques du gène ARNr 16S	48
2. 2. Analyses phylogénétiques du gène <i>nodC</i>	58
2. 3. Analyses phylogénétiques du gène <i>nifH</i>	60
2. 4. Discussion	61
3. Criblage des rhizobactéries à traits PGPR	65
3. 1. Solubilisation du phosphate	65
3. 2. Production de sidérophore	66
3. 3. Activité enzymatique	69
3. 3. 1. Uréase	69
3. 3. 2. Cellulase	69
3. 3. 3. Caséinase	69
3. 3. 4. Amylase	69
3. 3. 5. Estérase	71
3. 4. Activité antifongique	71
3. 4. 1. <i>In vitro</i>	71
3. 4. 2. <i>In vivo</i>	72
3. 5. Discussion	74
4. Etude de la tolérance des isolats bactériens aux stress métallique et salin	77
4. 1. Tolérance aux métaux lourds	77

4. 1. 1. Sur milieu solide	77
4. 1. 1. 1. Résistance des isolats au plomb (Pb)	77
4. 1. 1. 2. Résistance des isolats au zinc (Zn)	77
4. 1. 1. 3. Résistance des isolats au nickel (Ni)	79
4. 1. 1. 4. Résistance des isolats au cadmium (Cd)	79
4. 1. 1. 5. Résistance des isolats au cuivre (Cu)	81
4. 1. 1. 6. Résistance des isolats au cobalt (Co)	81
4. 1. 1. 7. Résistance des isolats au chrome (Cr)	82
4. 1. 2. Sur milieu liquide	85
4. 1. 3. Etude des gènes de résistance aux métaux lourds	87
4. 2. Tolérance à la salinité	90
4. 2. 1. Sur milieu solide	90
4. 2. 2. Sur milieu liquide	92
4. 3. Analyse en composantes principales (ACP)	92
4. 4. Discussion	97
5. Isolat-levure RSRod01	101
5. 1. Caractéristiques morphologiques	101
5. 1. 1. Observation macroscopique	101
5. 1. 2. Observation microscopique	101
5. 2. Identification moléculaire	102
5. 3. Etude du comportement de l'isolat RSRod01 par rapport à l'azote	104
5. 3. 1. Croissance sur milieu sans source d'azote	104
5. 3. 2. Mesure de l'activité de réduction de l'acétylène (test ARA)	104
5. 4. Résistance de l'isolat RSRod01 aux métaux lourds et NaCl sur milieu solide	105
5. 5. Criblage de l'isolat RSRod01 à traits PGP	105
5. 6. Discussion	107
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXES	130

LISTE D'ABREVIATION

ACC	1-Amino Cyclopropane-1-Carboxylate
ACP	Analyse en composante principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BBT	Bleu de bromothymol
BCP	Bromocresol purple
BET	Bromure d'étidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAS	Chrome azurol S
Cd	Cadmium
CMC	Carboxy méthyl cellulose
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Co	Cobalt
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
<i>czcD</i>	Gène de résistance aux Cobalt, Zinc et Cadmium
DO	Densité Optique
dNTPs	Desoxyribo Nucleotides TriPhosphate
EPS	Extracellular Polymeric Substances
GPA	Gélose Peptone Agar
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
IAA	Acide indolacétique
ITS	Internal Transcribed Spacer
N₂	L'azote atmosphérique
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>nccA</i>	Gène de résistance aux Nickel, Cobalt et Cadmium
Ni	Nickel
nif	Gènes impliqués dans le processus de fixation d'azote atmosphérique
nod	Produit du gène de nodulation (facteur Nod)
Ma	Mannitol Agar

Pb	Plomb
PDA	Potato Dextrose Agar
PCR	Polymerase chain reaction
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PVK	Pikovskaya
p/v	Poids/Volume
RC	Rouge Congo
TY	Tryptone Yeast
v/v	Volume/Volume
YEM	Yeast Extract Medium
Zn	Zinc

LISTE DES FIGURES

N°Figure	Titre	Page
1	Les espèces de <i>Trifolium</i> les plus fréquemment rencontrées en Algérie	6
2	Mécanismes d'action des PGPR	8
3	Carte des principaux gites et gisements en Algérie	12
4	Mécanismes utilisés pour la phytoremédiation des métaux lourds	16
5	Voies de détoxification proposées pour les micro-organismes vis-à-vis des ions de métaux lourds	17
6	Localisation géographique de la région de Hammam N'Bail	23
7	<i>Trifolium</i> sp.	24
8	Protocole expérimental de l'activité antifongique <i>in vivo</i>	30
9	Protocole expérimental de la résistance aux métaux lourds sur milieu solide	31
10	Protocole expérimental de la résistance aux métaux lourds sur milieu liquide	32
11	Protocole expérimental de la lyse cellulaire	34
12	Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram (X100)	40
13	Croissance des isolats bactériens sur milieu YEMA + RC	43
14	Croissance des isolats bactériens sur milieu GPA	45
15	Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifications du gène ARNr 16S	48
16	Répartition des isolats bactériens selon leurs genres	49
17	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des isolats classe α -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining	50
18	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des isolats classe β -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining	51
19	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des isolats classe γ -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining	52
20	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr	53

	16S (~1400 pb) des isolats classe Firmicutes par la méthode de Neighbour-joining	
21	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des isolats classe Actinobactérie par la méthode de Neighbour-joining	54
22	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène <i>nodC</i> (900 pb) par la méthode de Neighbour-joining	59
23	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène <i>nifH</i> (500 pb) par la méthode de Neighbour-joining	60
24	Diamètre de l'halo de la solubilisation du phosphate des isolats bactériens	65
25	Production de sidérophore par les isolats bactériens	66
26	Diamètre de l'halo orangeâtre autour des colonies	67
27	Activités enzymatiques des isolats bactériens	70
28	Index d'inhibition des isolats bactériens contre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	71
29	Activité antifongique des isolats bactériens <i>in vitro</i>	72
30	Activité antifongique des isolats bactériens <i>in vivo</i>	73
31	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de plomb	77
32	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de zinc	78
33	Résistance des isolats bactériens à 4000 µg/ml de zinc sur milieu solide	78
34	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de nickel	79
35	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cadmium	80
36	Résistance des isolats bactériens à 2000 µg/ml de cadmium sur milieu solide	80
37	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cuivre	81
38	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cobalt	82
39	Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations du chrome	82
40	L'ordre de résistance aux métaux lourds des isolats bactériens	83
41	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au plomb	85
42	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au zinc	86

43	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au nickel	86
44	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cadmium	87
45	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cuivre	87
46	Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cobalt	88
47	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène <i>czcD</i> par la méthode de Neighbour-joining	89
48	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène <i>nccA</i> par la méthode Neighbour-joining	90
49	Tolérance des isolats bactériens à la salinité	91
50	Résistance de la souche RSSta01 à 20% de NaCl	91
51	Courbes de résistance de l'isolat RSSta01 au NaCl	92
52	Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance aux métaux lourds, la résistance à la salinité et les activités PGPR	94
53	Aspect macroscopique de l'isolat RSRod01	101
54	Aspect microscopique X 100 de l'isolat RSRod01	102
55	Représentation schématique des régions inter génique (ITS) avec les emplacements de liaison des amorces	102
56	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ITS (547 pb) par la méthode de Neighbour-joining	103
57	Croissance de l'isolat RSRod01 sur le milieu N-free	104
58	Activités PGP de l'isolat RSRod01	106

LISTE DES TABLEAUX

N°Tableau	Titre	Page
1	Les légumineuses dans les sites miniers	4
2	Liste de bactéries associées aux plantes, signalées comme favorisant la croissance des plantes en cas de stress dû aux métaux lourds	9
3	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes ARNr 16S, ITS, <i>nodC</i> , <i>nifH</i> , <i>nccA</i> et <i>czcD</i>	34
4	Mélange réactionnel de la PCR	35
5	Température d'hybridation des différents couples d'amorce	35
6	Temps de croissance des bactéries isolées	39
7	Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens	41
8	Caractérisation culturale des isolats bactériens	43
9	Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARNr 16S. Numéros d'accession, % d'identité et identification des séquences nucléotidiques nouvellement déterminées	55
10	Criblage des isolats bactériens à traits PGPR	67
11	Les concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds et NaCl des isolats bactériens	83
12	Les concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds et NaCl de l'isolat RSRod01	105
13	Activités PGP de l'isolat RSRod01	105

RESUME

RESUME

Le but de ce travail est d'identifier et de caractériser les souches isolées à partir des nodules racinaires de quatre plantes de la légumineuse *Trifolium* sp. récoltées de la mine de Djedada Pb-Zn situé à Hammam N'Bail dans la région de Guelma.

Cinquante microorganismes sont isolés, identifiés et criblés *in vitro* pour leur activité PGPR, ainsi que leur capacité à tolérer des concentrations élevées en métaux lourds et en NaCl.

La phylogénie des séquences du gène de l'ARNr 16S révèle une grande diversité des endophytes. Les isolats identifiés appartiennent aux treize genres suivants : *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Roseomonas*, *Paracoccus*, *Frondehabitans*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Providencia*, *Micrococcus* et *Staphylococcus*.

En ce qui concerne les rhizobia, seuls des isolats affiliés au genre *Rhizobium* sont obtenus. La présence du gène de nodulation *nodC* et du gène de fixation d'azote *nifH* montre que les isolats de *Rhizobium* appartiennent au symbiovar trifolii.

En plus des bactéries, une levure est isolée et identifiée comme *Rhodotorula mucilaginosa* par séquençage de la région ITS (Internal Transcribed Spacer).

Les résultats montrent également que dans l'ensemble, les isolats ont la capacité à produire de multiples traits PGPR importants, avec une capacité remarquable à se développer à une concentration de NaCl allant jusqu'à 20% et sont également résistantes à des concentrations élevées en métaux lourds jusqu'à 1300 µg/ml de Pb⁺⁺, 1200 µg/ml de Zn⁺⁺, 1000 µg/ml de Ni⁺⁺, 1000 µg/ml de Cd⁺⁺, 500 µg/ml de Cu⁺⁺, 400 µg/ml de Co⁺⁺ et 50 µg/ml de Cr^{VI+}. L'ordre de résistance des isolats aux métaux lourds est : Pb⁺⁺ > Zn⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Co⁺⁺ > Cr^{VI+}.

L'existence des gènes *czcD* et *nccA* responsables de la résistance au zinc, cadmium, cobalt et nickel respectivement est détectée seulement chez l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01.

Mot clé : Métaux lourds, Rhizobactérie, *Trifolium*, Diversité, Résistance

ABSTRACT

The aim of this work is to identify and characterize strains isolated from nodules root of four plants of the legumes *Trifolium* sp. harvested from the Djedada Pb-Zn mine located in Hammam N'Bail in the region of Guelma.

Fifty microorganisms were isolated, identified and screened *in vitro* for their PGPR activity and their ability to tolerate high concentrations of heavy metals and NaCl.

The phylogeny of the 16S rRNA gene sequences reveals a great diversity of endophytes. The identified isolates belong to the following thirteen genera: *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Roseomonas*, *Paracoccus*, *Frontrahabitan*s, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Providencia*, *Micrococcus* and *Staphylococcus*.

Regarding rhizobial strains, only isolates affiliated to the genus *Rhizobium* were obtained. The presence of the nodulation gene *nodC* and the nitrogen fixation gene *nifH* showed that *Rhizobium* isolates belonged to the symbiovar trifolii.

In addition to the bacteria, a yeast strain was isolated and identified as *Rhodotorula mucilaginosa* by sequencing of the ITS region (Internal Transcribed Spacer).

The results also show that overall, the isolates have the ability to produce multiple important PGPR traits, with a remarkable ability to grow at up to 20% NaCl concentration and are also resistant to high concentrations of heavy metals up to 1300 µg/ml of Pb⁺⁺, 1200 µg/ml of Zn⁺⁺, 1000 µg/ml of Ni⁺⁺, 1000 µg/ml of Cd⁺⁺, 500 µg/ml of Cu⁺⁺, 400 µg/ml of Co⁺⁺ et 50 µg/ml of Cr^{VI+}. The order of resistance of isolates to heavy metals is Pb⁺⁺ > Zn⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Co⁺⁺ > Cr^{VI+}.

The existence of *czcD* and *nccA* genes responsible for resistance to zinc, cadmium, cobalt and nickel respectively is detected only in the *Cupriavidus paucula* isolate RSCup01.

Key word : Heavy metals, Rhizobacteria, *Trifolium*, Diversity, Resistance.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تشخيص وتمييز السلالات المعزولة من العقيدات الجذرية لأربعة نباتات من البقوليات *Trifolium sp.* تم جمعها من منجم جدادا للرصاص والزنك الموجود في حمام نبيل بمنطقة قالمة.

تم عزل خمسين من الكائنات الحية الدقيقة وتشخيصها و غربلتها في المختبر لنشاط PGPR، وكذلك قدرتها على تحمل تركيزات عالية من المعادن الثقيلة و كلوريد الصوديوم.

أظهر تحليل النشوء والتنوع للسلالات المختارة على أساس التسلسل الجيني لل ARNr 16S أنّ هذه السلالات تنتمي إلى الثلاثة عشر أجناس: *Cupriavidus*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Acinetobacter*، *Enterobacter*، *Paracoccus*، *Roseomonas*، *Frondehabitans*، *Microbacterium*، *Kocuria*، *Providencia*، *Staphylococcus* و *Micrococcus*.

أما بالنسبة الريزوبيا، فلم يتم الحصول إلا على العزلات تنتمي إلى *Rhizobium* يظهر وجود جين التكافلي *nodC* و جين تثبيت النيتروجين *nifH* أن عزلات *Rhizobium* تنتمي إلى *symbiovar trifolii*.

بالإضافة إلى البكتيريا، تم عزل سلالة الخميرة وتشخيصها على أنها *Rhodotorula mucilaginosa* عن طريق تسلسل منطقة ITS (فاصل النسخ الداخلي) .

أظهرت النتائج أيضاً أن العزلات بشكل عام لديها القدرة على إنتاج العديد من سمات PGPR المهمة، مع قدرة ملحوظة على النمو بتركيز كلوريد الصوديوم يصل إلى 20٪، كما أنها مقاومة للتركيزات العالية في المعادن الثقيلة إلى 1300 ميكروغرام / مل من Pb^{++} ، 1200 ميكروغرام / مل من Zn^{++} ، 1000 ميكروغرام / مل من Ni^{++} ، 1000 ميكروغرام / مل من Cd^{++} ، 500 ميكروغرام / مل من Cu^{++} ، 400 ميكروغرام / مل من Co^{++} و 50 ميكروغرام / مل من Cr^{VI+} . ترتيب المقاومة للعزلات للمعادن الثقيلة بحسب الترتيب التالي : الرصاص < الزنك < نيكال < الكاديوم < النحاس < الكوبالت < كروم.

تم الكشف عن وجود جينات *nccA* و *czcD* المسؤولة عن مقاومة الزنك والكاديوم والكوبالت والنيكل على التوالي في العزلة *Cupriavidus paucula* RSCup01.

الكلمة الرئيسية : المعادن الثقيلة، البكتيريا الجذرية، *Trifolium*، التنوع، المقاومة.

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction

La contamination des sols par les métaux lourds est un problème environnemental majeur et devient une menace sérieuse pour tous les organismes vivants en raison des activités anthropiques, telles que la production industrielle, les activités agricoles et l'exploitation minière (**Ayangbenro et Babalola 2017**). En effet, les métaux lourds, sont des composés stables, non dégradables et donc hautement persistants, ils peuvent avoir des répercussions négatives sur le comportement des organismes vivants présents sur le site ou dans les zones environnantes (**Pajuelo et al. 2011**).

Les métaux lourds, tels que le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni) et le chrome (Cr), sont des oligo-éléments essentiels pour les organismes vivants, par contre ils pourraient être toxiques à des concentrations élevées (**Rehman et al. 2017**). D'autres, comme le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb), n'ont aucun effet ou fonction bénéfique et sont potentiellement toxiques à des concentrations relativement faibles (**Xiong et al. 2014**).

Les métaux lourds entraînent une réduction de la croissance des plantes, affectent leur morphologie en perturbant les organites cellulaires et le processus physiologique (**Amari et al. 2017**). Les métaux lourds exercent une pression de sélection sur les microorganismes et affectent leur croissance, leur abondance et leur diversité, entraînant une adaptation de certaines espèces, ce qui donne des populations microbiennes moins diversifiées que dans les sols non pollués (**Giller et al. 1998 ; Borymski et al. 2018**).

Pour limiter la pollution métallique, de nombreuses techniques ont été mises en œuvre, notamment des procédés physiques, chimiques et biologiques (**Khalid et al. 2017**). Les méthodes de remédiation chimique et physique sont efficaces pour certains types de contaminants mais elles sont lourdes à mettre en œuvre, coûteuses et altèrent les propriétés du sol (**Azimi et al. 2017**).

La phytoremédiation est considérée comme l'une des techniques les plus prometteuses, rentables et respectueuses de l'environnement par rapport aux méthodes de remédiation physico-chimique utilisées pour la réhabilitation des sites contaminés (**Jacob et al. 2018**). Cette technique utilise les plantes pour stocker ou séquestrer les polluants des sols (**Khalid et al. 2017 ; Jacob et al. 2018**). La toxicité des métaux lourds est considérée comme l'un des principaux facteurs limitant la croissance des plantes (**Amari et al. 2017**). Par conséquent, les plantes utilisées dans la phytoremédiation des métaux lourds doivent être sélectionnées pour

leur capacité à tolérer des contaminants métalliques et avoir une croissance rapide, un système racinaire étendu et une production de biomasse élevée d'où l'intérêt d'utiliser des plantes hyper-accumulatrices pour les technologies de phytoremédiation des métaux lourds (**Ashraf et al. 2019**).

Plusieurs études ont montré que la combinaison de bactéries associées aux plantes accélère le processus de la phytoremédiation dans les sols contaminés, en particulier le groupe des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (**Etesami 2018**). Certaines de ces bactéries ont la capacité de se développer dans un environnement contaminé par des métaux lourds et de favoriser la croissance des plantes par différents mécanismes dont la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, la production d'acide indole-3-acétique (IAA), la synthèse de 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate (ACC) désaminase et les sidérophores. Les PGPR peuvent également agir comme agents de biocontrôle contre les agents pathogènes (**Etesami et Beattie 2017; Etesami 2018**).

Plusieurs bactéries résistantes aux métaux lourds qui améliorent la tolérance au stress métallique chez les plantes ont été rapportées (**Etesami 2018**). Pour surmonter ce stress les rhizobactéries ont développé un certain nombre de mécanismes par lesquels elles sont capables de tolérer des concentrations élevées des métaux lourds tel que : la séquestration intracellulaire et extracellulaire des métaux, la barrière extracellulaire, la pompe d'efflux de métaux et la réduction des ions métalliques (**Ojuederie et Babalola 2017**).

De nombreuses espèces de *Trifolium* sont présentes dans la région méditerranéenne ; il existe 37 espèces de *Trifolium* en Algérie, et les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *T. scabrum*, *T. angustifolium*, *T. campestre*, *T. tomentosum*, *T. lappaceum* et *T. Repens* (**Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004**).

Les plantes du genre *Trifolium* poussent dans différents types de sols et de climats et certaines d'entre elles ont la capacité de se développer dans les sols riches en métaux lourds et devenir une espèce dominante (**Wang et al. 2018**). Des études précédentes ont confirmé l'application potentielle des espèces affiliées au genre *Trifolium* dans la phytoremédiation de plusieurs métaux lourds (**Pereira et al. 2014 ; Liu et al. 2018**).

L'objectif de ce travail est l'isolement, l'identification et la caractérisation des rhizobactéries présentes dans les nodules racinaires de la légumineuse du genre *Trifolium* récoltées de la mine de plomb et zinc situé à Hammam N' Bail dans la région de Guelma.

Une caractérisation phénotypique des rhizobactéries isolées est menée pour évaluer leur capacité à tolérer les métaux lourds et le sel (NaCl), ainsi que leurs capacités favorisant la croissance des plantes.

L'identification et la caractérisation génétique des isolats sont réalisées par l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S, le gène symbiotique *nodC*, le gène *nifH* de fixation d'azote *nifH* et les deux gènes de résistances aux métaux lourds *nccA* et *czcD*.

Ce travail s'articule autour de trois grandes parties :

- *Une première partie* décrivant des généralités sur les légumineuses et les microorganismes dans les sites miniers ainsi que les mécanismes de résistance des bactéries et des plantes aux métaux lourds.
- *Une deuxième partie* décrivant les matériels et méthodes utilisés pour l'isolement, l'identification et la caractérisation des microorganismes symbiotiques des *Trifolium* étudiées.
- *Une troisième partie* subdivisée en cinq titres qui présentent les résultats obtenus et leurs discussions incluant : l'isolement, caractérisation morphologique et culturale des isolats, l'identification et caractérisation moléculaire des isolats, le screening des rhizobactéries à traits PGPR, l'étude de la tolérance des isolats aux stress métallique et salin et le dernier chapitre inclut l'identification et la caractérisation culturale et phénotypique de l'isolat-levure RSRod01.
- Enfin, les conclusions tirées de ce travail et les perspectives de recherches.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Ecosystèmes miniers

1. 1. Généralités sur les légumineuses des sols miniers

Les sols contaminés par de fortes concentrations de métaux lourds supportent souvent une croissance limitée des plantes, ce qui entraîne une rétention d'eau limitée, une érosion périodique et une perte de matière organique et de nutriments (**Wong 2003**). Ce type de conditions difficiles est défavorable aux processus de formation du sol et limite la survie des plantes et des microbes. Certaines légumineuses, dont des espèces des genres *Vicia*, *Robinia*, *Astragalus*, *Lupinus*, *Trifolium*, *Medicago*, etc., sont connues pour pousser sur des sols pollués par des concentrations relativement élevées en métaux lourds (Tableau 1) (**Prasad et Freitas 2003**).

Tableau 1 : Les légumineuses dans les sites miniers (**Sumiahadi et Acar 2018**)

Legumineuses	Métaux lourds
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Cu, Zn, Ni, Pb
<i>Medicago lupulina</i>	Cu, Zn, Ni, Cr
<i>Medicago sativa L.</i>	Cd, Zn, Cu
<i>Crotalaria pumila</i>	Zn, Cd, Pb Cu, Ni, Cd
<i>Cajanus Cajan</i>	As, Cd
<i>Cicer aeritinum</i>	Cd, Pb, Cr, Cu
<i>Lens culinaris</i>	Pb
<i>Pisum sativum</i>	Pb, Cu, Zn, Fe, Cd, Ni, As, Cr
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Zn
<i>Lupinus luteus</i>	Cu, Cd, Pb
<i>Medicago truncatula</i>	Pb, Zn, Cu
<i>Sulla conoraria</i>	Cu, Zn, Pb
<i>Vicia faba</i>	Cu, Zn, Pb
<i>Trifolium pratense</i>	Zn, Pb
<i>Trifolium repens</i>	Fe, Cd, Pb, Zn
<i>Glycine max</i>	As

Les légumineuses ont été signalées comme l'un des premiers colonisateurs de sols dégradés et pollués (Wei et al. 2009). Bien que certaines légumineuses soient tolérantes aux métaux lourds, la plupart de ces plantes entrent dans la catégorie des excluantes de métaux et accumulent de très faibles concentrations de métaux lourds dans les pousses et presque indétectables dans les graines (Wani et al. 2008). L'utilisation d'espèces locales de légumineuses métallifères, qui peuvent tolérer des concentrations plus élevées de métaux lourds, également en association avec des graminées, peut améliorer la phytostabilisation des métaux dans des zones particulières (Frérot et al. 2006).

L'utilisation des légumineuses comme plantes pionnières présente les avantages suivants (de-Bashan et al. 2010) : Premièrement, les légumineuses pionnières améliorent les caractéristiques du sol (immobilisent les contaminants, augmentent la teneur en matières organiques, modifient la population de la rhizosphère), ce qui rend possible la croissance d'autres espèces végétales dans des environnements difficiles ; Deuxièmement, la diversité accrue des microbes, y compris les rhizobactéries et les champignons mycorhizes à arbuscules (AMF), aidera à immobiliser le métal et à améliorer la croissance des plantes et, enfin, à améliorer et à stabiliser l'écologie de l'environnement contaminé. Une caractéristique clé de l'utilité des légumineuses comme ressource pour la phytoremédiation est leur rôle dans l'apport de l'azote supplémentaire au sol, améliorant ainsi sa fertilité et sa capacité à soutenir la croissance.

1. 2. Genre *Trifolium*

1. 2. 1. Description botanique

Le genre *Trifolium* est l'un des genres le plus important des légumineuses, avec environ 300 espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agroécologiques. Toutes les espèces sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces atteignant généralement 30 cm de haut. Les feuilles sont à trois folioles (parfois quatre), et sont à l'origine du nom de la plante, ces folioles généralement dentées ; les stipules sont bien visibles. L'inflorescence comporte de nombreuses fleurs de taille petite à moyenne, en têtes sessiles ou pédonculées ou en racèmes courts, rarement solitaires, avec ou sans bractées, les fruits sont des petites gousses à l'intérieur du calice, contenant une à quatre graines (Ellison et al. 2006).

1. 2. 2. Origine et répartition

Le genre *Trifolium* est très répandu dans le monde et se trouve particulièrement dans les régions tempérées, les régions subtropicales et les habitats humides. Les principaux centres se trouvent en Eurasie (150-160 espèces), en Amérique du Nord (60-65 espèces) et en Afrique (25-30 espèces) (Zohary et Heller 1984).

Le bassin méditerranéen, le centre et le sud de l'Europe et la région allant de l'Asie mineure à la Chine sont les trois régions géographiques qui présentent la plus grande diversité en espèces du genre *Trifolium* (Zohary et Heller 1984).

En Algérie, le trèfle est largement répandu avec 37 espèces et les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *T. scabrum*, *T. angustifolium*, *T. campestre*, *T. tomentosum*, *T. lappaceum* et *T. repens* (Figure 1) (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004).



T. scabrum



T. angustifolium



T. campestre



T. tomentosum



T. lappaceum



T. repens

Figure 1. Les espèces de *Trifolium* les plus fréquemment rencontrées en Algérie (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004)

1. 2. 3. Intérêts

Les espèces du genre *Trifolium* ou trèfles sont largement cultivées, elles poussent librement dans une grande variété de types de sols et de climats et améliorent les sols grâce à leur capacité à fixer l'azote libre. Les trèfles constituent une bonne plante de pâturage dans les prairies, peuvent être utilisés comme plantes fourragères, engrais verts, et également comme plantes hyper-accumulatrices en phytoremediation (**Wang et al. 2018 ; Zohary 1970 ; Acikgoz 2001 ; Keskin 2001 ; Elci 2005**).

1. 3. Microorganismes dans les sites miniers

La diversité microbienne des sites miniers diffère selon les régions en raison de la nature du processus d'extraction des métaux. Elle varie des Eubactéries, Archaea jusqu'au phylum dominant qui est proteobacteria (**García-Moyano et al. 2012**).

De nombreuses études montrent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal ; c'est pourquoi les bactéries sont considérées comme d'excellents bioindicateurs de la qualité du sol (**Giller et al. 1998**). Les métaux lourds ont également un impact négatif sur la diversité de la communauté bactérienne et exerce une pression de sélection sur les microorganismes entraînant la mort des espèces sensibles et l'adaptation des bactéries résistantes (**Giller et al. 1998 ; Borymski et al. 2018**). **Mertens et al. (2006)** ont démontré que les microorganismes isolés à partir de sols pollués sont plus tolérants à une forte contamination par les métaux lourds que ceux des sols non pollués. Le transfert horizontal de plasmides contenant des gènes de résistance peut grandement contribuer au processus d'adaptation.

Il a été démontré que la biomasse microbienne et les activités enzymatiques sont sensibles à la contamination par les métaux lourds (**Kandeler et al. 2000**). Les concentrations et les biodisponibilités des métaux lourds, et donc leur toxicité pour la microflore de la rhizosphère, peuvent être modifiées dans la rhizosphère. Les racines peuvent absorber les métaux lourds dans une certaine mesure. En outre, les exsudats racinaires peuvent soit complexer les métaux, les rendant indisponibles pour les microbes, soit favoriser la libération des métaux, par exemple en modifiant le pH.

La rhizosphère est dominée par des bâtonnets Gram-négatifs telles que les rhizobactéries qui forment une association symbiotique avec les légumineuses et contribuent à la fixation de l'azote atmosphérique. Les rhizobactéries libres et les rhizobactéries

symbiotiques favorisant la croissance des plantes (PGPR) peuvent améliorer la végétation des sites miniers et promouvoir la croissance des plantes par des mécanismes spécifiques et non spécifiques. Dans les mécanismes spécifiques, les souches PGPR favorisent la croissance des plantes en facilitant la disponibilité des nutriments du sol, en stimulant la croissance des racines, la division cellulaire ainsi que l'élongation et la stabilisation métabolique. Cependant, dans les mécanismes non spécifiques, les souches PGPR améliorent la croissance des plantes en supprimant la toxicité induite par les métaux lourds et les agents pathogènes des plantes et en améliorant l'induction de la résistance systémique (Figure 2) (Etesami 2018 ; Etesami et Maheshwari 2018).

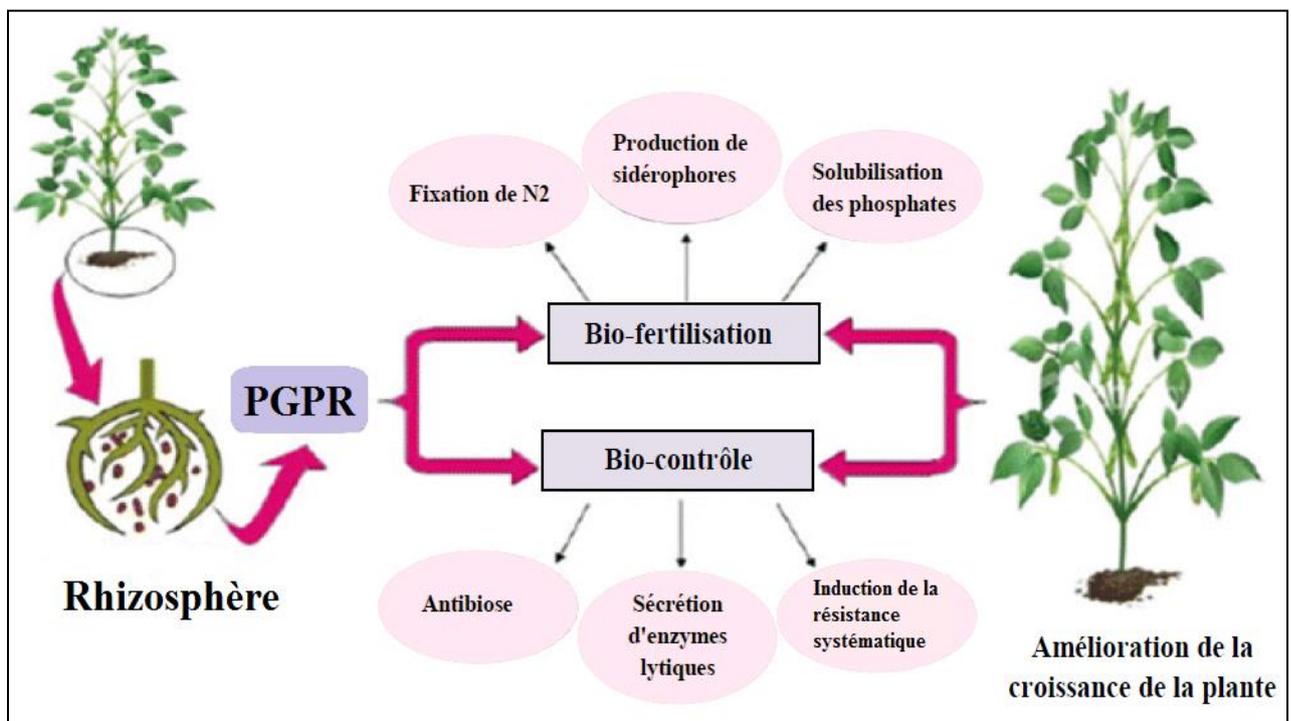


Figure 2. Mécanismes d'action des PGPR (Kumar et al. 2011)

De plus, les PGPR ont montré une diminution de la toxicité des métaux lourds en favorisant la croissance des plantes lorsqu'elles sont utilisées comme inoculants (Tableau 2) (Rajkumar et al. 2010 ; Etesami 2018).

Tableau 2 : Liste de bactéries associées aux plantes, signalées comme favorisant la croissance des plantes en cas de stress dû aux métaux lourds (Tiwari et Lata 2018).

Plantes	PGPR	Métaux lourds	Mécanismes
<i>Alyssum bertolonii</i>	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Microbacterium</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp	Ni	Siderophores
<i>Brassica juncea</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Cr	Fixation d'azote
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cr	Siderophores, IAA
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Cu	Solubilisation du P, IAA
<i>Brassica napus</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.	Cd, Ni, Cu	Siderophores, IAA
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cu	ACC deaminase, solubilisation du P, siderophores, IAA
<i>Brassica oxyrrhina</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Ni	ACC deaminase, solubilisation du P, siderophores, IAA
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Ni	Siderophores
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Cu, Zn, Ni	Solubilisation du P, IAA
<i>Oryza sativa</i>	<i>Methylobacterium oryzae</i>	Ni, Cd	ACC deaminase
<i>Pisum sativum</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Cd	ACC deaminase
<i>Ricinus communis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Ni, Zn, Cu	ACC deaminase, siderophores, IAA
<i>Salix caprea</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Cd, Zn, Pb	Siderophores, IAA
<i>Solanum nigrum</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Cd	Siderophores, IAA, ACC deaminase
<i>Sorghum vulgare</i> var. <i>sudanense</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Cd	Siderophores, IAA, ACC deaminase
<i>Thlaspi goesingense</i>	<i>Methylobacterium</i> spp.	Ni	Siderophores, IAA
<i>Trifolium repens</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Fe, Mn, Zn, Cd	IAA
<i>Trifolium pratense</i>	<i>Brevibacillus</i> spp.	Pb	IAA
<i>Vigna radiata</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Cd, Pb	Siderophores
<i>Vinca rosea</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Ni	IAA
<i>Zea mays</i>	<i>Burkholderia</i> spp. <i>Leifsonia</i> spp. <i>Bacillus</i> spp	Cd, Pb	IAA, siderophores, ACC deaminase
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Cd	Augmentation des nutriments minéraux (Fe)

1. 4. Classification et minéralogie des mines de Plomb-Zinc

La classification des gisements de Pb-Zn a toujours été très contestée et divers minéralogistes ont suggéré une variété de principes de classification basés sur les informations disponibles (**Changqing et al. 2015 ; Mudd et al. 2017**). **Mudd et al. (2017)** ont signalé différents types de gisements de Pb- Zn en fonction de leur origine, qui sont décrits comme suit :

1. 4. 1. Gisement dans les sédiments

Les sources de Pb-Zn les plus importantes et les plus riches au monde sont des gisements hébergés dans des sédiments où les éléments primaires sont le Pb et le Zn (**Deb et Sarkar 2017**). Ces gisements peuvent être classés en deux types : (i) les gisements sédimentaires exhalatifs, qui se forment suite à une activité hydrothermale, et qui sont identifiés par leurs importantes couches internes de sulfure de plomb-zinc-fer (**Robb 2005**). (ii) Le gisement de type vallée du Mississippi, qui se forme à cause de fluides basaux à basse température et à haute salinité pendant les processus sédimentaires.

1. 4. 2. Gisement de sulfure massif volcanogène

Les gisements de sulfures massifs volcanogènes ou de sulfures massifs dans des roches volcaniques sont également des gisements hydrothermaux qui se forment lorsque le métal du plancher océanique environnant est lessivé dans les roches volcaniques (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 3. Gisement de skarn (roche calcaro-silicatée)

Les gisements de skarn sont associés à des gisements filoniens et ces gisements se forment à proximité ou à l'intérieur de plutons magmatiques suite à l'interaction entre des fluides magmato-hydrothermaux. Les dépôts de skarn sont massifs et se composent principalement de sulfures de Pb-Zn (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 4. Gisement de porphyre

Les gisements de porphyre sont des gisements de minéraux de faible à moyenne teneur, de tonnage important, qui proviennent d'intrusions magmatiques. Les gisements porphyriques typiques sont reconnus pour contenir du Cu, du Cu-Au et du Cu-Mo.

Néanmoins, certains gisements de type porphyre peuvent également contenir des quantités importantes de Pb et de Zn (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 5. Gisements épithermaux

Les gisements épithermaux sont formés par des systèmes circulatoires hydrothermaux subaériens associés à des sources de chaleur magmatiques, à faible profondeur, sous faible température et pression. Les gisements épithermaux à sulfuration faible à intermédiaire sont le plus souvent associés à des minéralisations de Pb-Zn (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 6. Gisements de type Manto

Les gisements de type manto sont des gisements filoniens. Ils se sont formés plus loin des plutons magmatiques, ce qui indique que le magmatisme joue un rôle crucial dans la circulation des fluides pour la formation de la minéralisation disséminée liée aux strates. Il s'agit principalement de gisements de sulfures massifs de Pb-Zn (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 7. Gisements aurifères orogéniques et mésothermiques filoniens

Les gisements aurifères et mésothermiques orogéniques se sont formés à faible salinité et sont reconnus pour des quantités importantes de minéralisation d'Au. Dans ce cas, l'or est généralement associé à des métaux de base, de sorte que Pb et Zn sont produits comme sous-produits de ces gisements (**Mudd et al. 2017**).

1. 4. 8. Gisements d'oxyde de fer, de cuivre et d'or

Les gisements accueillent une minéralisation magmato-hydrothermale, où l'Au et le Cu ont une importance économique. Ce gisement comprend principalement du Fe, du Cu ainsi que de l'Ag, de l'U, des ETR, du Bi, du Co, du Nb et du P, etc. Comme l'abondance économique du Pb et du Zn est moindre dans les gisements, ces types de gisements sont moins importants par rapport aux autres gisements (**Mudd et al. 2017**).

1. 5. Gites en Algérie

Une mine est un gisement exploité de matériaux (or, charbon, cuivre, diamants, fer, uranium, etc.). Elle peut être à ciel ouvert ou souterraine. Selon les estimations du programme des nations unies pour l'environnement (PNUE) en 2001, 50 districts miniers et 3 500 occurrences minéralisées rien qu'en Algérie (Figure 3) (**Direction générale des mines Algérie 2015**).

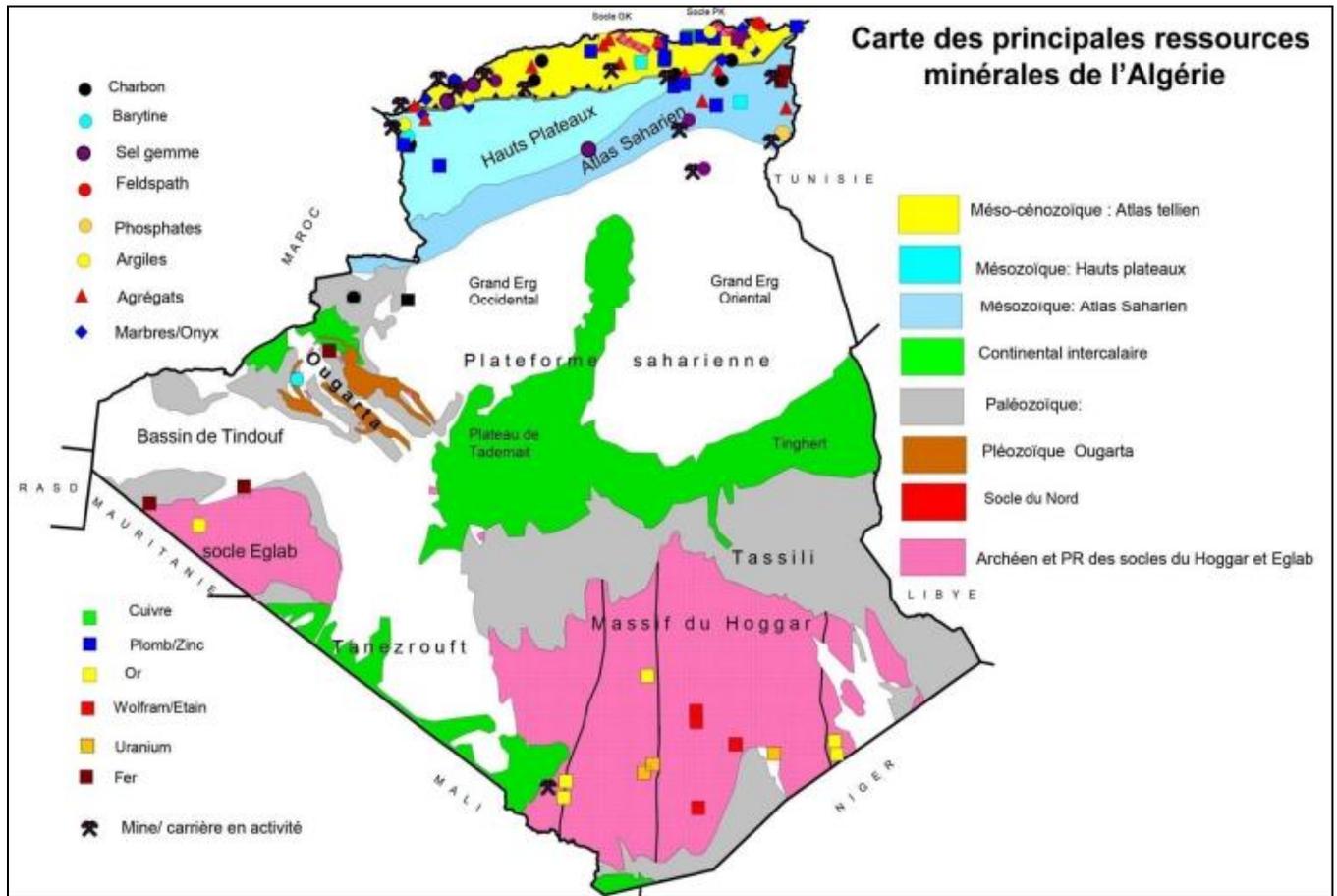


Figure 3. Carte des principaux gîtes et gisements en Algérie (**Direction générale des mines Algérie 2015**)

1. 5. 1. Différents types de minéraux

L'Algérie est un pays vaste qui possède un potentiel géologique intéressant, en substances métalliques et non métalliques, l'analyse métallogénique des différents environnements géologiques montre que la majorité des minéralisations rencontrées en Algérie sont les suivants (**Direction générale des mines Algérie 2015**) :

- ✓ Métaux précieux : or, argent
- ✓ Pierre précieuse et semi précieuse : diamant, topaze, béryl
- ✓ Métaux de base : plomb, zinc, cuivre
- ✓ Métaux ferreux et non ferreux : fer, manganèse
- ✓ Eléments du groupe de platine : platine, palladium, iridium
- ✓ Métaux rare : tantale, niobium, béryllium

- ✓ Terres rares
- ✓ Minéraux industriels : phosphate, baryte, bentonite, diatomite

1. 5. 2. Ressources géologiques

➤ **Chaîne tellienne**

Situé dans le nord de l'Algérie et possède plus de 30 districts minéralisés connus pour leurs richesses en : Pb-Zn, Cu, Au, Fe, Hg, Sb, phosphate, barytine, bentonite. Parmi les différents gîtes, gisements découverts : O. El Kebir (Pb-Zn-Cu), Boussoufa (Cu), O. Amizour (Zn-Pb), Fendek (Hg), Beni Mansour (SrSO₄), Koudiat Safia (BaSO₄), **Hammam N'bails** (Pb-Zn-Sb) (**Direction générale des mines Algérie 2015**).

➤ **Massif Egalab et Ougarta**

Situé dans le sud-ouest et possède plus de 10 districts minéralisés connus pour leurs richesses en : diamant, Au, Cu, Mo, Charbon, Fer, Barytine, Sables. Parmi les différents gîtes, gisements découverts : Gara Djebilet (Fe), Mechri Abdelaziz (Fe), Guettara (Mn), Draïssa (Barytine) (**Direction générale des mines Algérie 2015**).

➤ **Massif Hoggar**

Situé dans le sud de l'Algérie et possède plus de 20 districts miniers connus pour leurs richesses en : Or, Wolfram, Tantale, Uranium. Parmi les gîtes, gisements découverts : Tirek et Amessmessa (Au), Tiririne - Hanane (Au), Nahda et Bachir (W), Tin Amzi -El Karoussa (Sn-W) Timgaouine-Abankor (U), Ebelekan (Ta-Nb) (**Direction générale des mines Algérie 2015**).

2. Métaux lourds

2. 1. Définition des métaux lourds

Les métaux lourds sont définis comme étant des éléments métalliques naturels et sont considérés comme des polluants universels avec des densités supérieures à 5 g/cm³ (**Sarma 2011 ; Saif et Khan 2017**). Les métaux lourds sont classés en deux grands groupes en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques :

- **Les métaux essentiels** : comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le nickel et le manganèse (Mn), ces des micronutriments sont essentiels pour l'organisme, mais deviennent toxiques lorsqu'ils sont pris en quantités excessives (**Ali et al. 2019**).
- **Les métaux non essentiels** : comme le cadmium (Cd), le mercure (Hg), l'aluminium (Al) et le plomb (Pb), ils ne sont pas impliqués dans des fonctions vitales et sont hautement toxiques pour les organismes vivants même à faible dose (**Ali et al. 2019**).

2. 2. Origines des métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments naturels qu'on trouve dans le sol, l'air ou l'eau, suite à des processus naturels mais aussi des activités humaines qui les utilisent pour leurs propriétés particulières ou les rejettent indirectement dans l'environnement.

2. 2. 1. Origines naturelles

Les métaux lourds se trouvent naturellement dans les sols résultant de l'altération de la roche-mère sous-jacente. Dans les roches, les métaux lourds se présentent sous différentes formes chimiques sous forme de minerais à partir desquels ces métaux sont récupérés sous forme de minéraux (**Fuge et al. 1991**). La concentration naturelle de ces métaux varie alors selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (**Zhang et al. 2009**).

2. 2. 2. Origines anthropiques

Les métaux lourds provenant de sources anthropiques ont généralement une biodisponibilité élevée en raison de leurs formes réactives solubles et mobiles. Ces sources anthropiques sont en premier lieu liées aux activités de transformation primaire des métaux, c'est-à-dire l'exploitation minière, qui conduit à la contamination du sol pendant plusieurs années. Les métaux lourds sont également libérés dans l'atmosphère sous forme de poussières et d'aérosols issus des activités industrielles et urbaines comme les gaz d'échappement des

véhicules, l'incinération des déchets, la fabrication d'explosifs. Ces apports se déposent ensuite par précipitations sur les plantes qui peuvent les absorber (**Niazi et al. 2011, 2015 ; Shahid et al. 2015**).

2. 3. Paramètres influençant la mobilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa forme chimique ainsi que des facteurs environnementaux. Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre. Les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la composition du sol peuvent modifier la transformation, le transport, l'état de valence des métaux lourds et leur biodisponibilité.

2. 3. 1. pH

La majorité des éléments métalliques sont plus mobiles en conditions acides qu'en conditions alcalines. En effet, l'abaissement du pH favorise la mobilité des éléments métalliques notamment par la mise en solution des sels métalliques alors que, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation des éléments métalliques par la formation de composés insolubles (**Bandowe et al. 2014**).

2. 3. 2. Température

La température joue un rôle important dans l'adsorption des métaux lourds. L'augmentation de la température accroît le taux de diffusion de l'adsorbat à travers la couche limite externe. La solubilité des métaux lourds augmente avec l'augmentation de la température, ce qui améliore la biodisponibilité des métaux lourds (**Bandowe et al. 2014**).

2. 3. 3. Matière organique

La matière organique adsorbe les éléments métalliques qui ont pour elle une grande affinité et les séquestrent sous forme de complexes stables faiblement mobiles mais il s'agit d'une immobilisation temporaire puisque la minéralisation peut les remettre en solution (**Huynh 2009**).

2. 4. Dépollution des sols pollués par phytoremédiation

La phytoremédiation fait référence à l'utilisation *in situ* de plantes et de leurs microorganismes associés pour dégrader, contenir ou rendre inoffensifs les contaminants présents dans l'environnement (Ayotamuno et al. 2006). Elle peut être utilisée pour l'élimination de divers polluants organiques (hydrocarbures aromatiques polynucléaires, biphényles polychlorés et pesticides) ainsi qu'inorganiques (métaux lourds) (Rezania et al. 2015). Néanmoins, le niveau de contamination du sol, la quantité de contaminants métalliques dans le sol, ainsi que la capacité des plantes à absorber les métaux du sol, déterminent le succès de la phytoremédiation sur tout site pollué (Tak et al. 2013). De nombreuses espèces végétales ont la capacité d'accumuler divers métaux lourds toxiques dans leurs parties végétatives et reproductives. Les plantes vertes peuvent moduler la disponibilité des métaux lourds sans affecter la couche supérieure du sol, stabilisant ainsi la fertilité du sol (Olowu et al. 2015 ; Ali et al. 2013). Par rapport aux autres techniques traditionnelles, la phytoremédiation est une option valable car elle est économiquement réalisable et respectueuse de l'environnement et améliore la fertilité du sol en libérant diverses matières organiques. En général, les plantes ont une énorme capacité à absorber les métaux lourds de l'environnement par divers mécanismes tels que la phytoextraction, la phytovolatilisation, la phytostabilisation, la phytovolatilisation, la phytodégradation et la rhizodégradation (Figure 4) (Rezania et al. 2016 ; Ramanjaneyulu et al. 2017).

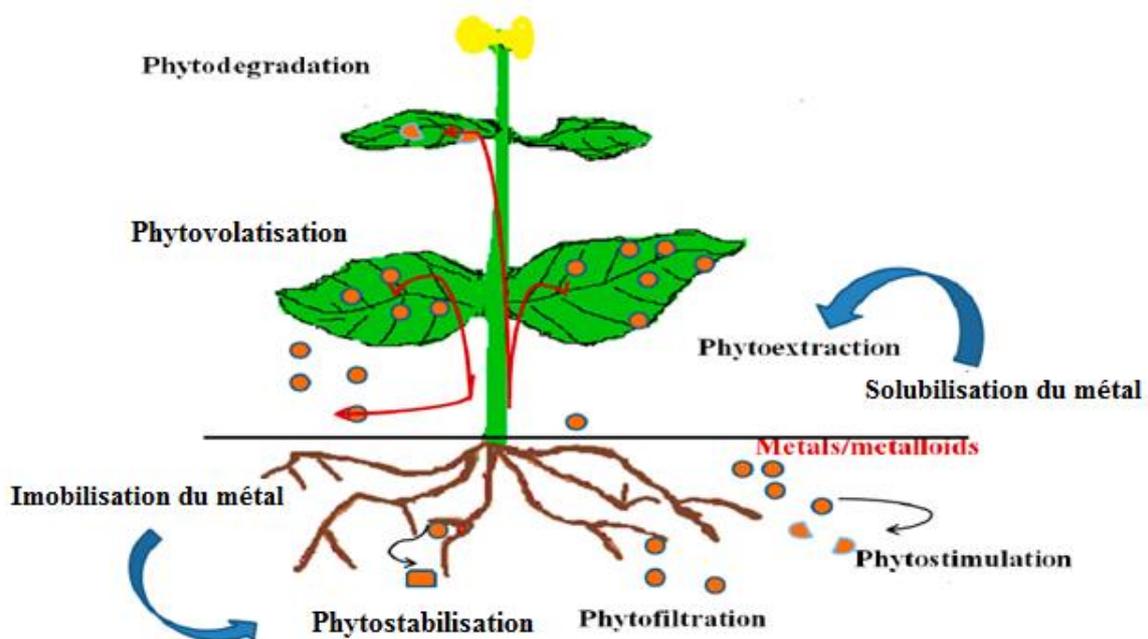


Figure 4. Mécanismes utilisés pour la phytoremédiation des métaux lourds (Ojuederie et Babalola 2017)

3. Résistance aux métaux lourds

3. 1. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds

Certains ions métalliques jouent un rôle important chez les micro-organismes car ils participent à divers processus métaboliques en tant que composants de diverses enzymes (**Yin et al. 2015**). L'absorption excessive de ces ions métalliques entraîne des risques sérieux pour les microorganismes, tels que l'endommagement des membranes cellulaires, l'inhibition de l'activité enzymatique, l'endommagement de l'ADN et la perturbation des fonctions cellulaires.

Cependant, les bactéries isolées des environnements pollués sont capables de tolérer une forte concentration de métaux que celles isolées des zones non polluées (**Ma et al. 2009**). Une telle adaptation peut être obtenue en développant divers mécanismes de résistance, tel que ; 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 (Figure 5).

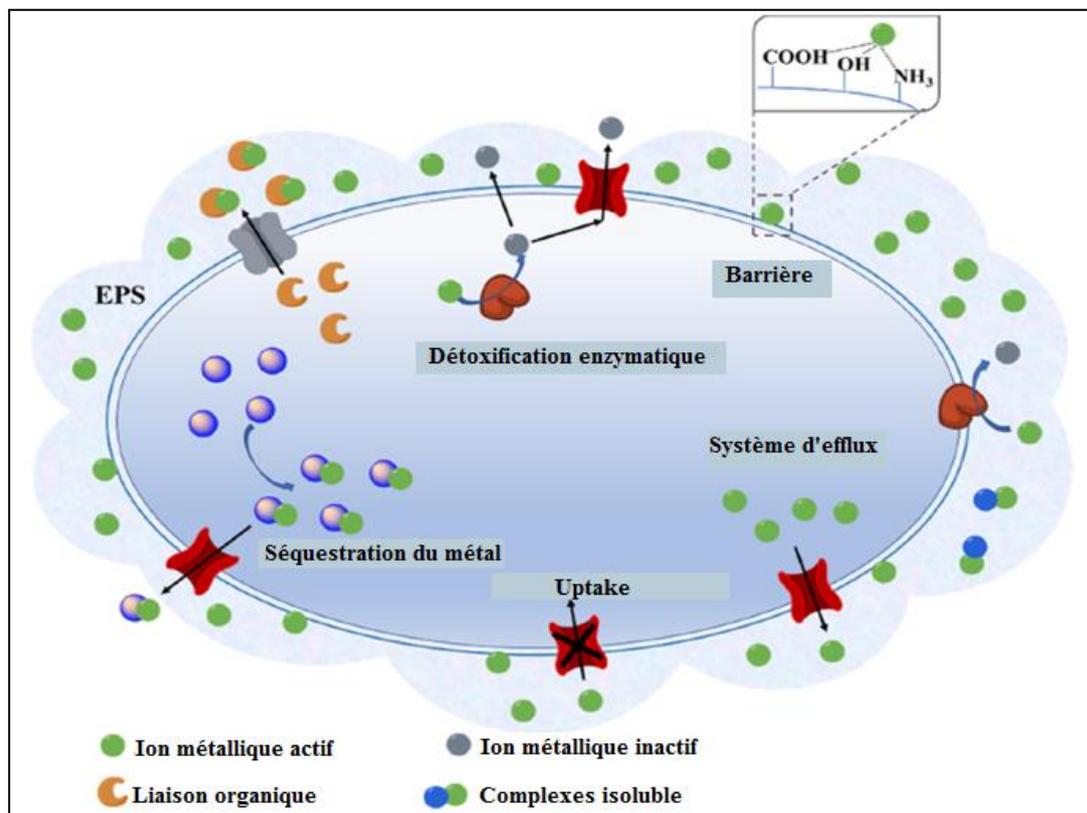


Figure 5. Voies de détoxification proposées pour les micro-organismes vis-à-vis des ions de métaux lourds (**Yin et al. 2019**)

3. 1. 1. Bioaccumulation

La bioaccumulation consiste en l'adsorption ou la fixation des métaux lourds. Les métaux sont absorbés par des matières biologiques inactives ou mortes ou par des matières dérivées de sources biologiques. Cette absorption se produit généralement dans la paroi cellulaire grâce à un certain nombre de processus indépendants du métabolisme (**Vijayaraghavan et Yun 2008**). Ce mode est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake » (**Malik 2004**).

Elle consiste aussi en l'absorption et la séquestration des métaux lourds à l'intérieur des cellules bactériennes. Les métaux lourds sont absorbés par les cellules vivantes et peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule et s'accumuler de manière intracellulaire, à travers la membrane cellulaire et le cycle métabolique de la cellule (**Vijayaraghavan et Yun 2008**). Ce mode d'assimilation est connu sous le terme d'absorption ou assimilation ou « active uptake » (**Malik 2004**).

3. 1. 2. Système d'efflux

Les systèmes d'efflux sont observés chez différents microorganismes, en particulier ceux isolés des environnements pollués par des métaux, il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. En général, l'expression des transporteurs d'ions métalliques dans les systèmes d'efflux dépend de l'espèce bactérienne et des ions de métaux lourds, et est régulée par des gènes de résistance spéciaux sur le chromosome ou le plasmide. Ces gènes codent pour des transporteurs membranaires qui contrôlent l'absorption et l'exclusion des ions de métaux lourds. (**Habi et Daba 2009**).

3. 1. 3. Conversion enzymatique

La biotransformation des ions de métaux lourds d'une forme hautement toxique à une forme moins nocive par des enzymes contribue beaucoup à la résistance des microorganismes aux ions de métaux lourds (**Liu et al. 2017**). Le changement d'état redox des ions de métaux lourds par des réactions de réduction ou d'oxydation peut diminuer efficacement leur toxicité (**Giovanella et al. 2016**). Cette voie de défense peut être régulée par des enzymes de détoxification, qui sont également contrôlées par des gènes de résistance spécifiques des microorganismes.

3. 1. 4. Résistance par imperméabilité

La membrane plasmique microbienne, la paroi cellulaire ou la capsule peuvent empêcher les ions métalliques de pénétrer dans la cellule bactérienne et protègent leurs composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux (**Wheaton et al. 2015**). Les bactéries peuvent adsorber les ions métalliques par les groupes ionisables de la paroi cellulaire (groupes amino, carboxyle, phosphate et hydroxyle) (**El-Helow et al. 2000 ; Taniguchi et al. 2000**). **Pardo et al. (2003) et Taniguchi et al. (2000)** ont observé un niveau élevé de biosorption passive d'ions de métaux lourds pour les cellules non viables de *Pseudomonas putida*, *Brevibacterium sp.* et *Bacillus sp.*

3. 1. 5. Résistance par séquestration

3. 1. 5. 1. Séquestration extracellulaire

La séquestration extracellulaire est un mécanisme connu chez les bactéries pour résister aux métaux lourds. Les bactéries produisent des métabolites qui entraînent la précipitation des métaux (**Rajkumar et al. 2010**). Ces composés lient efficacement les métaux lourds et détoxifient ensuite les métaux simplement par la formation de complexes ou en formant une barrière efficace autour de la cellule (**Pulsawat et al. 2003**) tel que : les substances polymères extracellulaires, les sidérophores et le glutathion. Les EPS, constitués d'acides nucléiques, de lipides, de protéines et d'hydrates de carbone complexes, possèdent d'abondants sites de fixation des métaux tels que le plomb, le cuivre, le zinc, le chrome et l'argent, qui peuvent influencer la distribution des métaux lourds dans les microorganismes (**Teitzel et Parsek 2003 ; Deschatre et al. 2013 ; Yue et al. 2015**). Les sidérophores ont la capacité d'accumuler le fer ferrique et de former des complexes de fer, ce qui aide les microorganismes à survivre dans des conditions de carence en fer. Outre le fer ferrique, les sidérophores peuvent également fixer d'autres types de métaux lourds, notamment le cuivre, le zinc et le nickel, ce qui protège les micro-organismes de la toxicité des métaux lourds (**Patel et al. 2018 ; Sharma et al. 2018**). Le glutathion sécrété par les micro-organismes a également une grande capacité à lier les ions de métaux lourds. Les ions de métaux lourds peuvent être adsorbés par le glutathion pour former un complexe et ne peuvent pas pénétrer dans les cellules vivantes.

3. 1. 5. 2. Séquestration intracellulaire

Lorsque les ions de métaux lourds traversent la paroi cellulaire et pénètrent dans les micro-organismes, des pièges intracellulaires situés dans le cytoplasme peuvent séquestrer ces ions de métaux lourds et les empêcher d'atteindre un niveau toxique et les composants cellulaires sensibles peuvent donc être protégés de l'exposition aux ions de métaux lourds. De nombreux micro-organismes peuvent transformer les ions de métaux lourds à l'aide de sulfures, de polyphosphates cytosoliques et des protéines riches en cystéine (**Kulakovskaya et al. 2018 ; Li et al. 2018**). D'une part, les ions de métaux lourds actifs peuvent être transformés pour former des précipités métalliques insolubles. D'autre part, les ions de métaux lourds peuvent être accumulés par des protéines riches en cystéine comme les métallothionéines. Lorsqu'elles sont exposées aux ions de métaux lourds, les métallothionéines peuvent être surexprimées pour surmonter ce stress. Les résidus de cystéine dans la métallothionéine peuvent agir comme un puits pour les ions de métaux lourds toxiques en excès.

3. 2. Mécanisme de résistance des plantes aux métaux lourds

Les plantes résistantes poussant sur des sols contaminés par des métaux ont développé des mécanismes physiologiques pour empêcher l'entrée des métaux dans les cellules des racines et pour faire face aux effets de concentrations internes élevées de métaux. Ces stratégies d'adaptation permettent l'établissement de communautés végétales dans des sols contaminés par des métaux (**Cuyppers et al. 2013 ; Mehes-Smith et al. 2013**).

La stratégie des plantes tolérantes consiste à détoxifier les ions métalliques qui sont pénétré dans leur cellule en traversant la membrane plasmique ou les biomembranes des organites internes et peuvent être classées en trois catégories :

➤ Les excluantes

Les excluantes maintiennent un faible niveau de métaux dans leurs tissus aériens lorsqu'elles poussent sur des sols contaminés par des métaux. Les métaux pénètrent dans les cellules des racines mais ils empêchent leur déplacement des racines vers les tissus aériens.

➤ Les indicateurs

Les indicateurs accumulent les métaux dans leurs tissus aériens, mais les niveaux trouvés dans ces tissus aériens sont le reflet de la concentration de métaux dans le sol

➤ **Les accumulateurs/hyperaccumulateurs**

Les métaux qui pénètrent dans les racines sont transférés et accumulés dans leurs tissus superficiels. Les niveaux de métaux trouvés dans leurs tissus récoltables sont plus élevés que les niveaux trouvés dans le sol (**Cuypers et al. 2013 ; Mehes-Smith et al. 2013**).

En plus de ces stratégies, il existe trois principaux mécanismes utilisés par les plantes pour faire face à la contamination métallique. Il s'agit de la restriction de l'absorption et du transport des métaux, de la complexation des métaux à l'interface paroi cellulaire - membrane plasmique, et de la complexation et du compartimentage des métaux à l'intérieur des cellules (**Das et Jayalekshmy 2015**).

3. 2. 1. Restriction de l'absorption et du transport des métaux

En général, les plantes limitent l'entrée des métaux biodisponibles en excès en les précipitant ou en les complexant dans l'environnement racinaire. Les méthodes de précipitation peuvent inclure l'augmentation du pH de la rhizosphère ou l'excrétion d'anions (par exemple, le phosphate) et d'acides organiques (par exemple, le malate, le citrate, l'oxalate) qui les rendent indisponibles pour l'absorption (**Cuypers et al. 2013 ; Mehes-Smith et al. 2013**).

3. 2. 2. Complexation des métaux à l'interface paroi cellulaire - membrane

La première structure végétale à entrer en contact avec les métaux présents dans le sol est la membrane plasmique des cellules racinaires. Sa fonction est d'agir comme une barrière pour limiter l'entrée des métaux dans le cytoplasme (**Das et Jayalekshmy 2015**). Des quantités élevées d'ions métalliques peuvent également être trouvées à l'interface paroi-membrane plasmique. Cela peut être réalisé en modifiant la capacité de liaison des ions de la paroi cellulaire (**Das et Jayalekshmy 2015**).

3. 2. 3. Complexation et compartimentation des métaux avec les cellules

Des études ont montré que les plantes disposent d'une série de mécanismes au niveau cellulaire qui sont impliqués dans l'absorption des métaux (**Hall 2002 ; Emamverdian et al. 2015**). Ces mécanismes consistent à éliminer les métaux du cytosol et/ou à séquestrer les ions dans une vacuole. Une fois dans la vacuole, les effets toxiques des métaux sur les organites sensibles sont réduits (**Tong et al. 2004 ; Yadav 2010**). L'absorption des métaux dans la vacuole peut être réalisée par des pompes vacuolaires. Les ions métalliques entrent dans les

cellules en entrant en compétition avec des ions essentiels de rayons ioniques similaires et avec l'aide de protéines [phytochélatines (PC) et métallothionéines (MT)] et de transporteurs **(Hall 2002 ; Emamverdian et al. 2015)**. Les PC et MT sont des peptides chélateurs de métaux riches en cystéine capables de se lier à divers métaux, dont le cadmium (Cd), le cuivre, le zinc (Zn) et l'arsenic (As). (As) **(Hall 2002 ; Emamverdian et al. 2015)**. La chélation des métaux peut les restreindre dans la cellule ou permettre leur séquestration et leur compartimentation.

MATERIEL

ET

METHODES

1. Présentation de la région d'étude

1. 1. Site d'échantillonnage des plantes de *Trifolium* sp.

Le gîte de Koudiat Djeddada de Hammam N'Bail ($36^{\circ} 22' 48''$,4 N $7^{\circ} 42' 33''$,2 E) est situé au Nord Est de l'Algérie et se trouve à 30 Km de la ville de Guelma (Figure 7).

Le gisement minier est une ancienne exploitation où la minéralisation des oxydes de zinc est encaissée dans les dolomies du Trias. Il a été découvert en 1878 et exploité de 1900 à 1939 (Merdas 2006). D'après les données existantes, la quantité de minerai extrait est inconnue, il n'y a pratiquement pas d'informations sur les corps minéralisés et leurs caractéristiques ; les teneurs de Zn varient de 0.6 à 11.3% et 0.05 à 0.4% de Pb (Merdas 2006).

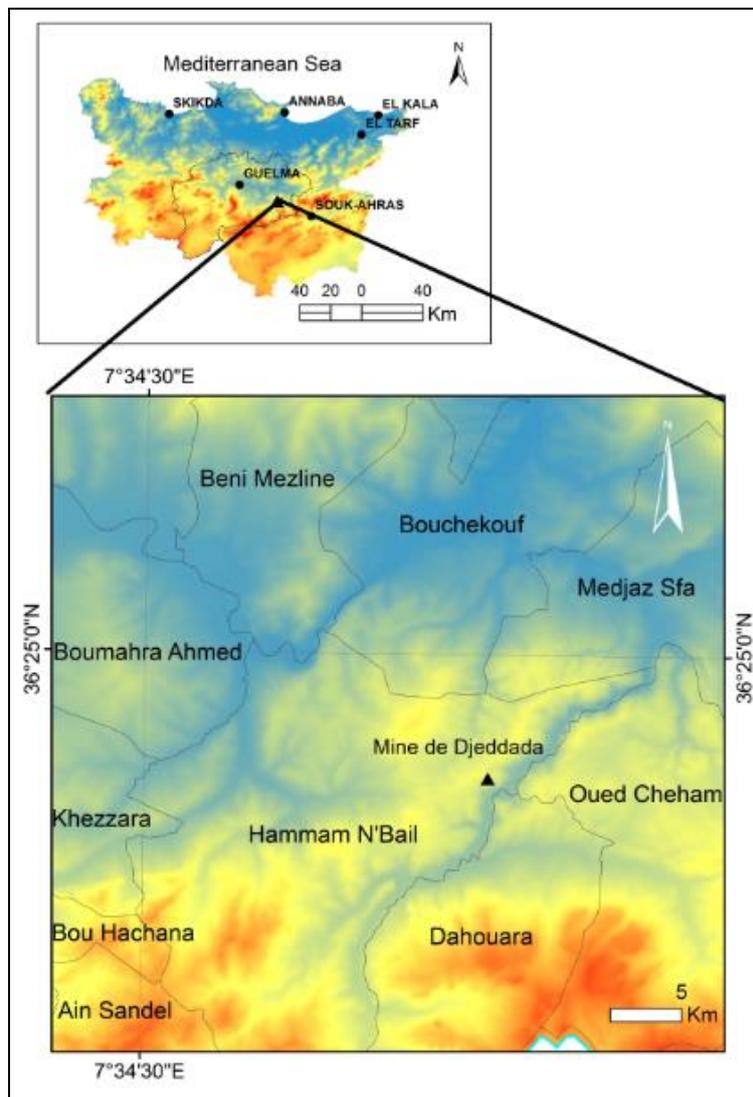


Figure 6. Localisation géographique de la région de Hammam N'Bail

1. 2. Collecte des plantes

La collecte des plantes de *Trifolium* sp. (Figure 7) est réalisée durant une période bien précise, où la plante est en plein activité. La récolte est effectuée en période de printemps au mois de mai 2016.

La collecte est réalisée selon la méthode de **Vincent (1970)**, en creusant 15 cm au tour de la plante et 20 cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire, les plantes sont ensuite placées dans des sacs en plastique et transportées immédiatement au laboratoire.

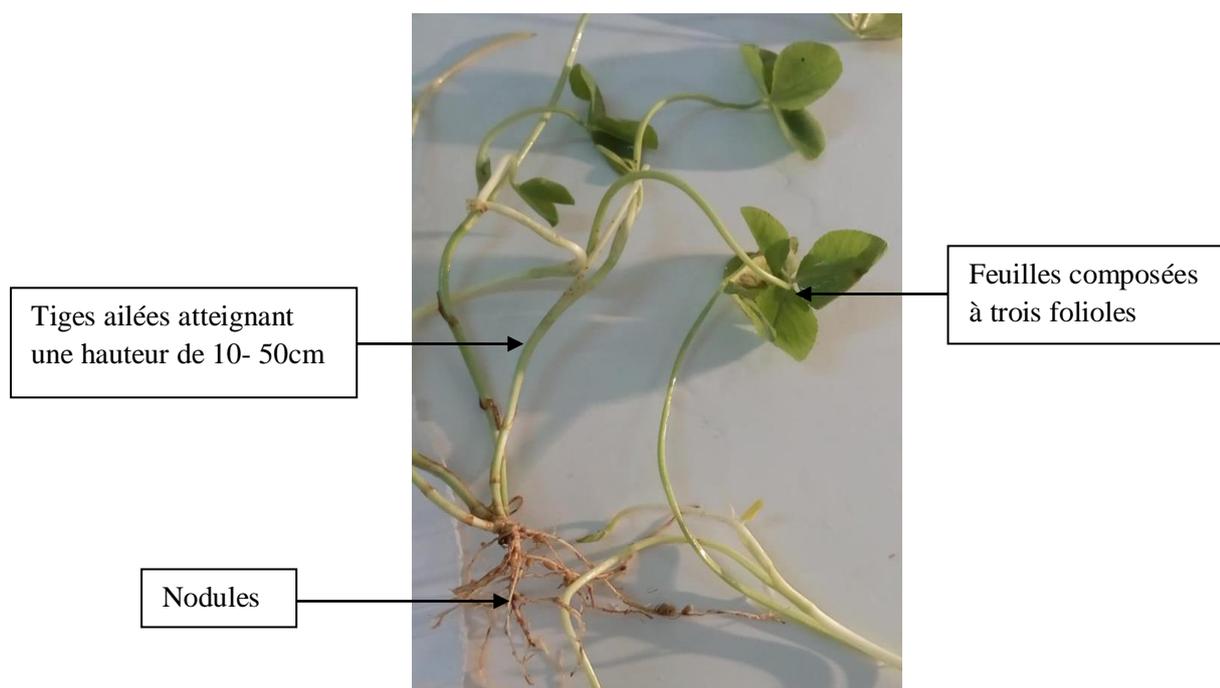


Figure 7. *Trifolium* sp.

1. 3. Conservation des nodules

Le substrat lié au niveau des racines est enlevé avec précaution pour ne pas abimer les nodules, les racines sont ensuite rincées à l'eau courante ; puis les nodules sont détachés à l'aide d'un couteau de 1 à 2 cm de leur point d'attache puis séchés avec du papier filtre. Pour un usage immédiat, les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4°C pendant 48 heures.

Pour une longue conservation, la dessiccation des nodules se fait dans des flacons en verre contenant un déshydratant tel que le CaCl_2 anhydre et une couche de coton sur laquelle on dépose les nodules (**Vincent 1970**).

2. Isolement et purification des microorganismes

Les nodules sont réhydratés pendant 30 minutes dans de l'eau distillée stérile sous agitation (vortex).

2. 1. Désinfection de la surface des nodules

La surface des nodules est désinfectée avec de l'éthanol à 95% pendant 30 s, ensuite les nodules sont immergés dans de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 3 min puis dans l'H₂O₂ pendant 20 s. Enfin, ils sont rincés plusieurs fois dans de l'eau distillée stérile. L'eau distillée stérile utilisée pour le rinçage final est étalée sur des plaques YEMA (Annexe I) comme témoins pour détecter d'éventuels contaminants (**Vincent 1970**).

2. 2. Isolement des microorganismes à partir des nodules

Pour l'isolement, les nodules sont coupés avec un couteau stérilisé, puis une boucle remplie de sève de nodules estensemencée sur un milieu YEMA, ensuite les cultures sont incubées dans l'obscurité à 28°C pendant 5 jours.

2. 3. Purification des isolats

La purification des isolats se fait par repiquage de colonies bien isolées sur boîtes de Pétri de TY (Annexe I) par la technique des stries. Ensuite, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours. La pureté des isolats est confirmée par observation macroscopique et microscopique.

2. 3. 1. Observation macroscopique

L'observation morphologique des colonies permet de déterminer leur pureté en examinant le contour, la forme, la couleur et la viscosité des colonies.

2. 3. 2. Observation microscopique

La pureté des isolats est confirmée par un contrôle supplémentaire par observation microscopique grâce à la coloration de Gram (Annexe III) qui permet de différencier la forme des isolats ainsi que la composition de la paroi cellulaire des bactéries qui sont à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (**Delarras 1998**).

2. 4. Conservation des isolats

Deux méthodes de conservation des isolats sont utilisées :

2. 4. 1. Conservation à court terme

Les isolats purifiés sont conservés sur gélose inclinée (YEMA) et incubés à 28°C pendant 48 à 72 heures. Ensuite, les cultures sont conservées au réfrigérateur à 4°C de 6 à 12 mois (**Vincent 1970**).

2. 4. 2. Conservation à long terme

Pour une conservation de longue durée, les isolats sont conservés à -20 et -80°C dans du TY liquide ensemencer et additionner de glycérol à 30% (v/v).

3. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats

3. 1. Test d'absorption du colorant Rouge Congo sur milieu YEMA

Les isolats sont ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA additionné de 0.0025% (p/v) de RC (Annexe II) afin de vérifier l'absorption ou non du RC. Ensuite les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72 heures (**Somasegaran et Hoben 1985**). Les rhizobia qui n'absorbent pas ou peu le RC appartiennent à la classe des α -Protéobactéries.

3. 2. Test du bleu de bromothymol (BBT)

La mise en évidence de la capacité des isolats à acidifier ou alcaliniser le milieu YEMA est évaluée par l'ajout de l'indicateur coloré le bleu bromophénol à une concentration de 0,0025% (w/v) dans le milieu (Annexe II). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 heures (**Somasegaran et Hoben 1985**).

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.

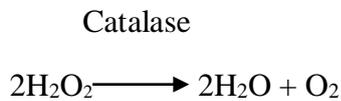
3. 3. Croissance des isolats sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)

Le milieu utilisé pour ce test est le Peptone Glucose Agar (Annexe I) additionné d'une solution alcoolique de pourpre de bromocrésol à une concentration de 1% (p/v) (Annexe II). Les boîtes sont ensemencées puis incubées à 28°C pendant 48 heures (**Singh et al. 2008**).

La croissance des bactéries non rhizobia ce manifeste par un virage de couleur du milieu au jaune, tandis que les rhizobia poussent peu ou pas sur ce milieu.

3. 4. Test de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, elle participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène. La présence de cette enzyme est mise en évidence par contact d'une colonie bactérienne avec quelques gouttes d'H₂O₂ à 10 volumes placée sur une lame propre. Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'oxygène en quelques secondes (**Smibert et Krieg 1994**). Selon l'équation suivante :



4. Evaluation des activités PGPR des isolats

4. 1. Test de solubilisation des phosphates

Ce test permet d'évaluer la capacité des isolats à solubiliser les phosphates sur milieu de Pikovskaya solide (PVK), ce milieu contient du Ca₃(PO₄)₂ comme seule source de phosphate (Annexe I). Un volume de 2 µl de chaque culture bactérienne de 24 heures est déposé sous forme de spots à la surface du milieu PVK puis incubé à 28°C pendant 7 jours (**Pikovskaya 1948**). Le diamètre du halo (diamètre total - diamètre de la colonie) est ensuite mesuré.

4. 2. Production des sidérophores

La production des siderophores (fer) par les isolats est réalisée sur milieu chrome azurol S (CAS) solide (Annexe I) ensemencée par piqure à raison de 3 à 4 isolats par boîte de Pétri puis incubée à 28°C pendant 48 heures. Le virage de la couleur bleue du milieu vers la couleur orange autour de la colonie indique une production de sidérophores. Les diamètres de ces halos sont mesurés et pris comme estimations de l'intensité de la production de sidérophores (**Shwyn et Neilands 1987**).

4. 3. Production d'enzymes

4. 3. 1. Activité uréasique

Les isolats sont cultivés sur le milieu YEMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de Rouge de phénol comme indicateur de pH. La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,20 µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C. Les boîtes de Pétri sontensemencées et incubées à 28°C pendant 24 heures. La réaction positive est indiquée par la présence de colonies alcalinisant le milieu (**Somasegaran et Hoben 1994**).

4. 3. 2. Activité cellulolytique

La production de la cellulase est déterminée dans un milieu agar à base de CMC (Carboxy Methyl Cellulose) comme source de carbone (Annexe I) après une incubation de 5 jours à 28°C les boîtes de Pétri sont inondées par une solution aqueuse de Rouge Congo à 1% (p/v) puis incubées 30 minutes dans l'étuve à 30°C. La solution colorante est ensuite remplacée par une solution de NaCl 1M et laissées pendant 30 minutes à température ambiante puis vidées de cette solution. La présence de l'enzyme se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (**Gupta et al. 2012**).

4. 3. 3. Activité amylolytique

La recherche d'amylase est effectuée par la mise en culture des isolats sur une gélose nutritive (GN) additionnée de 1% d'amidon (Annexe I). Après incubation à 30°C pendant 72 heures, les boîtes de Pétri sont inondées par une solution de Lugol après quelques minutes de contact l'excès est éliminé. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies, cependant les zones contenant l'amidon non dégradé se colorent en brun (**Delarras 2014**).

4. 3. 4. Activité protéasique

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur le milieu GN contenant 5% de lait en poudre. Après incubation à 28°C pendant 72 heures l'apparition d'un halo claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (**Brown et Foster 1970**).

4. 3. 5. Activité estérasique (Tween 20)

La dégradation du tween 20 par les isolats est testée sur le milieu de culture utilisé par **Sierra (1957)** (Annexe I) en remplaçant le tween 80 par le tween 20 (**Carrim et al. 2006**)

après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un précipité autour des colonies.

4. 4. Activité antifongique

4. 4. 1. *In vitro*

Le test d'antagonisme fongique *in vitro* est réalisé sur milieu Potato- Dextrose- Agar (PDA) (Annexe I). Les isolats sont testés pour vérifier leur capacité à inhiber la croissance d'une souche de référence d'un champignon phytopathogène : *Sclerotinia sclerotiorum*. Un disque de gélose de 6 mm de diamètre d'une culture jeune de 5 jours du champignon est déposé au centre des boîtes de Pétri. 10 µl de chaque culture bactérienne de 10⁸UFC/ml sont ensemencés en spot à 3 cm de la souche fongique. Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries. Après incubation des boîtes à 25°C pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante formule décrite par **Kumar et al. (2002) : Taux d' inhibition (%) = (x - y) / y × 100**

X : Diamètre du mycélium control. Y : Diamètre du mycélium en présence des isolats étudiés.

Les isolats qui ont un diamètre de 1 à 5 mm, présentent une faible inhibition, ceux qui ont un diamètre de 6 à 10 mm sont moyennement inhibiteurs, et les isolats de 11 à 15 mm de diamètre ont une forte inhibition.

4. 4. 2. *In vivo*

Les graines de la plante *Medicago truncatula* sont stérilisées en surface avec de l'acide sulfurique à 96% pendant 10 minutes, puis elles sont lavées 5 fois à l'eau stérile pour éliminer toute trace d'acide. Les graines sont ensuite incubées dans des boîtes de Pétri stériles contenant de l'agar à 10% d'eau pendant 2 à 3 jours dans l'obscurité pour permettre la germination.

Les plantules sont ensuite transférées dans des boîtes de Pétri stériles contenant du milieu de Fahraeus, cinq plantes sont testées avec chaque isolat et sont réalisées dans des boîtes de Pétri en duplicata. Les bactéries sont inoculées par une suspension de 1 ml d'une culture liquide cultivée pendant la nuit dans un milieu TY (10⁸ cellules ml/1). Les plantes sont cultivées dans une chambre de croissance à une température constante de 25°C et une photopériode claire/foncée de 16/8h. Après 4 jours, les plantes commencent à pousser et à développer leurs systèmes racinaires et sont inoculer avec 5 ml de suspension du champignon

phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum*. Les plantes non inoculées sont incluses comme témoin (Figure 8).

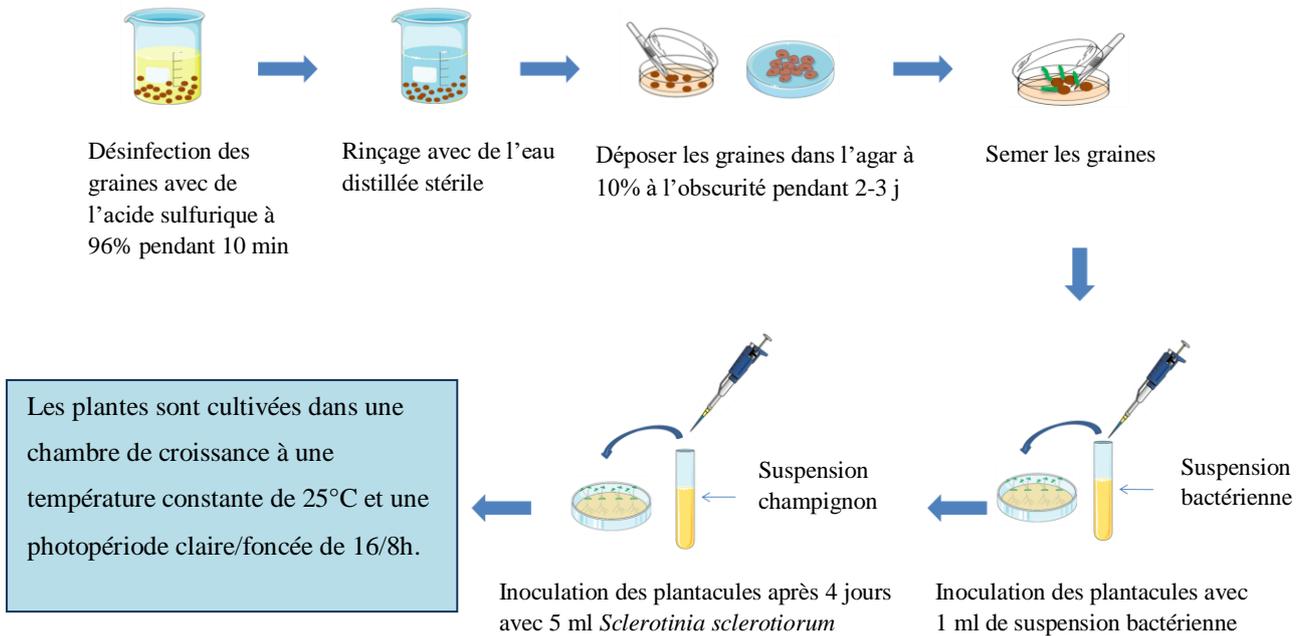


Figure 8. Protocole expérimental de l'activité antifongique *in vivo*

5. Caractérisation de l'isolat- levure RSRod01

5. 1. Croissance d'isolat- levure sur milieu sans source d'azote

L'isolat de levure RSRod01 est ensemencé sur un milieu YEMA sans source d'azote (Mannitol 10 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, Agarose 15 g) et incubé pendant 4 jours à 28°C.

5. 2. Test de réduction de l'acétylène (ARA)

La capacité de fixation de l'azote de la levure RSRod01 est testée à l'aide du test de réduction de l'acétylène (ARA) décrit par **Hardy et al. (1968)**. L'isolat est inoculé dans un tube de 70 ml contenant 30 ml de milieu YEMA semi-solide sans source d'azote et incubé à 28°C pendant 3 jours. Ensuite, 1 ml d'air du tube est remplacé par du gaz acétylène à l'aide d'une seringue. Après incubation pendant 12 heures, un volume de 0,4 ml de gaz est retiré du tube, et la formation d'éthylène est analysée par un chromatographe en phase gazeuse GC7820 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

6. Résistance des isolats aux stress métalliques et salin

6. 1. Tests de résistance aux métaux lourds

La résistance aux métaux lourds des isolats est étudiée sur milieu solide et sur milieu liquide (TY) additionné de concentrations croissantes de Cd ($\text{CdCl}_2, 5\text{H}_2\text{O}$), Cu ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$), Pb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), Cr ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Co ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$), Ni ($\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$) et de Zn ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$).

Les solutions stock de ces métaux lourds sont préparées dans de l'eau distillée et stérilisées par filtration sur membrane (0,22 mm) et conservées au réfrigérateur à 4°C.

6. 1. 1. Sur milieu solide

La résistance est étudiée pour tous les isolats sur milieu TY solide, à partir des solutions stocks des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés au milieu de culture stérilisé maintenu à 45°C juste avant de le couler dans les boîtes de Pétri. Les concentrations utilisées varient de 25 à 1300 µg/ml selon le métal. Les boîtes sont subdivisées en 6 à 9 portions, chacune estensemencée en spot à raison de 10 µl de cultures jeunes (10^7UFC/ml). Ainsi, deux répétitions sont réalisées pour chacune des concentrations. Un témoin négatif sans métal estensemencé avec les mêmes suspensions bactériennes. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 28°C pendant 7 jours et l'observation se fait tous les trois jours (Figure 9).

Les concentrations minimales inhibitrices qui correspondent à la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne sont déterminées.

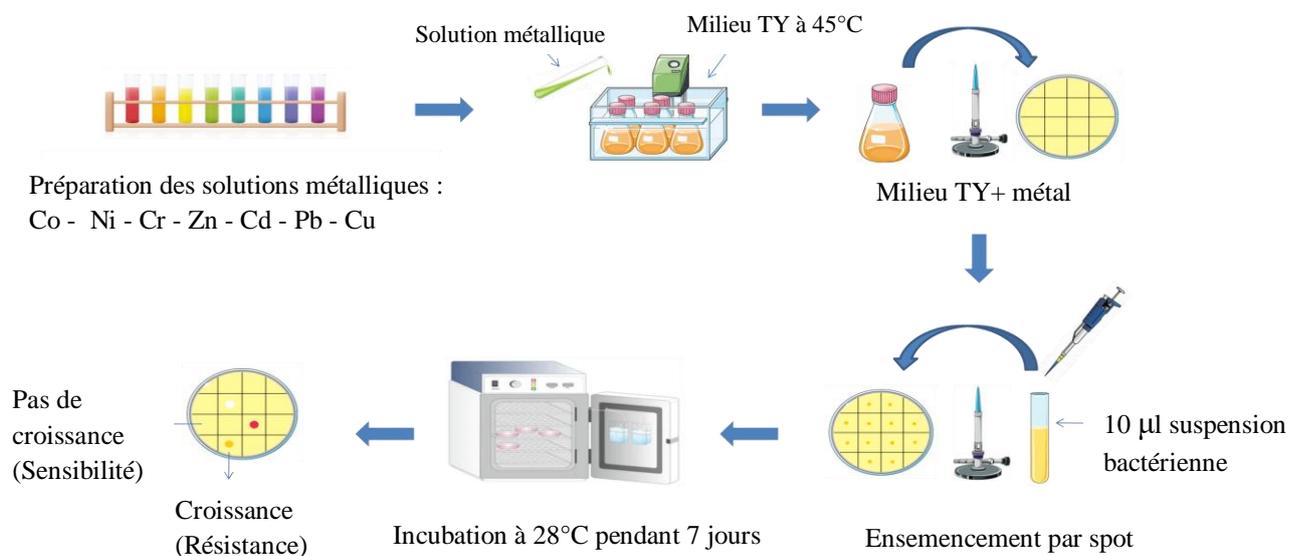


Figure 9. Protocole expérimental de la résistance aux métaux lourds sur milieu solide

6. 1. 2. Sur milieu liquide

La mesure de la croissance en milieu liquide en présence des métaux lourds est effectuée que pour l'isolat qui montre une forte tolérance aux métaux testés sur milieu solide.

Des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu TY liquide additionnées avec des volumes correspondants aux concentrations des CMI des métaux lourds sontensemencées avec 1 ml de suspension bactérienne issu d'une pré culture de l'isolat fraîchement préparée (10^7 UFC/ml). Deux répétitions sont réalisées, pour chaque concentration. Le milieu liquide TY sans métal avec l'inoculum bactérien (contrôle de la croissance bactérienne) et le milieu avec métal mais sans bactéries (contrôle abiotique) ont servi de témoins. Les cultures sont ensuite incubées à 28°C dans un agitateur rotatif à 180 tr/min. La croissance bactérienne est mesurée en termes de densité optique à 600 nm pendant 8 jours à 24 heures d'intervalle en utilisant un spectrophotomètre (Figure 10).

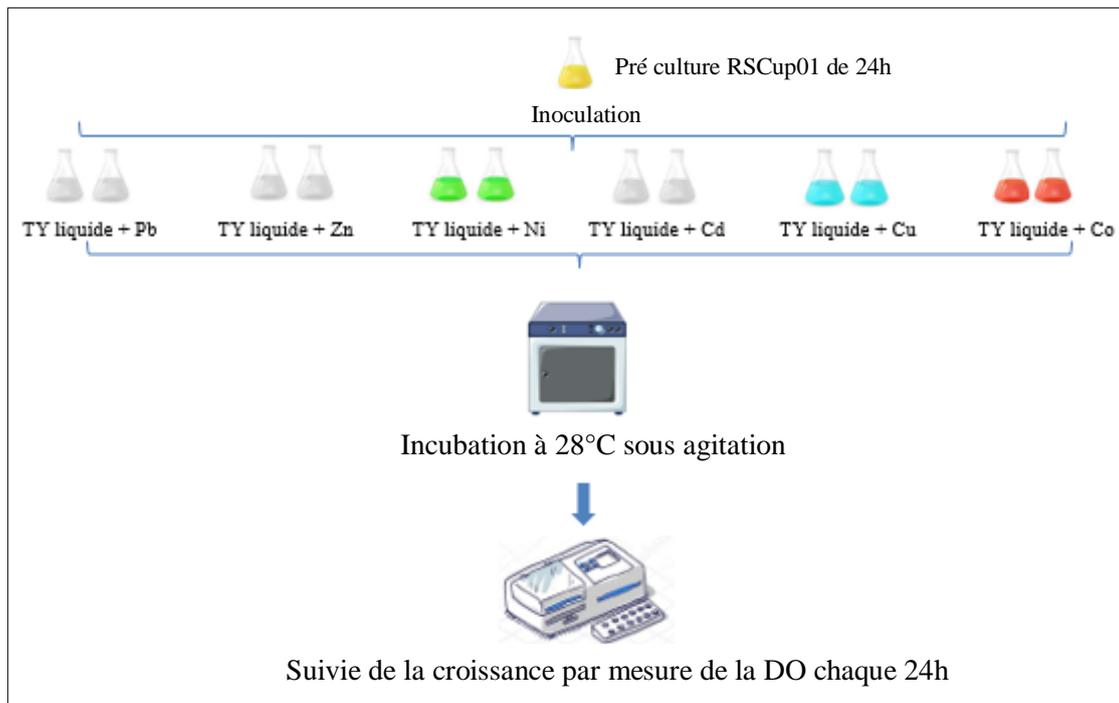


Figure 10. Protocole expérimental de la résistance aux métaux lourds sur milieu liquide

6. 2. Tests de résistance à la salinité

6. 2. 1. Sur milieu solide

Ce test permet d'étudier l'effet du sel sur la croissance des bactéries, la tolérance au sel des isolats est réalisée en milieu solide TY additionné de différentes concentrations de NaCl de 1,5 jusqu'à 20% (p/v), les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 28°C pendant 5 jours.

6. 2. 2. Sur milieu liquide

La tolérance au NaCl sur milieu liquide est réalisée sur l'isolat le plus résistant sur milieu solide. Dans des erlenmeyer un volume de 50 ml de milieu liquide TY contenant 16, 18 et 20% de NaCl sont inoculés avec 1 ml une suspension bactérienne fraîchement préparé. Deux répétitions sont réalisées pour chaque concentration. Le milieu liquide TY sans sel avec l'inoculum bactérien (contrôle de la croissance bactérienne) et le milieu avec le sel mais sans bactéries (contrôle abiotique) ont servi de témoins. Les cultures sont ensuite incubées à 28°C dans un agitateur rotatif à 180 tr/min. La croissance bactérienne est mesurée en termes de densité optique à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre pendant 5 jours à 24 heures d'intervalle.

7. Identification et caractérisation moléculaire des isolats

7. 1. Amplification de l'ADN

7. 1. 1. Fragments d'ADN à analyser

Les isolats sont analysés par séquençage de plusieurs fragments d'ADN, comportant un gène ribosomique (ARNr 16S), deux gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*), deux gènes de résistances aux métaux lourds (*nccA* et *czcD*) et la région inter génique (ITS) chez la levure.

7. 1. 2. Lyse cellulaire

Pour la lyse cellulaire et l'extraction de l'ADN des isolats, des colonies microbiennes sont prélevées sur des cultures de TY pur et transférées dans un tube PCR contenant 20 µl d'eau ultra pure. La lyse cellulaire est effectuée pour libérer l'ADN par choc thermique en utilisant 13 cycles (95°C 20s - 4°C 20s). Le lysat qui en résulte est utilisé comme ADN matrice pour l'amplification (Figure 11).

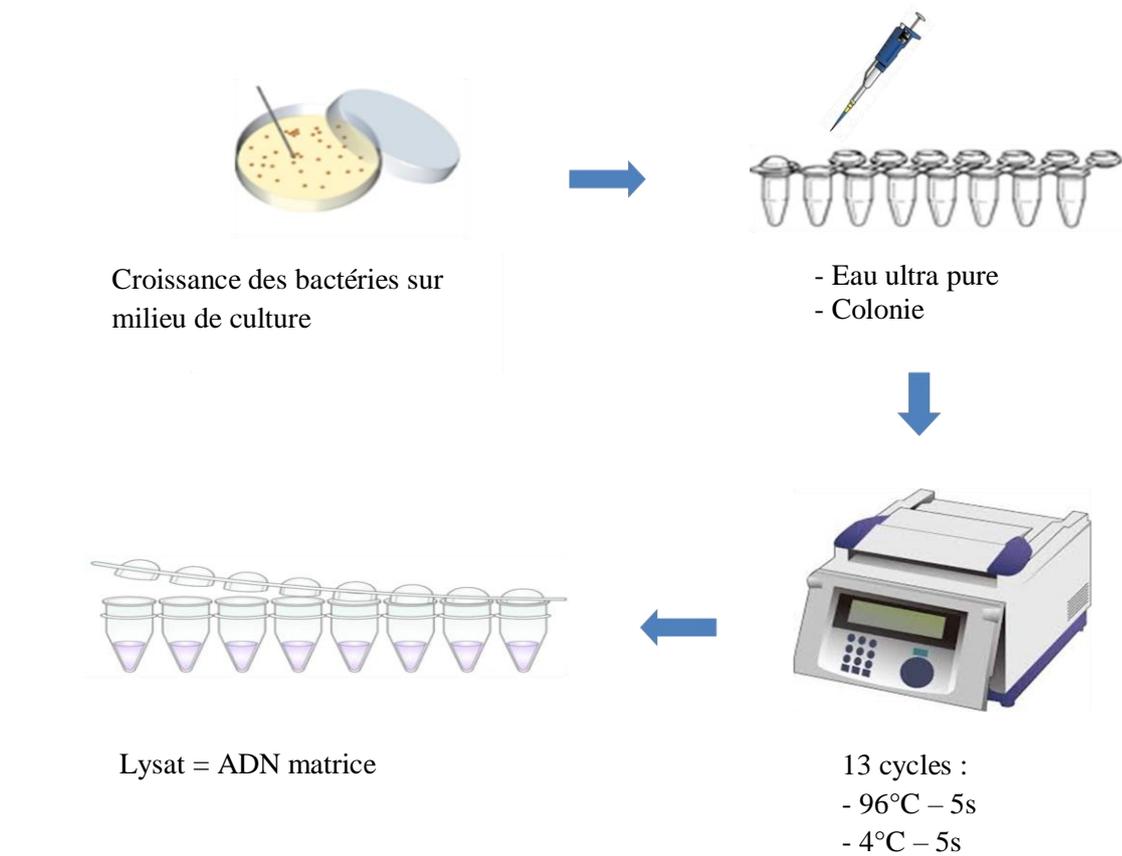


Figure 11. Protocole expérimental de la lyse cellulaire

7. 1. 3. Amorces utilisées

Selon le gène ciblé pour l'amplification, un ou plusieurs couples d'amorces (Tableau 3), sont utilisées :

Tableau 3 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes ARNr 16S, ITS, *nodC*, *nifH*, *nccA* et *czcD*

Primers	Sequences (5'-3')	Taille des gènes	References
16S	fd1 GAG TTT GAT CCT GGC TCA	1400 pb	Weisburg et al. 1991
	rp2 ACG GCT AAC TTG TTA CGA CT		
ITS	ITS1 TCC GTA GGT GAA CCT GCGG	547 pb	White et al. 1990
levure	ITS4 TCC TCC GCT TAT TGA TATGC		
<i>nodC</i>	NodCF AYG THG TYG AYG ACG GTT	930 pb	Laguerre et al. 2001
	NodCI CGY GAC AGC CAN TCK CTA TTG		
<i>nifH</i>	nifH-F AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC	500 pb	Rösch et al. 2002

nifH-R	TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT		
nccA	nccA-F ACG CCG GAC ATC ACG AAC AAG nccA-R CCA GCG CAC CGA GAC TCA TCA	1141 pb	Abou-Shanab et al. 2007
czcD	czcD-F CAG GTC ACT GAC ACG ACC AT czcD-R CAT GCT GAT GAG ATT GAT GATC	500 pb	Nies et al. 1989

7. 1. 4. Solution mixte pour l'amplification des gènes d'intérêt

Chaque microtube contenant 20 µl de la solution réactionnelle correspond à un isolat et un microtube contenant de l'eau ultra pure sert de témoin négatif.

Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	Quantité en µl
Tampon (x5 Green Go taq)	4 µl
dNTPs	0,4 µl
Amorce 1	0,4 µl
Amorce 2	0,4 µl
Taq polymérase	0,4 µl
ADN génomique	2 µl
Eau ultra-pure	12,4 µl

7. 1. 5. Conditions de l'amplification par PCR des gènes d'intérêt

Les étapes d'amplifications sont semblables pour les fragments à amplifier. Excepté la température d'hybridation variant de 50°C à 61°C selon le couple d'amorce utilisé (Tableau 5).

L'amplification de l'ADN (Polymerase Chain Reaction, PCR) comprend plusieurs étapes suivant : dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivie de 35 cycles de dénaturation (1 min à 94°C), d'hybridation (1 min) et d'extension (à 72°C pendant 1 min) puis une extension finale (7 min à 72°C).

Tableau 5 : Température d'hybridation des différents couples d'amorce

ADN	Couple d'amorce	Température d'hybridation
16S	fd1/rp2	61°C
ITS fungi	ITS1/ITS4	57°C
<i>nodC</i>	nodCI/ nodCF	55°C
<i>nifH</i>	nifH-F / nifH-R	57°C
<i>czcD</i>	<i>czcD</i> -F/ <i>czcD</i> -R	54°C
<i>nccA</i>	nccA-F/ nccA-R	54°C

7. 1. 6. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de l'amplification sont analysés pour vérifier leur présence, leur pureté et leur taille. Pour chaque échantillon, 5 µl est déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve contenant du TAE (Tris-Acétate, EDTA) à 1X. Après migration pendant 20 min à 120 V jusqu' à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel, le gel est trempé dans un bain de Bromure d'Ethidium pendant 15 min et visualisé par la suite sous UV ensuite la photo est capturée avec le programme BioCapt. Un marqueur moléculaire de taille de 1 KB est utilisé pour estimer la taille des gènes. L'eau ultra pure stérile est utilisée comme témoin négatif.

7. 2. Obtention des échantillons d'ADN

7. 2. 1. Purification des produits PCR

La purification des produits PCR est réalisée à l'aide du kit selon le protocole suivant :

La colonne de purification est premièrement insérée dans son support (tube fourni), puis le même volume de la « bind solutions » est ajouté à celui du produit PCR dans la colonne, le mélange est ensuite centrifugé à 16000 pendant une minute, le surnageant est éliminé et la colonne est rincé à l'aide de 0.7 ml d'une solution de rinçage « wash solution » puis recentrifugé à 16000 pendant une minute, le surnageant est éliminé une seconde fois et rincé une deuxième fois avec la même solution « wash solution » puis recentrifugé à 16000 pendant 5 min. L'éluant est éliminé et la colonne est centrifugée à sec à 16000 pendant 1 min pour éliminer l'excès de l'éthanol. La colonne est ensuite transférée dans un tube d'ependorf de 2 ml et 50 µl de la solution « nuclease free water » puis centrifugé à la même vitesse

pendant 1 min pour éluer l'ADN. Ce dernier peut être immédiatement utilisé ou conservé à -20°C.

7. 2. 2. Dosage de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (NanodropTM Lite). La pureté de l'ADN est évaluée par le rapport de densité optique DO 260/280 nm. L'extrait d'ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport compris entre 1,8 et 2.

7. 3. Analyse des données

7. 3. 1. Séquençage et corrections des séquences

Le séquençage des amplicons est réalisé par la société Eurofine (Allemagne). Les séquences obtenues sont vérifiées et corrigées manuellement à l'aide d'un logiciel «bio Edit». Les séquences résultantes sont analysées en utilisant le programme BLAST pour vérifier leur homologie avec les séquences de la banque des gènes de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Le programme BLAST permet d'aligner nos séquences avec celles qui lui sont homologues. Enfin d'alignement, BLAST propose un ensemble de séquences ADN_r qui ont un taux d'identité (% de ressemblance) total ou presque.

7. 3. 2. Analyse phylogénétique des gènes ARNr 16S, ITS, *nodC* et *nifH*

Les séquences d'ADN des gènes sont assemblées et alignées en utilisant l'algorithme CLUSTAL W dans le logiciel MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). Les arbres phylogénétiques sont construits en utilisant la méthode de Neighbour-joining en utilisant le modèle à 2 paramètres de Kimura. La stabilité des relations est évaluée en effectuant une analyse bootstrap de 1000 répliques (Felsenstein 1985).

7. 3. 3. Analyse phylogénétique des gènes de résistance aux métaux lourds

Les séquences nucléotidiques des deux gènes de résistance *czcD* et *nccA* sont traduites en séquences protéiques à l'aide du serveur protéomique ExPASy de l'institut suisse de bioinformatique (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Une recherche BLAST dans les bases de données protéiques du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) est effectuée pour identifier les produits génétiques les plus proches de type *czcD* et *nccA* (Karelová et al. 2011). Les alignements des séquences multiples et arbres phylogénétiques sont construits à

l'aide du logiciel MEGA 7.0 (**Kumar et al. 2016**) en utilisant la méthode de Neighbour-joining avec 1000 répliques bootstrap.

8. Analyse statistique

L'analyse en composantes principales (ACP) est réalisée pour examiner les relations entre la tolérance des isolats *in vitro* à des concentrations élevées en métaux lourds, à la salinité et leurs activités PGPR. 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>).

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Isolement, caractérisation morphologique et culturale des isolats

1. 1. Isolement des rhizobactéries

La croissance des rhizobactéries sur milieu YEMA est généralement utilisée pour leur isolement et leur identification. Quarante-neuf isolats bactériens et un isolat levure sont isolés à partir des nodules racinaires de quatre plantes de *Trifolium* sp. collectées de la mine Djedada situé dans la région de Hammam N'Bail de Guelma au Nord Est de l'Algérie.

1. 2. Temps de croissance

Le temps de croissance des rhizobia, cultivées sur YEMA est un bon indice de groupage, il permet de différencier les rhizobia à croissance rapide qui poussent entre 48 et 72 heures des rhizobia à croissance lente qui poussent à plus de 4 jours (Tableau 6) (Somasegaran et Hoben 1985).

Tableau 6 : Temps de croissance des bactéries isolées

Code des isolats	Nombre	Temps de croissance (heures)
RSPs01, RSPs02, RSPs03, RSPs04, RSPs05, RSPs06, RSPs07, RSPs08, RSPs09, RSMic01, RSMic02, RSMic03, RSMic04, RSMic05, RSMic06, RSMic07, RSMic08, RSMicc01, RSBac01, RSBac02, RSBac03, RSAci01, RSAci02, RSPro01 RSEnt01 RSSta01 RSPar01 RSKoc01	28	24 heures
RSRh01, RSRh02, RSRh03, RSRh04, RSRh05, RSRh06, RSRh07, RSRh08, RSRh09, RSRh10, RSRh11, RSRos01, RSFr01	13	48 heures
RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07, RSCup08	8	48/ 72 heures

Nos résultats montrent que les isolats obtenus ont un temps de croissance compris entre 24 et 72 heures, ils sont donc classés dans la catégorie des rhizobia à croissance rapide.

1. 3. Caractéristiques morphologiques

1. 3. 1. Observation macroscopique

Nos résultats indiquent que le type de colonies des isolats sur milieu YEMA varie de forme régulière à irrégulière avec une texture lisse visqueuse ou sèche, opaque ou translucide et ont des couleurs différentes ; jaune, blanc, beige, orange et rose (Tableau 7). On remarque aussi que seulement 22,44% de ces isolats produisent des polysaccharides.

1. 3. 2. Observation microscopique

Une coloration de Gram est réalisée et a permis de visualiser les bactéries au microscope optique (Figure 12). Trente-quatre isolats sont Gram négatifs et quinze sont Gram positifs en forme de bacilles, cocci et coccobacille (Tableau 7).

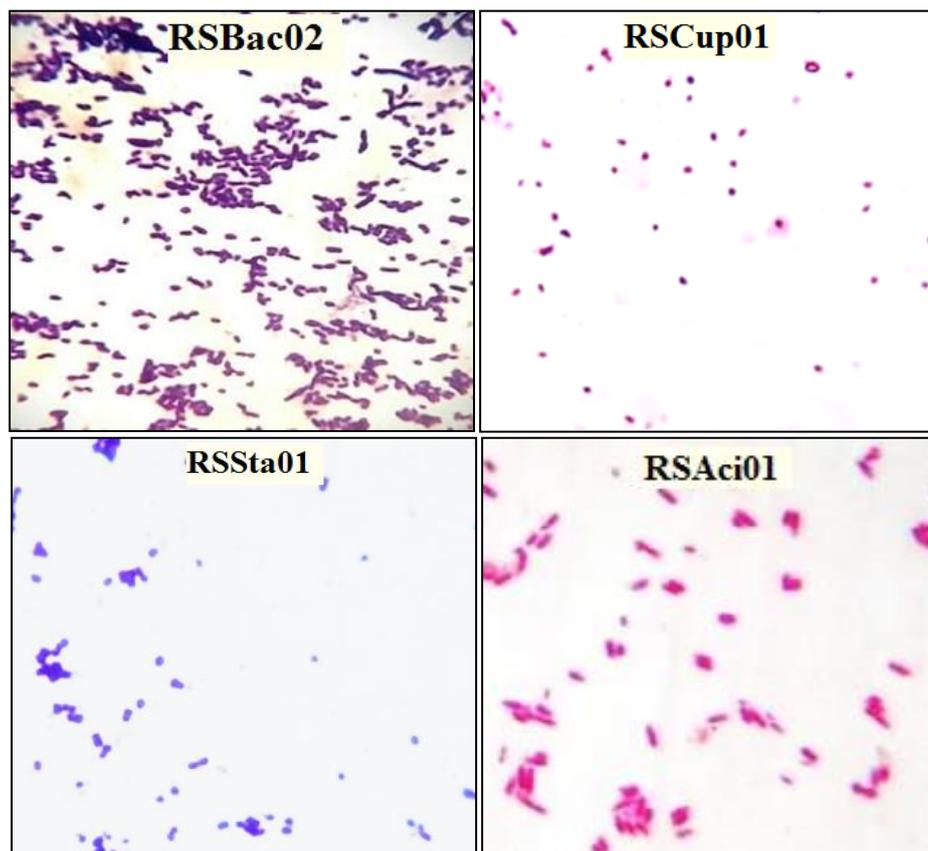


Figure 12. Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram (X100)

Tableau 7 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens

Codes	Aspect microscopique		Aspect macroscopique des colonies				
	Gram	Forme	Contour	Surface	Opacité	Couleur	Consistance
RSRh01	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh02	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh03	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh04	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh05	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh06	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh07	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh08	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh09	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh10	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSRh011	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Translucide	Blanche	Visqueuse
RSCup01	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup02	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup03	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup04	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup05	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup06	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup07	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSCup08	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSPs01	Gram -	Court bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSPs02	Gram -	Court bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSPs03	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs04	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs05	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs06	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs07	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs08	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
RSPs09	Gram -	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse

RSACi02	Gram -	Bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Sèche
RSPro01	Gram -	Bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSEnt01	Gram -	Bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSRos01	Gram -	Coccobacille	Régulier	Lisse	Opaque	Rose	Crémeuse
RSACi01	Gram -	Coccobacille	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
RSPar01	Gram -	Cocci	Régulier	Lisse	Opaque	Orange	Crémeuse
RSMic01	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic02	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic03	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic04	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic05	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic06	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic07	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMic08	Gram +	Court bacille	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSBac01	Gram +	Bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Sèche
RSBac02	Gram +	Bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Sèche
RSBac03	Gram +	Bacille	Irrégulier	Rugueuse	Opaque	Blanche	Sèche
RSFr01	Gram +	Bacille	Régulier	Rugueuse	Opaque	Orange	Sèche
RSKoc01	Gram +	Gros cocci	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
RSMicc01	Gram +	Cocci en tetrade	Régulier	Lisse	Opaque	Jaune	Sèche
RSSta01	Gram +	Cocci en grappe	Régulier	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse

1. 4. Caractéristiques culturales

1. 4. 1. Croissance sur milieu YEMA additionné de Rouge Congo (RC)

Les résultats de la croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de RC (0.0025%) sont représentés sur le tableau 8.

La majorité des isolats apparaissent avec leur couleur initiale et n'absorbent pas ou peu le RC (colonies de couleur rosâtre). Seuls les isolats RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07, RSCup08, RSBac01, RSBac02, RSSta01, RSPs01 et RSPs02 absorbent le RC et apparaissent d'une couleur rouge ou rosâtre (Figure 13).

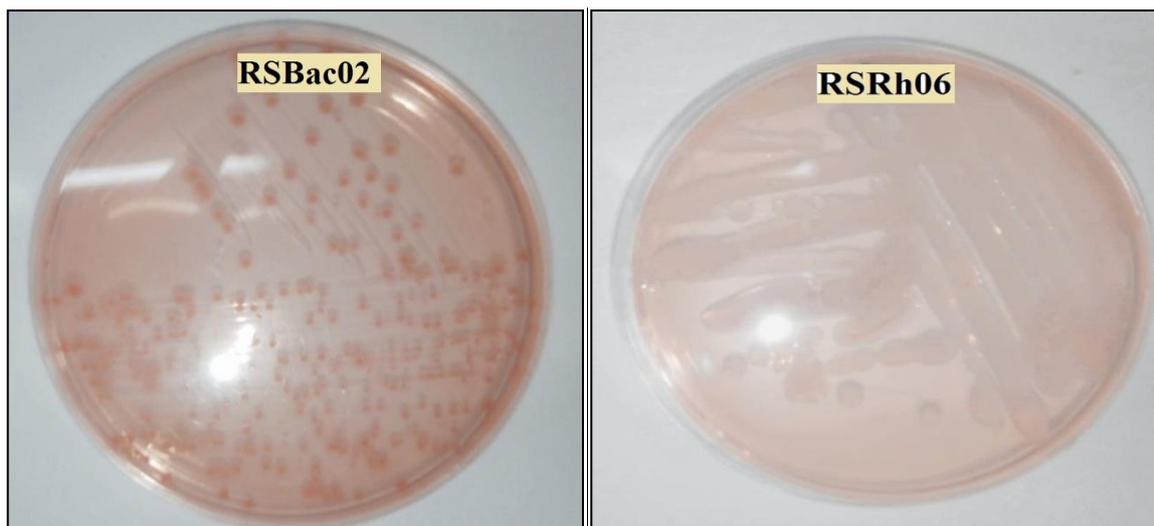


Figure 13. Croissance des isolats bactériens sur milieu YEMA + RC

1. 4. 2. Croissance sur milieu YEMA additionné de Bleu de Bromothymol (BBT)

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau 8, la majorité des isolats produisent une réaction acide sur le milieu YMA + BTB, alors que 8 isolats RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 alcalinisent le milieu et seulement un isolat RSKoc01 reste neutre et ne modifie pas le pH du milieu.

Tableau 8 : Caractérisation culturelle des isolats bactériens

Code des isolats	Catalase	YEMA+BBT	GPA	YEMA+RC
RSCup01	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup02	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup03	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup04	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup05	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup06	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup07	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSCup08	+	Forte alcalinisation du pH	Faible croissance	Absorbtion
RSRh01	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh02	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh03	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh04	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh05	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh06	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion

Partie III : Résultats et discussion

RSRh07	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh08	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh09	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh10	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSRh011	+	Forte acidification du pH	Pas de croissance	Pas d'absorbtion
RSMic01	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic02	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic03	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic04	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic05	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic06	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic07	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMic08	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSFr01	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSRos01	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSMicc01	+	Forte acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs01	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Absorbtion
RSPs02	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Absorbtion
RSPs03	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs04	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs05	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs06	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs07	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs08	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSPs09	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSACi01	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSACi02	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSEnt01	+	Acidification moyenne du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSBac01	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSBac02	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Absorbtion
RSBac03	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Absorbtion
RSPro01	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSSta01	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Absorbtion
RSPar01	+	Légère acidification du pH	Bonne croissance	Pas d'absorbtion
RSKoc01	+	pH neutre	Bonne croissance	Pas d'absorbtion

1. 4. 3. Croissance sur milieu GPA

La majorité des isolats ont une bonne croissance sur le milieu GPA (Tableau 8), à l'exception de 19 isolats RSRh01, RSRh02, RSRh03, RSRh04, RSRh05, RSRh06, RSRh07, RSRh08, RSRh09, RSRh10, RSRh11, RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 qui ont une faible croissance sur ce milieu (Figure 14).

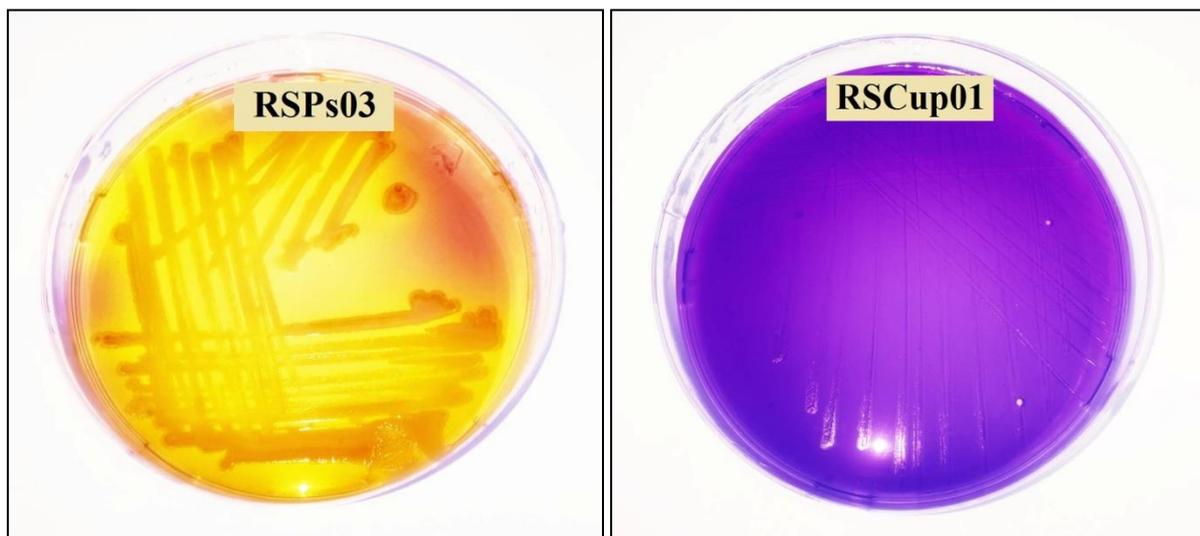


Figure 14. Croissance des isolats bactériens sur milieu GPA

1. 5. Test de la catalase

Tous les isolats testés dans cette étude possèdent une catalase (Tableau 8), ceci est confirmé par la formation de bulles de gaz d'oxygène après l'ajout de l'eau oxygénée. La présence de cette enzyme chez les micro-organismes est utile dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ainsi, des isolats présentant une activité catalasique doivent être résistants aux stress environnementaux.

1. 6. Discussion

Nous avons isolé et caractérisé 49 rhizobactéries à partir des nodules de la légumineuse *Trifolium* sp. récoltée d'un site minier situé dans la région de Hammam N'Bail dans la ville de Guelma.

L'étude macroscopique montre les différentes caractéristiques des colonies entre lisse ou rugueuse, translucide ou opaque, régulière ou irrégulière, la pigmentation des colonies varie de différentes couleurs jaune, blanc, beige, orange et rose. On remarque aussi que peu de ces isolats produisent des polysaccharides. D'autres travaux de recherches ont montré qu'il existe une grande variation dans la morphologie des colonies de souches provenant de nodules de *Trifolium arvense*, *Trifolium dubium*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pretense*, *Trifolium repens* (De Mayer et al. 2011 ; De Mayer et al. 2015).

L'examen microscopique a permis de montrer que les isolats sont des bâtonnets ou des cocci de tailles différentes et 70% des isolats sont des Gram négatif et 30% Gram positif. Nos résultats concordent avec ceux d'Oleńska et Malek (2020) qui ont rapporté que les bactéries Gram négatif prédominent dans les sols contaminés par les métaux lourds.

Les résultats de la croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de RC montrent que la majorité des isolats n'absorbent pas ou peu le RC. Selon Jordan (1984) 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, mais les nouveaux genres de rhizobia (qui appartiennent à β et δ -Proteobacteria) peuvent absorber le RC (Somasegaran et Hoben 1994).

L'étude de l'acidification et alcalinisation du milieu YEMA additionné de BBT montre que la majorité des isolats acidifient le milieu et sont donc classés comme des rhizobia à croissance rapide. Cependant, les isolats tel que RSCup01-RSCup08 qui alcalinisent le milieu sont considérés comme des rhizobia à croissance moyenne, Pervin et al. (2017) ont montré que les isolats à croissance moyenne et/ou lente nécessitent plus de temps à changer la couleur du milieu.

L'étude de la croissance des isolats sur milieu GPA montre que la majorité des isolats ont une bonne croissance, selon Somasegaram et Hoben (1994) les rhizobia ne poussent pas ou faiblement sur milieu GPA puisqu'elles ne métabolisent pas la peptone comme source d'azote, de facteurs de croissance ou d'acides aminés (Previn et al. 2017).

Tous les isolats sont catalase positive, la production de la catalase est l'une des caractéristiques biochimiques importantes des rhizobactéries, car l'enzyme catalase décompose le peroxyde d'hydrogène qui est produit lors d'un stress chimique, environnemental et mécanique (**Kumar et al. 2012**). De plus, le H₂O₂ et cette peroxydase pourraient être impliquées dans la régulation de l'infection en facilitant la dissolution de la matrice glycoprotéique durant le processus de nodulation (**Jamet et al. 2007**).

Les résultats de ces tests préliminaires montrent que la majorité des bactéries isolées de la légumineuse *Trifolium* sp. collectée de sols miniers appartiennent à la classe des α -Protéobactéries et pourraient également appartenir à d'autres classes.

2. Identification et caractérisation moléculaire des isolats bactériens

Pour chaque fragment d'ADN et pour chacune des bactéries, chaque amplicon montre une bande unique révélée par électrophorèse. La taille de la bande de l'amplicon attendu est évaluée visuellement par comparaison au marqueur de taille utilisé dans chaque cas (Figure 15).



Figure 15. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifications du gène ARNr 16S.

M : Marqueur de taille, **T** : Témoin négatif, **1** : L'isolat RSCup01, **2** : L'isolat RSRh05, **3** : L'isolat RSMic03, **4** : L'isolat RSPs01, **5** : L'isolat RSPs03, **6** : L'isolat RSPs08, **7** : L'isolat RSAci02, **8** : L'isolat RSSta01, **9** : L'isolat RSEnt01.

2. 1. Analyses phylogénétiques du gène d'ARNr 16S

L'analyse des séquences de l'ARN ribosomal 16S est une technique largement utilisée pour définir la position taxonomique et mesurer les distances phylogénétiques entre les différentes espèces bactériennes (**Renvoisé et al. 2012**). L'amplification de ce gène et la comparaison des séquences permet la détection et l'identification des bactéries (**Renvoisé et al. 2012**).

En premier lieu on procède à une analyse de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des séquences des gènes de l'ARNr 16S de tous les isolats. La recherche par le BLAST est une méthode utilisée en bio-informatique, qui permet de réaliser une comparaison entre les séquences nucléotidiques des gènes de l'ARNr 16S. Ce programme permet de retrouver

rapidement dans les bases de données (NCBI), les séquences ayant des similitudes avec les séquences de nos isolats.

Les séquences nucléotidiques nouvellement déterminées sont déposées et enregistrées dans la base des données GenBank. Les numéros d'accèsion sont indiqués dans le tableau 9.

L'analyse des séquences du gène ARNr 16S révèle que les isolats sont représentés en cinq classes ; α -Proteobacteria (27%), γ -Proteobacteria (27%), Actinobacteria (22%), β -Proteobacteria (16%), Bacilli (8 %) et appartenait à 14 genres bactériens différents.

Le genre *Rhizobium* est le plus abondant avec 11 isolats, suivi de *Pseudomonas* (09), *Microbacterium* (08), *Cupriavidus* (08), *Bacillus* (03), *Acinetobacter* (02), *Enterobacter* (01), *Providencia* (01), *Staphylococcus* (01), *Kocuria* (01), *Micrococcus* (01), *Fronidhabitans* (01), *Paracoccus* (01) et *Roseomonas* (01) (Figure 16).

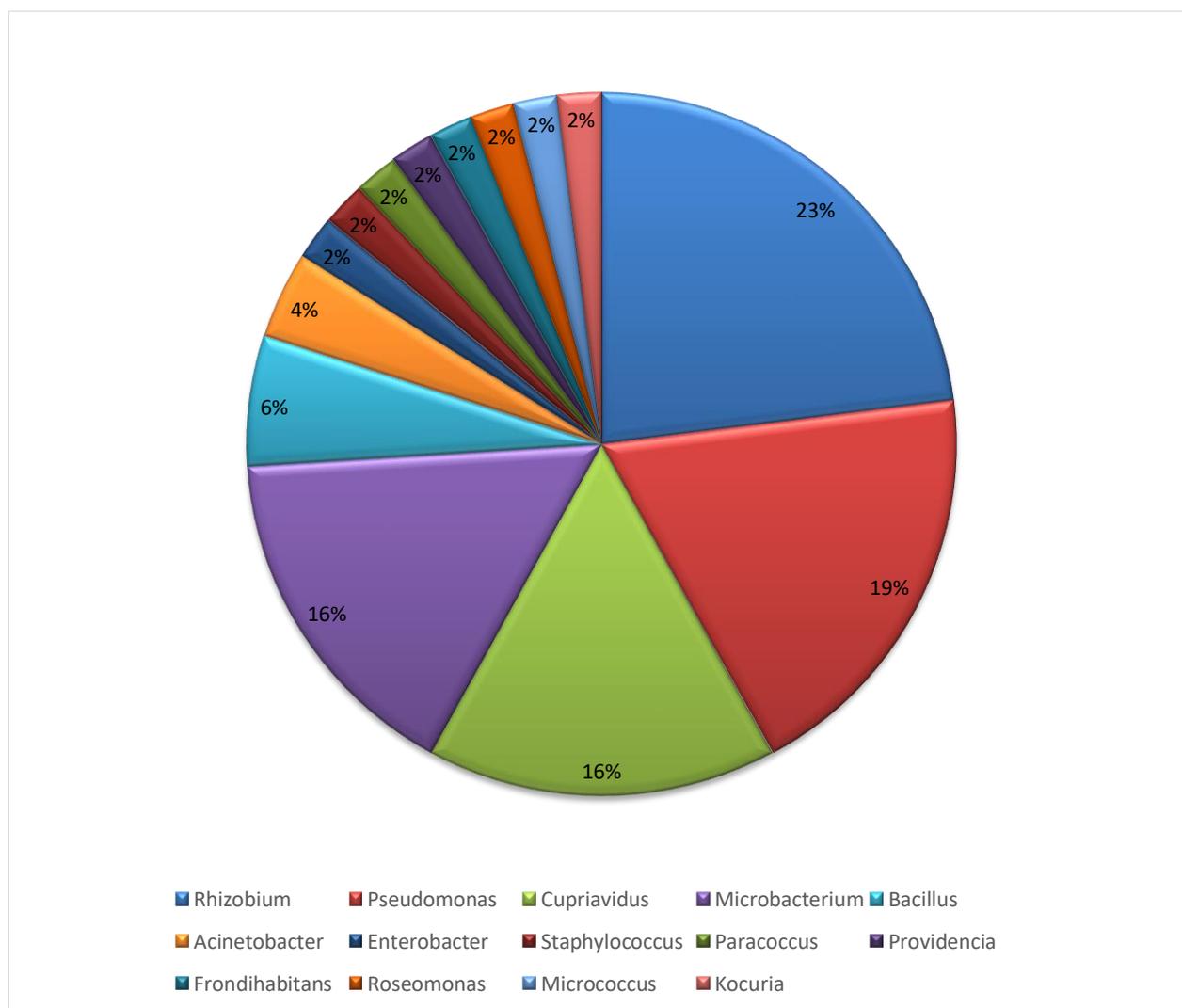


Figure 16. Répartition des isolats bactériens selon leurs genres

L'analyse phylogénétique des isolats de classe α -protéobactéries (Figure 17) montre que onze isolats RSRh01, RSRh02, RSRh03, RSRh04, RSRh05, RSRh06, RSRh07, RSRh08, RSRh09, RSRh10 et RSRh11 sont identiques et partagent une similarité de séquence avec les souches de *Rhizobium* sp. isolées de la légumineuse *Vicia faba*. L'isolat RSRos01 est proche de la souche *Roseomonas vinaceus*. L'isolat RSPar01 est identique à la souche *Paracoccus marcusii*.

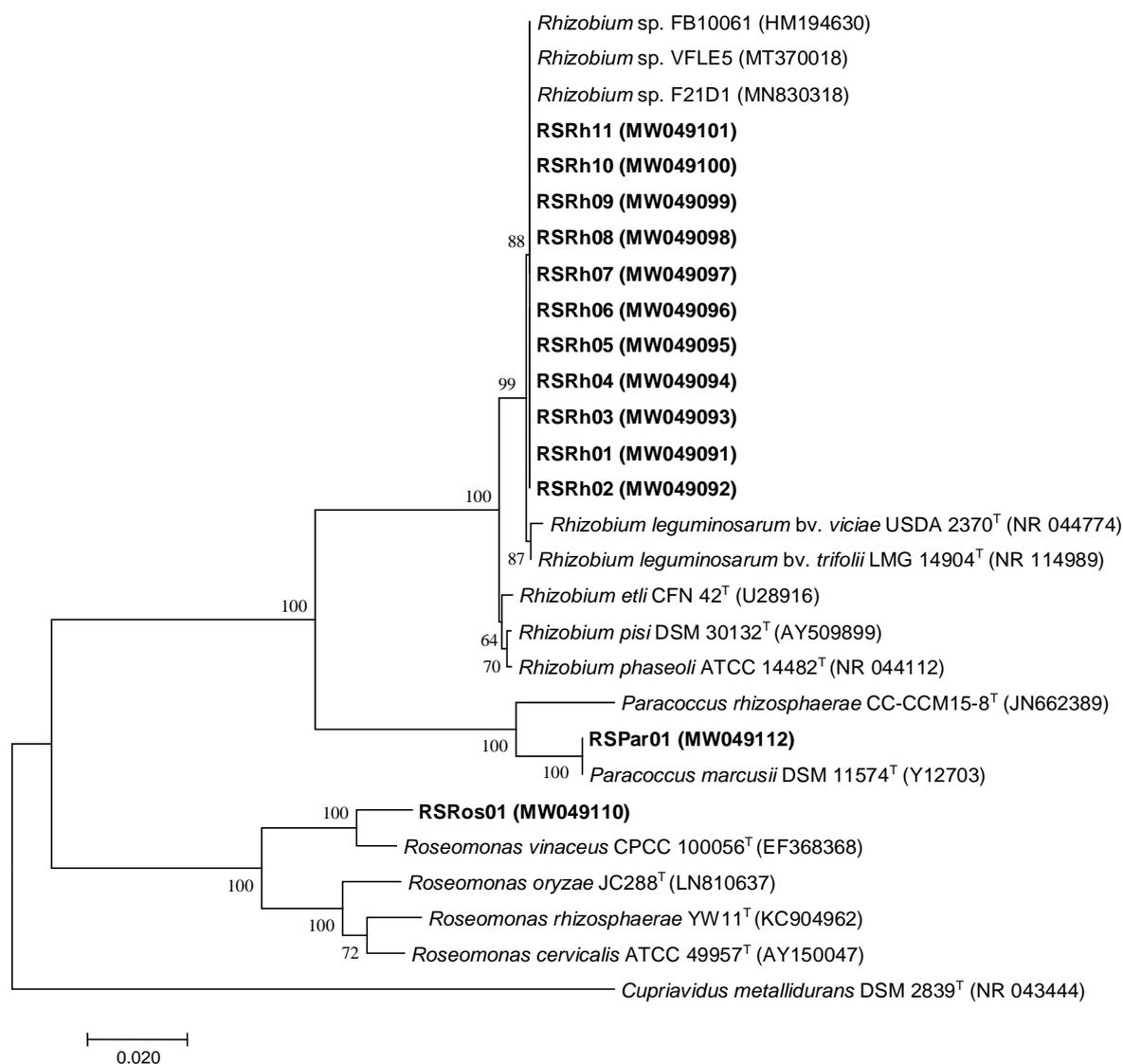


Figure 17. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des souches classe α -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses.

L'analyse phylogénétique des isolats de classe β -protéobactéries (Figure 18) montre que les huit isolats du genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 sont identiques et sont regroupés avec *Cupriavidus paucula*.

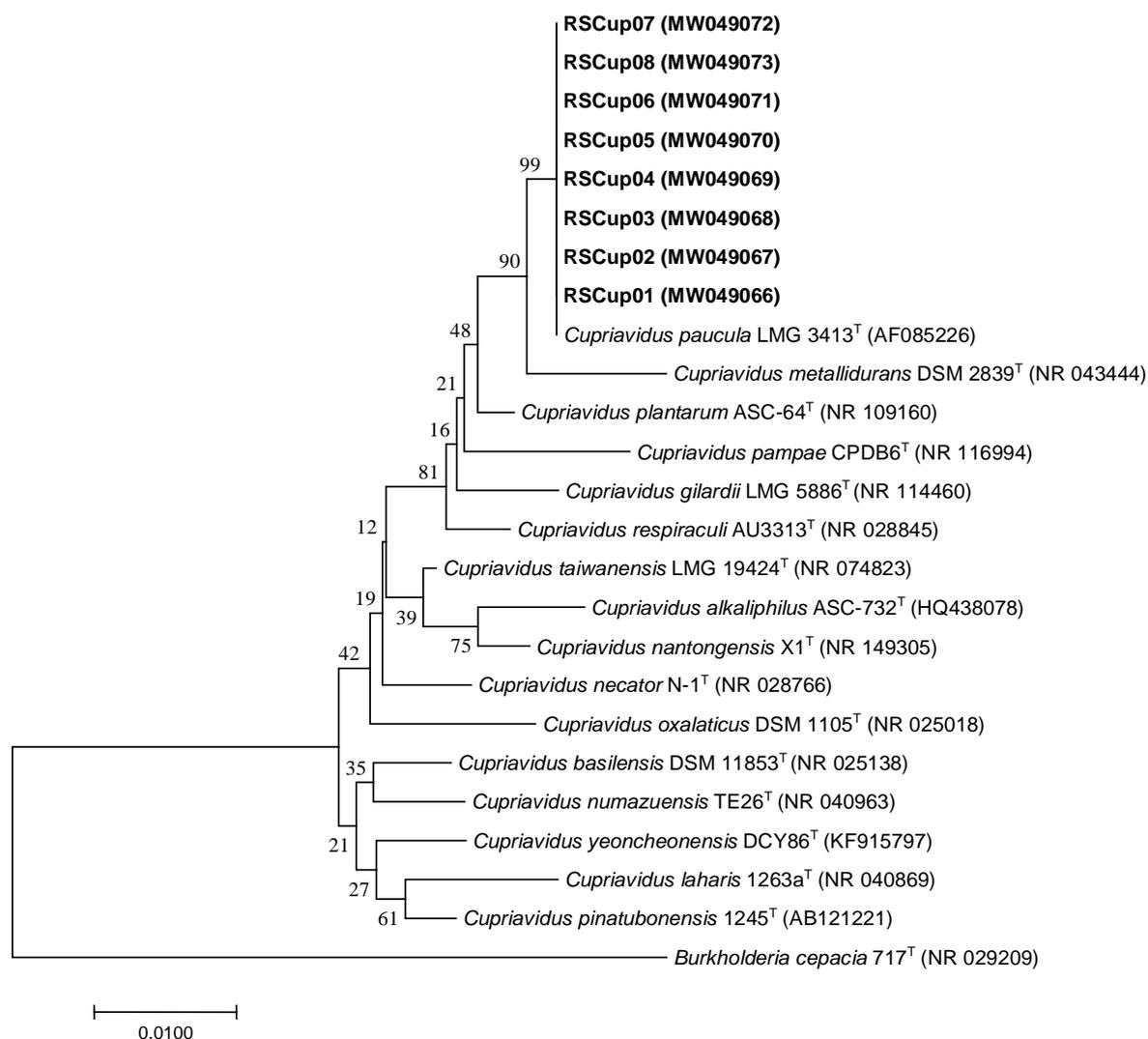


Figure 18. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des souches classe β -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses.

L'analyse phylogénétique des isolats de classe γ -protéobactéries (Figure 19) indique que trois isolats de *Pseudomonas* RSPs03, RSPs04 et RSPs05 sont proches de l'espèce *Pseudomonas frederiksbergensis* et les autres quatre isolats RSPs06, RSPs07, RSPs08 et RSPs09 forment un cluster avec *Pseudomonas thivervalensis*. L'isolat RSPs01 est proche de *Pseudomonas putida* et l'isolat RSPs02 forme un cluster séparé. L'isolat d'*Enterobacter* RSEnt01 est groupé avec *Enterobacter xiangfangensis*. L'isolat RSPro01 forme un groupe avec *Providencia rettgeri*. L'isolat RSAci01 forme une branche avec *Acinetobacter beijerinckii*, mais l'isolat RSAci02 forme un cluster séparé.

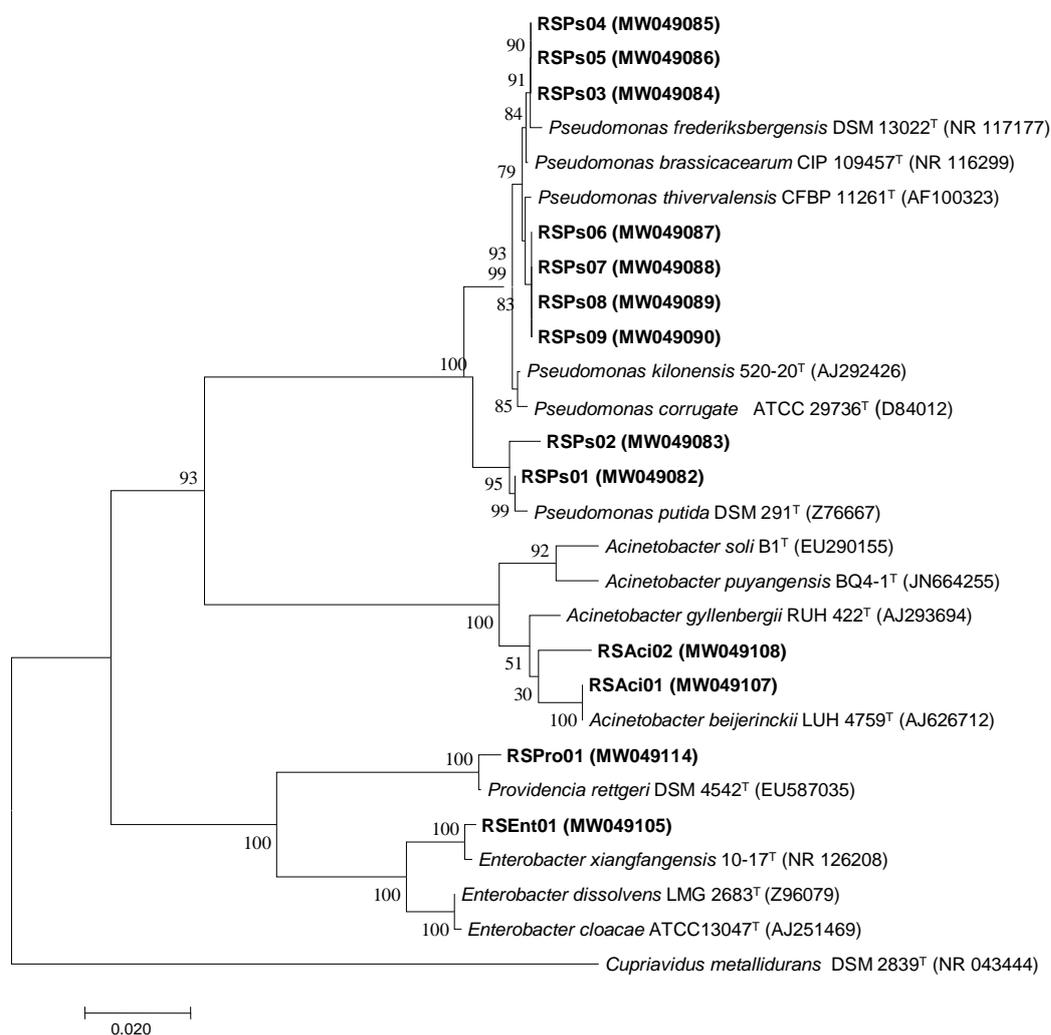


Figure 19. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des souches classe γ -proteobactéries par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses.

L'analyse phylogénétique des isolats de classe Bacilli (Figure 20) montre que les trois isolats du genre *Bacillus* sont divisés en deux groupes, les deux isolats RSBac02 et RSBac03 sont groupés avec *Bacillus niacini*, alors que l'isolat RSBac01 est étroitement lié à *Bacillus licheniformis*. L'isolat RSSta01 est groupé avec *Staphylococcus xylosus*.

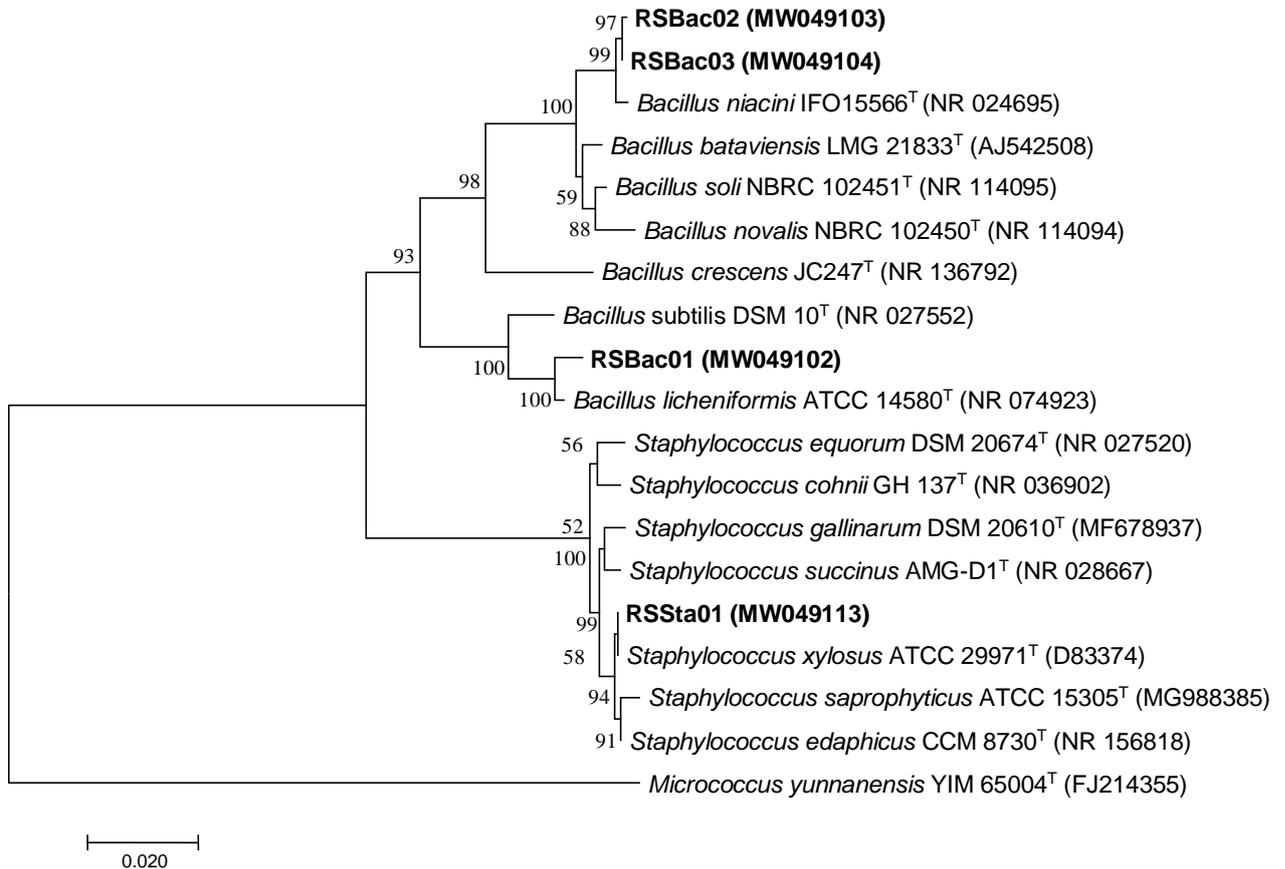


Figure 20. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des souches classe Bacilli par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses.

L'analyse phylogénétique des isolats de classe Actinobactéries (Figure 21) comprennent onze isolats. Tous les isolats appartenant au genre *Microbacterium* RSMic01, RSMic02, RSMic03, RSMic04, RSMic05, RSMic06, RSMic07 et RSMic08 sont regroupés avec *Microbacterium foliorum*. L'isolat RSKoc01 est proche de *Kocuria dechangensis*. L'isolat RSMicc01 est groupé avec *Micrococcus yunnanensis*. L'isolat RSFr01 est proche du genre *Fronidihabitans* mais forme une branche séparée des autres espèces de *Fronidihabitans*.

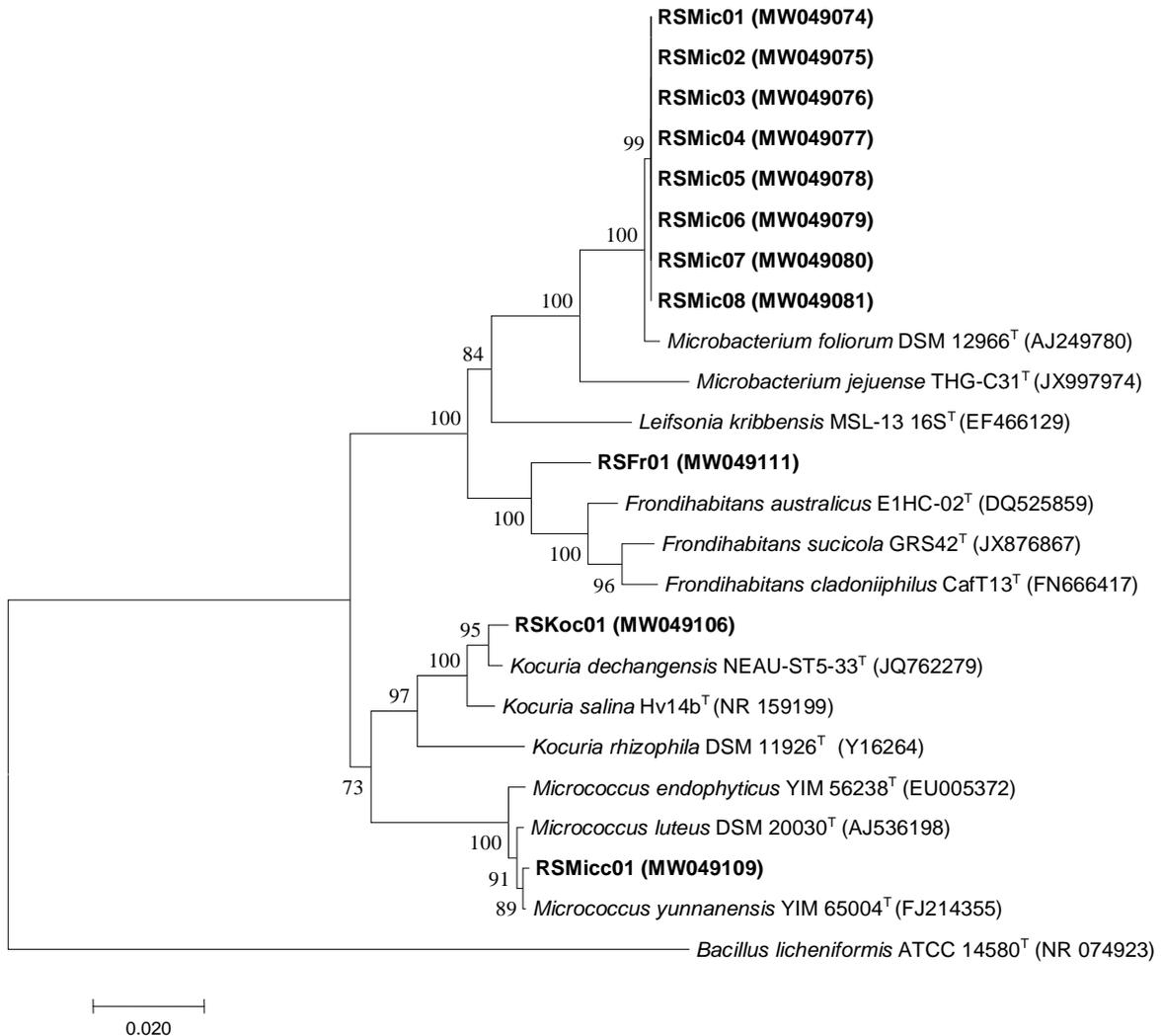


Figure 21. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S (~1400 pb) des souches classe Actinobactérie par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses.

Tableau 9 : Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARNr 16S. Numéros d'accèsion, % d'identité et identification des séquences nucléotidiques nouvellement déterminées

Code des isolats	Code d'accès (Genbank)	Identification BLAST	Identité % (BLAST)
RSCup01	MW049066	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup02	MW049067	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup03	MW049068	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup04	MW049069	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup05	MW049070	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup06	MW049071	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup07	MW049072	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSCup08	MW049073	<i>Cupriavidus paucula</i>	99
		LMG 3413 (AF085226)	
RSMic01	MW049074	<i>Microbacterium</i>	99
		<i>foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	
RSMic02	MW049075	<i>Microbacterium</i>	99
		<i>foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	

Partie III : Résultats et discussion

RSMic03	MW049076	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSMic04	MW049077	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSMic05	MW049078	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSMic06	MW049079	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSMic07	MW049080	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSMic08	MW049081	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 (AJ249780)	99
RSPs01	MW049082	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 (Z76667)	99
RSPs02	MW049083	<i>Pseudomonas</i> sp. MR20 (MN252106)	99
RSPs03	MW049084	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177)	99
RSPs04	MW049085	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177)	99
RSPs05	MW049086	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177)	99
RSPs06	MW049087	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> CFBP	99

Partie III : Résultats et discussion

		11261 (AF100323)	
RSPs07	MW049088	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> CFBP 11261 (AF100323)	99
RSPs08	MW049089	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> CFBP 11261 (AF100323)	99
RSPs09	MW049090	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> CFBP 11261 (AF100323)	99
RSRh01	MW049091	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh02	MW049092	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh03	MW049093	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh04	MW049094	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh05	MW049095	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh06	MW049096	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh07	MW049097	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh08	MW049098	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh09	MW049099	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh10	MW049100	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSRh11	MW049101	<i>Rhizobium</i> sp. F21D1 (MN830318)	99
RSBac01	MW049102	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(NR_074923)	99
RSBac02	MW049103	<i>Bacillus niacini</i>	99

		IFO15566 (NR_024695)	
RSBac03	MW049104	<i>Bacillus niacini</i> IFO15566 (NR_024695)	99
RSEnt01	MW049105	<i>Enterobacter</i> <i>xiangfangensis</i> 10-17 (NR_126208)	99
RSKoc01	MW049106	<i>Kocuria dechangensis</i> NEAU-ST5-33 (JQ762279)	99
RSAct01	MW049107	<i>Acinetobacter</i> <i>beijerinckii</i> LUH 4759 (AJ626712)	99
RSAct02	MW049108	<i>Acinetobacter</i> sp. 4076 (FJ405315)	98
RSMicc01	MW049109	<i>Micrococcus</i> <i>yunnanensis</i> YIM 65004 (FJ214355)	99
RSRos01	MW049110	<i>Roseomonas vinaceus</i> CPCC 100056 (EF368368)	98
RSFr01	MW049111	<i>Fronidhabitans</i> <i>australicus</i> E1HC-02 (DQ525859)	97
RSPar01	MW049112	<i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 (Y12703)	99
RSSta01	MW049113	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 (D83374)	99
RSPro01	MW049114	<i>Providencia rettgeri</i> DSM 4542 (EU587035)	99

2. 2. Analyses phylogénétiques du gène *nodC*

Pour évaluer la diversité symbiotique des isolats de *Rhizobium* sp., le gène *nodC* est séquencé et un arbre phylogénétique (NJ) est construit (Figure 22). L'arbre phylogénétique

montre que les isolats RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 et RSRh08 sont regroupés en deux groupes distincts correspondant aux symbiovars trifolii. Dans le premier clade, le *nodC* des isolats RSRh01 et RSRh04 montre une affinité étroite avec le *nodC* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* V-7A et TT-7A, avec 99% d'identité de séquence. Dans le deuxième clade, les deux isolats RSRh03 et RSRh06 sont similaires à *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM 1689 avec un support bootstrap de 95%, tandis que les isolats RSRh07 et RSRh08 sont proches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T-1.

Aucune amplification du gène *nodC* n'est obtenue des isolats RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 et RSRh011 identifiés comme *Rhizobium* sp. et ce même après plusieurs tentatives en utilisant différents types d'amorces et différentes conditions d'amplification.

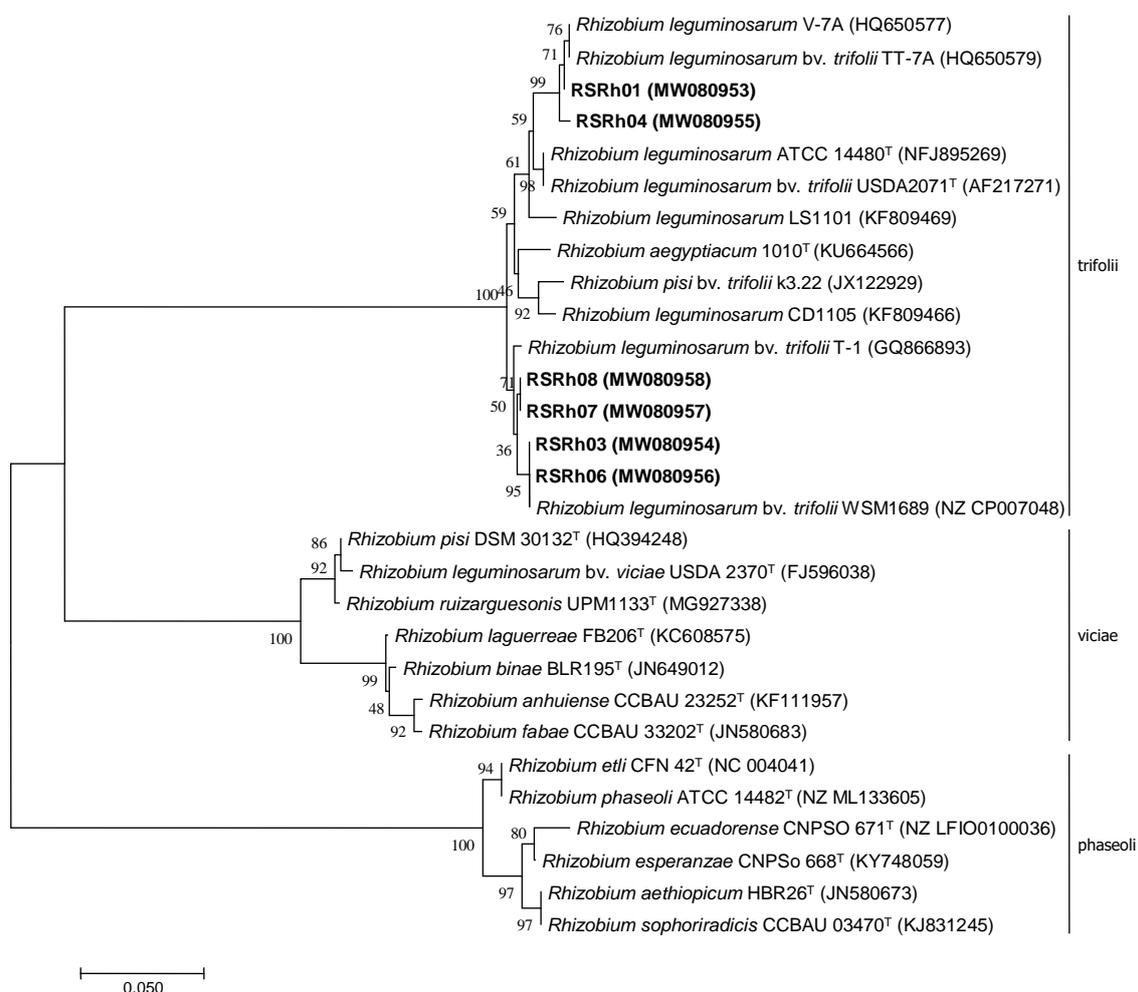


Figure 22. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène *nodC* (900 pb) par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches.

2. 3. Analyses phylogénétiques du gène *nifH*

Pour vérifier la capacité potentielle de fixation d'azote de nos isolats, le gène *nifH* est analysé. Les séquences des isolats RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 et RSRh08 forment une branche indépendante et sont regroupés avec la souche *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 avec une valeur bootstrap de 95% (Figure 23).

L'analyse phylogénétique du gène de fixation de l'azote *nifH* confirme la phylogénie *nodC* et la classification des isolats dans le symbiovar *trifolii*.

Aucune amplification du gène *nifH* n'est obtenue pour les isolats RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 et RSRh011 et ce en utilisant différents types d'amorces et différentes conditions d'amplification.

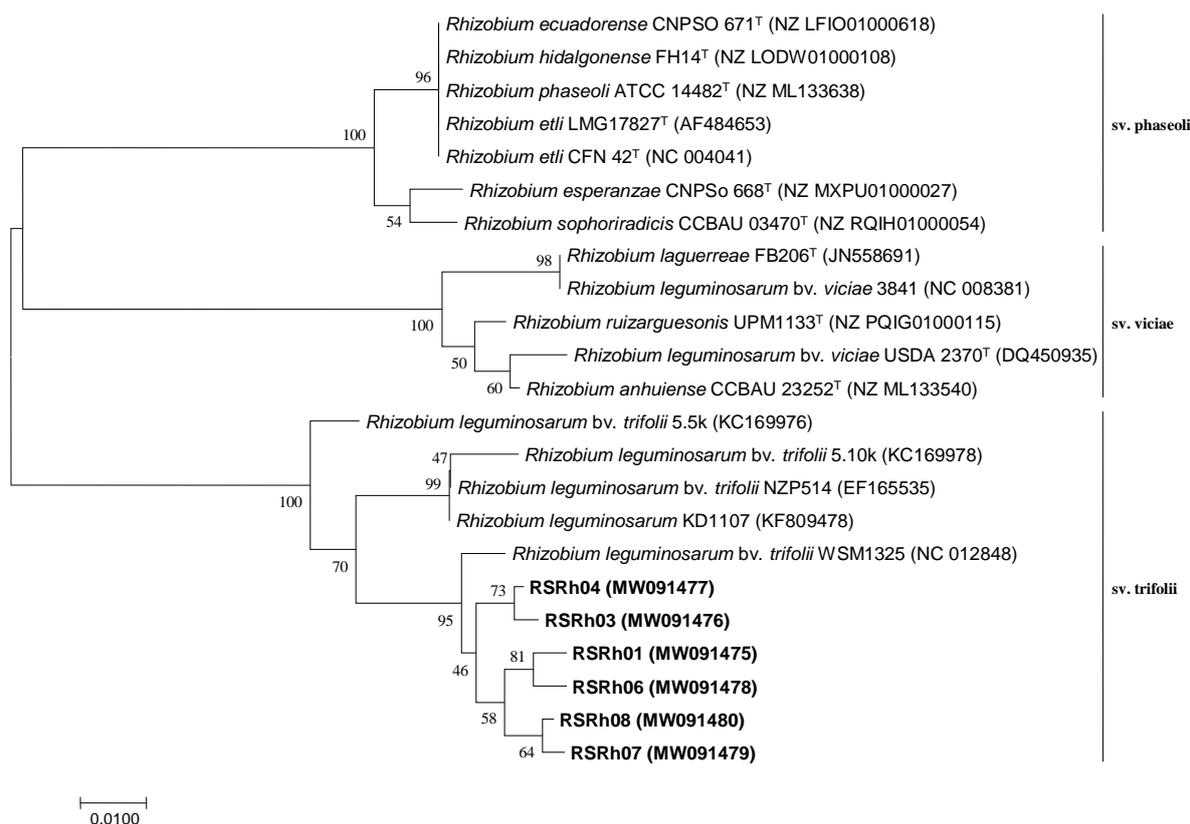


Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène *nifH* (500 pb) par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches.

2. 4. Discussion

Les racines des plantes interagissent avec un grand nombre de microorganismes différents et le fonctionnement des symbioses associatives plantes-bactéries dans les sols pollués par les métaux lourds peut être affecté tant du côté des bactéries que de la plante hôte. La diversité des microorganismes change en fonction de l'écosystème et leur évolution génétique leur permettant de s'adapter aux changements environnementaux et de survivre (**Borowik et al. 2017**).

Dans la présente étude, on cherche à explorer la diversité des rhizobactéries associés aux nodules de *Trifolium* sp. dans un sol minier. De multiples bactéries sont isolées ; 77.5% étant des endophytes et 22.5% des rhizobia.

L'analyse comparative des séquences du gène d'ARNr 16S montre que les isolats rhizobia sont similaires aux espèces *Rhizobium* sp. isolées des nodules de plantes *Vicia faba* L. poussant dans différentes régions du monde (**Missbah El Idrissia et al. 2020 ; Efstathiadou et al. 2020**). **Efstathiadou et al. (2020)** ont rapporté que ces nouveaux isolats avec des fonds chromosomiques similaires peuvent être trouvés dans différents pays et écosystèmes. Selon nos travaux, les isolats de *Rhizobium* sp. sont des microsymbiontes dominants dans les nodules de *Trifolium* sp. récoltés d'un sol minier en Algérie. Cependant, des recherches supplémentaires, telles que le séquençage du génome entier ou des gènes de ménage (Housekeeping genes), sont nécessaires pour préciser l'identification de ces isolats, qui pourraient être de nouvelles espèces.

Il est connu que plusieurs espèces de *Trifolium* sont nodulées par différentes espèces rhizobiennes (**Shamseldin et al. 2016 ; Efroze et al. 2018**). **Zhang et al. (2016)** ont démontré que *Rhizobium anhuiense*, initialement isolé de *Vicia faba* et *Pisum sativum*, a été défini comme un microsymbionte dominant de *Trifolium repens* en Chine. De même, *Rhizobium aethiopicum* est une espèce rhizobienne identifiée comme microsymbionte de *Trifolium alexandrinum* en Égypte, bien qu'elle ait été isolée à l'origine de *Phaseolus vulgaris* (**Youseif et al. 2020**).

Les espèces *Rhizobium aegyptiacum*, *Rhizobium aethiopicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. et *Agrobacterium fabacearum* sont connues comme microsymbiontes du trèfle (**Efroze et al. 2018 ; Youseif et al. 2020**). L'identification de *Rhizobium* sp. comme seul rhizobia dans notre étude implique que les espèces rhizobiennes

associées au trèfle sont affectées par le stress des métaux lourds influençant leur diversité. Similaire à nos résultats **Oleńska et Malek (2015)** ont montré que des concentrations élevées de métaux lourds peuvent fortement affecter la diversité rhizobienne symbiotique de *Trifolium repens* isolée des sols miniers. La contamination des sols par les métaux lourds est un facteur limitant de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses (**Ahmad et al. 2012**), elle a un impact sur la survie et la croissance des bactéries dans la rhizosphère et inhibe le processus d'infection ou affecte le métabolisme des nodules (**Andrés et al. 2012**). Une autre explication de ces résultats est que les dommages aux racines dus aux métaux lourds affectent les réponses des légumineuses aux facteurs Nod et donc affectent directement la formation des nodules en diminuant le nombre des nodules et non la population rhizobienne (**Hao et al. 2014**).

De plus, notre étude montre que les nodules sont également colonisés par de nombreux endophytes comme *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Fronidhabitans*, *Paracoccus* et *Roseomonas*. Ces bactéries sont considérées comme des opportunistes, car elles peuvent infecter les nodules lorsque les rhizobia induisent la formation de nodules (**Ibáñez et al. 2009 ; Leite et al. 2017**). Certains endophytes peuvent favoriser la croissance des plantes et sont considérés comme des PGPR (**Saïdi et al. 2013**) tel que les *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Providencia* et *Micrococcus* (**Basu et al. 2021**).

Nos résultats concordent avec l'étude d'**Oleńska et al. (2020)** qui ont montré plus d'une espèce de non-rhizobia endophytes dans les nodules de *Trifolium repens*. Certains endophytes signalés dans cette étude ont déjà été isolés à partir de nodules racinaires de légumineuses collectés dans des sols miniers, tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cupriavidus* et *Enterobacter* (**Fan et al. 2018 ; Oleńska et al. 2020**).

Cependant, les autres genres identifiés dans ce travail, y compris *Paracoccus*, *Staphylococcus*, *Kocuria* et *Acinetobacter* sont décrits comme endophytes dans certains tissus de plantes légumineuses dans des sols pollués (**Barzanti et al. 2007 ; Sun et al. 2010 ; Oleńska et al. 2020**).

Par conséquent, la présente étude montre qu'une grande diversité de genres bactériens endophytes est simultanément isolée des mêmes nodules racinaires de plantes *Trifolium* y compris les rhizobia, offrant la possibilité de révéler la corrélation entre les rhizobia et les endophytes et leurs habitats.

La prédominance des isolats endophytes est attribuée au genre *Pseudomonas*, ce résultat confirme le travail effectué par **Cardoso et al. (2018)** qui ont signalé que le genre *Pseudomonas* était l'un des genres les plus dominants dans les nodules racinaires de plusieurs espèces de légumineuses. En outre, *Pseudomonas* est communément classé comme un endophyte bactérien des plantes, et est couramment trouvé dans un environnement pollué et pourrait tolérer de fortes concentrations de métaux lourds (**Fan et al. 2018 ; Abdelkrim et al. 2019**). Une étude récente d'**Oleńska et al. (2020)** a rapporté que les bactéries du genre *Pseudomonas* se trouvent dans les nodules de *Trifolium repens* présent dans des zones contaminées par le Pb-Zn.

Les deux genres les plus prédominants dans notre étude après les *Pseudomonas* sont *Cupriavidus* et *Microbacterium* ; ces genres sont signalés comme des bactéries du sol et aussi des endophytes de nombreuses plantes se développant dans des sols contaminés par des métaux lourds. **Román-Ponce et al. (2016)** ont rapporté que le genre *Microbacterium* est la bactérie endophyte la plus dominante trouvée dans la plante *Brassica nigra* isolée de la mine de Pb-Zn-Ag. Quant au genre *Cupriavidus*, il est connu pour son abondance dans les environnements contaminés par les métaux lourds (**Shi et al. 2020**).

Des études récentes ont rapporté que les espèces végétales et les conditions du sol, ont un effet substantiel sur la structure spécifique des populations microbiennes (**Yang et al. 2018 ; Borymski et al. 2018**). L'influence des espèces végétales a été clairement démontrée dans plusieurs études, notamment *Triarrhena sacchariflora*, *Cynodon dactylon*, *Silene vulgaris*, *Poa annua* L., *Artemisia annua* L., *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis halleri* et *Trifolium repens* L. (**Borymski et al. 2018 ; Yang et al. 2018**). Chaque plante agit comme un véritable filtre de micro-organismes et structure les micro-organismes de sa rhizosphère en sélectionnant certaines bactéries dans ses nodules racinaires qui la soutiennent en cas de stress environnemental, y compris les métaux lourds (**Pieterse et al. 2014 ; Etesami et Beattie 2017, 2018**). Les plantes peuvent créer un environnement spécifique pour les microbes qui pourraient être adaptés pour survivre dans des concentrations élevées de métaux et bénéficier des plantes par la disponibilité accrue de nutriments (**Etesami et Beattie 2017**).

Les gènes symbiotiques sont généralement utilisés pour la mise en évidence des relations symbiotiques entre les espèces. Nos isolats bactériens sont testés, avec la détection des gènes *nodC* et *nifH* pour démontrer la présence de ces gènes comme indicateur de leur potentiel symbiotique.

L'arbre phylogénétique du gène de nodulation *nodC* et du gène de fixation de l'azote *nifH* montre que les souches RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 et RSRh08 appartiennent au symbiovar *trifolii* et partagent des similarités de séquences des gènes *nodC* et *nifH* avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Une comparaison des gènes *nodC* de nos isolats avec ceux d'autres souches nodulant différentes espèces de légumineuses sur différents continents, provenant de zones métallifères et non métallifères, montre qu'ils forment deux clusters distincts.

L'haplotype A (Clade 1) est identique à *R. leguminosarum* symbiote dans *Trifolium uniflorum* et *Trifolium subterraneum* isolés de Grèce et d'Espagne respectivement.

L'haplotype B (Clade 2) est proche de *Rhizobium leguminosarum* V-7A et TT-7A isolé de *Vicia sativa* et *Trifolium tomentosum* respectivement, se développant dans des sols fortement contaminés par le mercure (Hg) en Espagne. **Young et al. (2021)**, ont signalé que les séquences des gènes de nodulation des trois symbiovars, *viciae*, *trifolii* et *phaseoli* sont très distinctes, mais qu'il existe également un polymorphisme au sein de chaque symbiovar.

Concernant, les autres rhizobia, les gènes de symbiose n'ont pas pu être amplifiés bien que différents couplet d'amorces sont utilisés. Nos résultats concordent avec ceux d'**Aserse et al. (2013)** qui ont isolé des bactéries du genre *Rhizobium* mais n'ont pas réussi à amplifier les gènes *nodC* et *nifH*. Ceci pourrait résulter d'un mésappariement nucléotidique entre les gènes, des amorces non spécifiques pour l'amplification, ou de l'absence des gènes *nodC* et *nifH* dans les isolats RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 et RSRh011.

3. Criblage des rhizobactéries à traits PGPR

3. 1. Solubilisation du phosphate

La capacité de tous les isolats à solubiliser le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est étudiée sur le milieu de culture solide PVK. Sur l'ensemble des 49 isolats testés, 21 isolats (42.85%) sont capables de solubiliser le phosphate inorganique (Tableau 10). La solubilisation est traduite par la présence d'un halo clair autour des colonies des isolats. La variation du diamètre des halos montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate entre les différents isolats testés.

Les résultats de la figure 24 montrent que les isolats testés sont répartis en 3 groupes selon le diamètre du halo produit. Ainsi, on distingue un groupe de deux isolats présentant des diamètres de 12 mm ; un deuxième groupe à capacité moyenne de solubilisation du P constitué de sept isolats présentant des halos de diamètres compris entre 4 et 10 mm et un troisième groupe est qui constitué de 12 isolats à très faible capacité solubilisatrice du phosphate avec des diamètres des halos inférieurs à 4 mm (Figure 24).

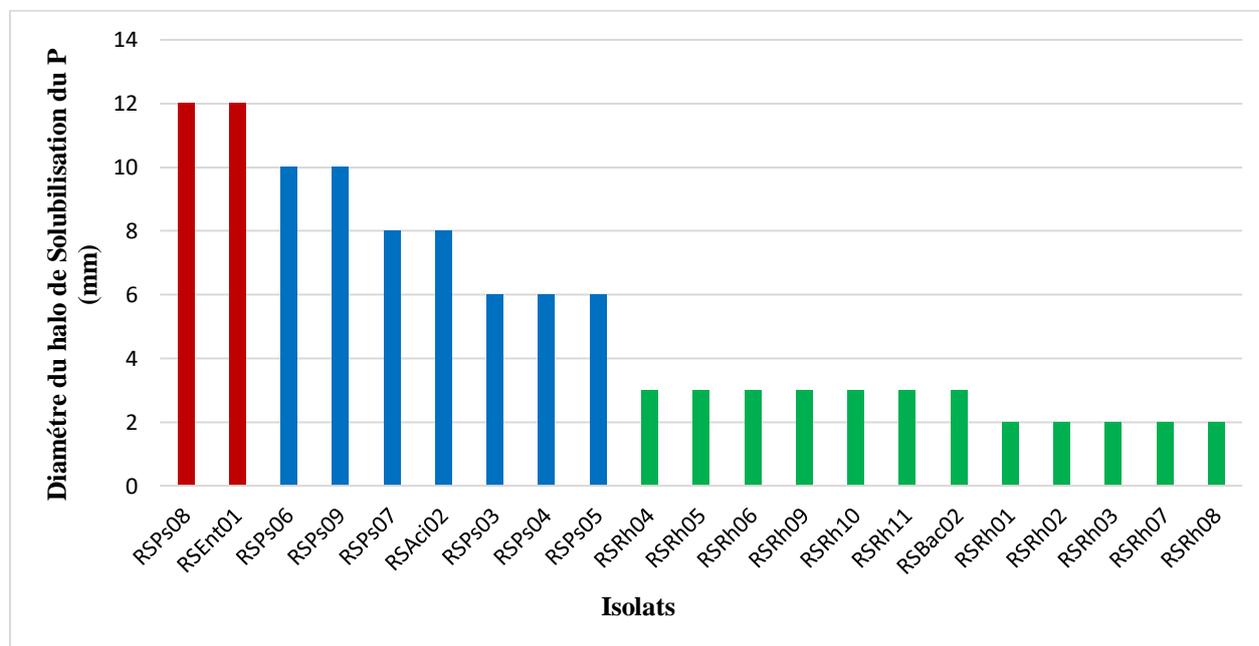


Figure 24. Diamètre de l'halo de la solubilisation du phosphate des isolats bactériens

3. 2. Production de sidérophore

La capacité des isolats à produire les sidérophores est démontrée par le développement d'un halo orange autour des colonies indiquant la production des sidérophores (Figure 25).

Ce test permet, à l'aide d'un indicateur coloré (le chromazuro1) complexant le fer, de mettre en évidence, par changement de coloration, la présence d'un complexant à plus forte affinité pour le fer. Lorsqu'un chélateur puissant élimine le fer du colorant, sa couleur passe du bleu à l'orange.

Les résultats montrent que parmi ces isolats testés il y'a une différence significative au niveau de la capacité de la production des sidérophores entre les différents isolats (Tableau 10).

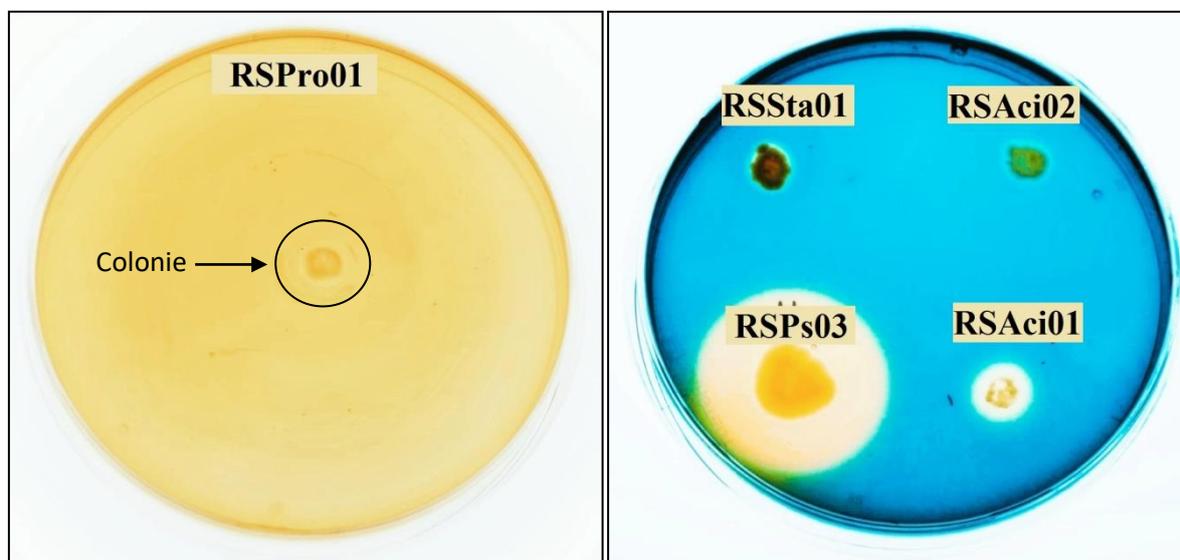


Figure 25. Production de sidérophore par les isolats bactériens

Sur 49 isolats, 31 (63.26%) sont capables de produire les sidérophores. Cette capacité est évaluée en fonction du diamètre de l'halo orange autour des colonies bactériennes. Selon **Dimpka et al. (2008)** la capacité de production des sidérophores est classée en 3 catégories. La première catégorie décrite comme faible (diamètre : 4-10mm), la deuxième comme modérée (11-20mm), la troisième comme forte (supérieur à 21mm). Parmi les isolats producteurs de sidérophores, 10 isolats ont une forte production dont la meilleure production est détectée pour l'isolat RSPro01 avec un diamètre égal à 75 mm, 3 isolats ont une production modérée et 18 isolats ont une faible production (Figure 26).

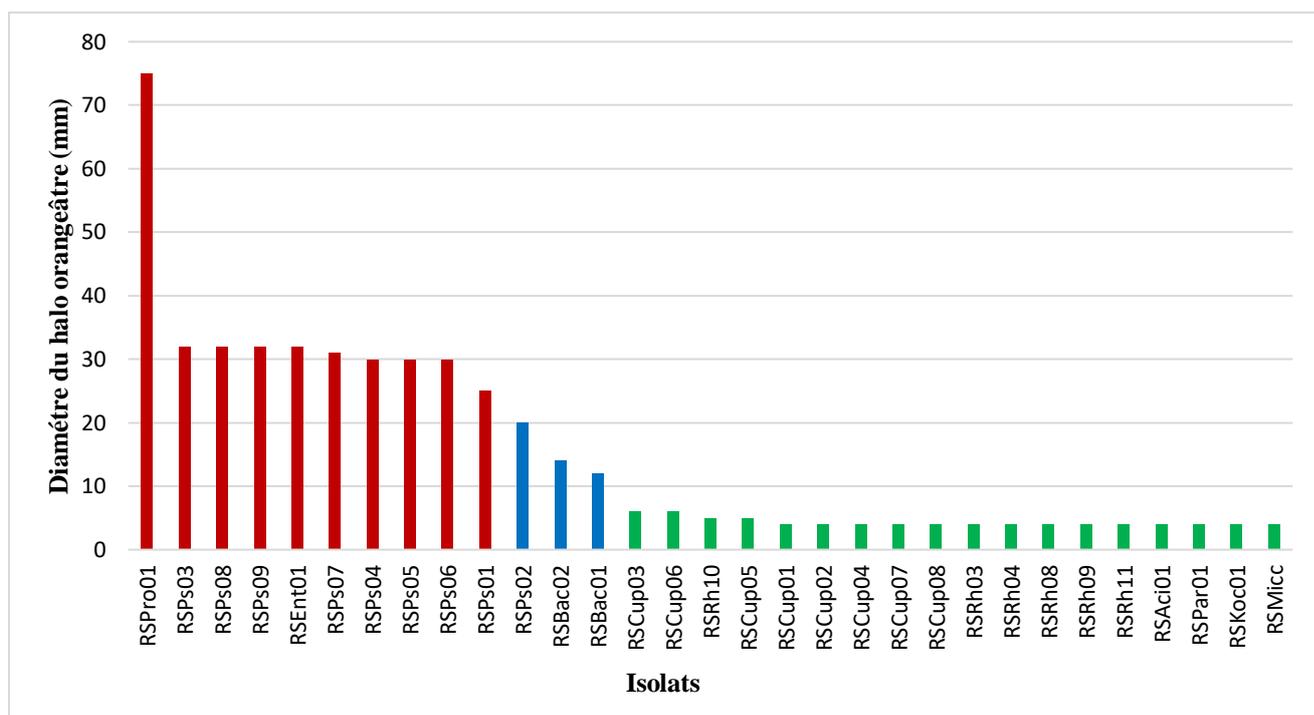


Figure 26. Diamètre de l'halo orangéâtre autour des colonies

Tableau 10 : Criblage des isolats bactériens à traits PGPR

Code des isolats	Enzyme extracellulaires					Production de siderophores	Solubilisation du phosphate	Activité antifongique	
	Estérase	Caseinase	Amylase	Uréase	Cellulase			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
RSRh01	-	-	-	+	+	-	+	-	NT
RSRh02	-	-	-	+	+	-	+	-	NT
RSRh03	-	-	-	+	+	+	+	+	-
RSRh04	-	-	-	+	+	+	+	+	-
RSRh05	-	-	-	+	+	-	+	++	NT
RSRh06	-	-	-	+	+	-	+	-	-
RSRh07	-	-	-	+	+	-	+	++	-
RSRh08	-	-	-	+	+	+	+	+	-
RSRh09	-	-	-	+	+	+	+	-	+/-
RSRh10	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
RSRh11	-	-	-	+	+	+	+	-	-
RSCup01	+	+	-	+	+	+	-	+++	+
RSCup02	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT
RSCup03	+	+	-	+	+	+	-	+++	+
RSCup04	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT
RSCup05	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT

Partie III : Résultats et discussion

RSCup06	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT
RSCup07	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT
RSCup08	+	+	-	+	+	+	-	+++	NT
RSPs01	+	-	(+/-)	+	+	+++	-	+++	+
RSPs02	-	-	-	+	+	++	-	+++	+
RSPs03	+	-	(+/-)	+	+	+++	++	+++	+
RSPs04	+	-	-	+	+	+++	++	+++	NT
RSPs05	+	-	-	+	+	+++	++	+++	NT
RSPs06	+	-	-	+	+	+++	++	+++	NT
RSPs07	+	-	-	+	+	+++	++	+++	+
RSPs08	+	-	-	+	+	+++	+++	+++	NT
RSPs09	+	-	-	+	+	+++	++	+++	NT
RSBac01	+	-	-	-	-	++	-	-	+
RSBac02	+	-	+	-	-	++	-	-	+
RSBac03	+	-	-	+	-	-	+	++	+
RSMic01	-	-	+	-	+	-	-	+++	+
RSMic02	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSMic03	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSMic04	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSMic05	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSMic06	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSMic07	-	-	+	-	+	-	-	+++	+
RSMic08	-	-	+	-	+	-	-	+++	NT
RSAc01	+	+	-	+	+	+	-	+++	+
RSAc02	+	+	-	-	+	-	++	+++	+
RSPro01	+	-	(+/-)	+	+	+++	-	+++	+
RSEnt01	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+
RSSta01	-	-	(+/-)	+	+	-	-	+++	+/-
RSPar01	+	-	(+/-)	-	+	+	-	+++	+/-
RSKoc01	+	-	-	+	+	+	-	++	+
RSFr01	+	-	+	-	+	-	-	-	-
RSRos01	+	-	-	+	+	-	-	++	+/-
RSMicc01	+	-	-	+	-	+	-	-	-

(+++) Réaction forte ; (++) Réaction moyenne ; (+) Réaction faible ; (+/-) Réaction suspicieuse ; (NT) Non testé

3. 3. Activité enzymatique

3. 3. 1. Uréase

La mise en évidence de la capacité des isolats à hydrolyser l'urée est réalisée en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Les résultats obtenus pour les 49 isolats testés sont rapportés dans le tableau 10. 73,46% des isolats (36/49) ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions ammonium (Figure 27-A).

3. 3. 2. Cellulase

Les résultats montrent que la production de cellulase est observée chez 91,83% des isolats (45/49), les colonies apparaissant sur un fond rouge entourés d'un halo orangé ce qui met en évidence l'activité endogluconasique (Figure 27-B). Cette enzyme leur permet d'hydrolyser la cellulose qui représente le constituant fibreux de la paroi végétale, c'est ainsi que les bactéries pénètrent plus facilement et infectent les racines des plantes.

3. 3. 3. Caséinase

La recherche d'activité protéolytique réalisée nous a permis de mettre en évidence la capacité des isolats à hydrolyser la caséine, les résultats montrent que seulement 10 isolats (20,40%) ont une réaction protéolytique avec l'apparition d'un halo clair autour des colonies dû à la dégradation de la caséine (Figure 27-C).

3. 3. 4. Amylase

L'évaluation de la capacité de l'ensemble des isolats à hydrolyser l'amidon montre qu'après addition de la solution de Lugol diluée, la production d'amylase est révélée uniquement chez 30,61% des isolats testés (15/49) avec l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Figure 27-D). Cependant certains isolats montrent une faible activité amylolytique en formant des zones d'hydrolyse réduites (Tableau 10).

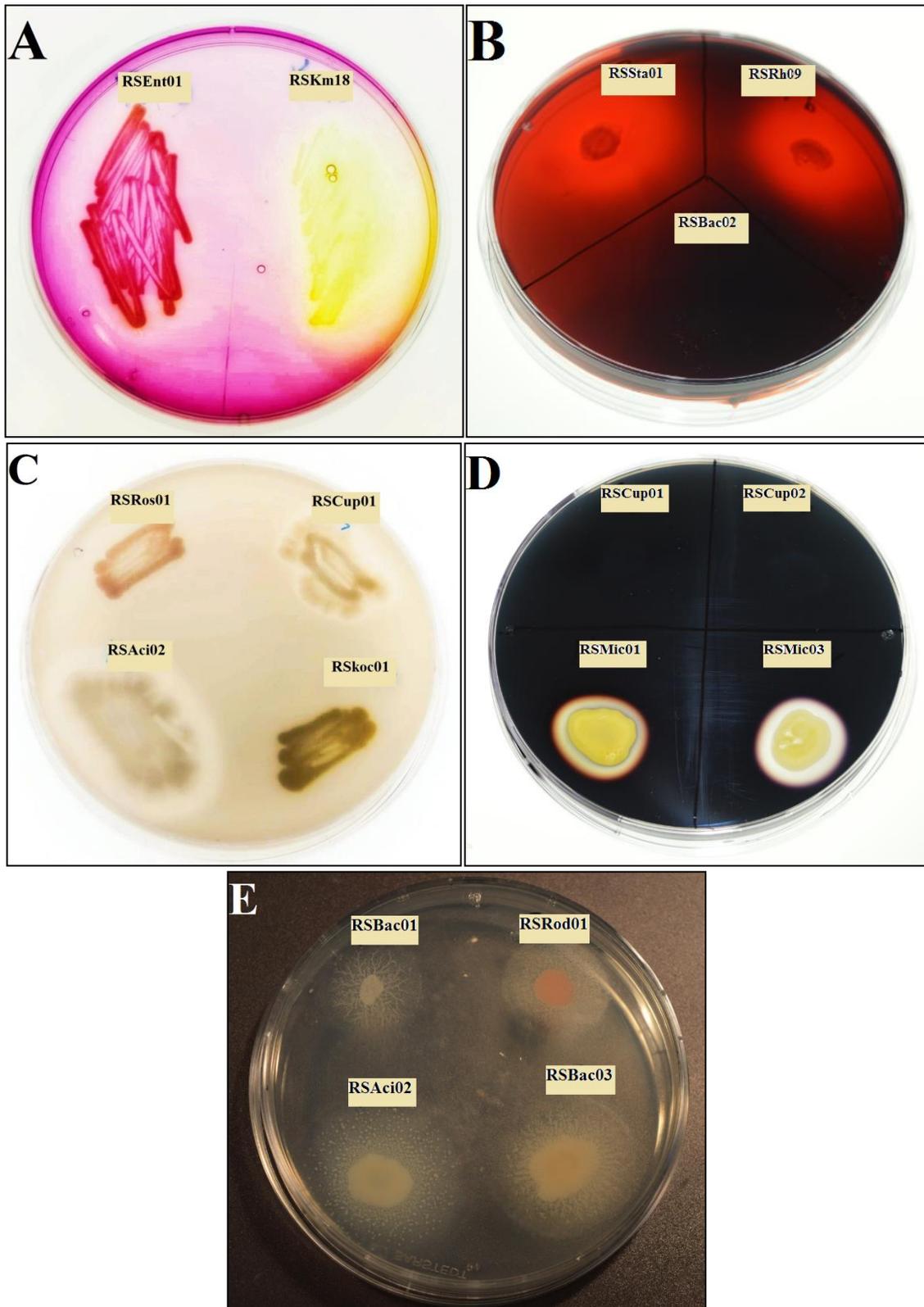


Figure 27. Activités enzymatiques des isolats bactériens

A- Activité uréasique, **B-** Activité cellulolytique, **C-** Activité protéique, **D-** Activité amylolytique, **E-** Activité estérasique.

3. 3. 5. Estérase

Les résultats obtenus montrent que l'activité estérasique est observée chez 55,10 % des isolats (27/49) (Tableau 10), avec l'apparition d'un précipité observé autour des colonies indiquant une production estérasique due à la libération hydrolytique des acides gras du Tween 20 et leur précipitation sous forme de sels de calcium (Figure 27-E).

Nos résultats montrent que tous nos isolats sont capables de produire au moins une activité enzymatique et certains d'entre eux ont au moins 4 des 5 propriétés enzymatiques testées.

3. 4. Activité antifongique

3. 4. 1. *In vitro*

L'étude de l'activité antifongique des isolats sélectionnés est mise en évidence *in vitro* par la mesure de la zone d'inhibition du champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* inoculé sur le milieu PDA (Figure 28).

Les résultats obtenus montrent que la majorité des isolats ont une action inhibitrice sur la souche fongique (Tableau 10). Sur l'ensemble des 49 isolats testés, 32 sont fortement inhibiteurs avec un maximum d'index d'inhibition marqué pour l'isolat RSAci1 qui atteint 40%, 4 isolats le sont modérément et 4 isolats sont faiblement inhibiteurs. Le plus faible pourcentage de taux d'inhibition est obtenu avec l'isolat RSRh04 avec 15% (Figure 29).

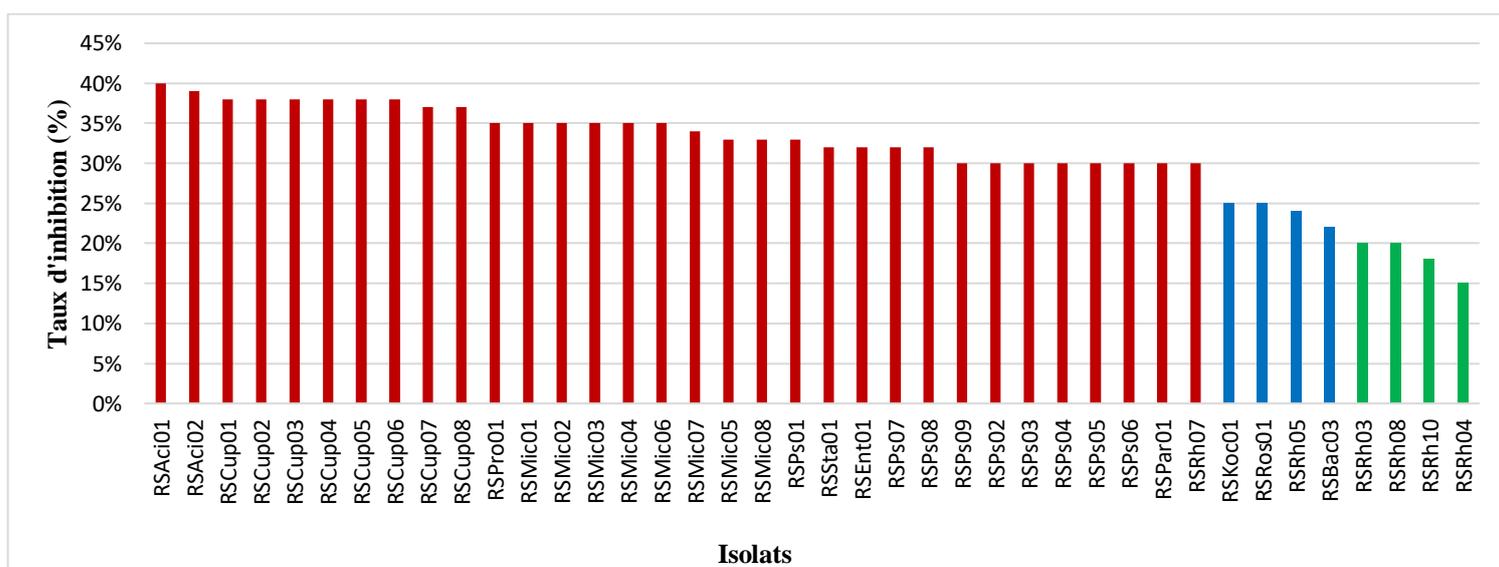


Figure 28. Index d'inhibition des isolats bactériens contre *Sclerotinia sclerotiorum*

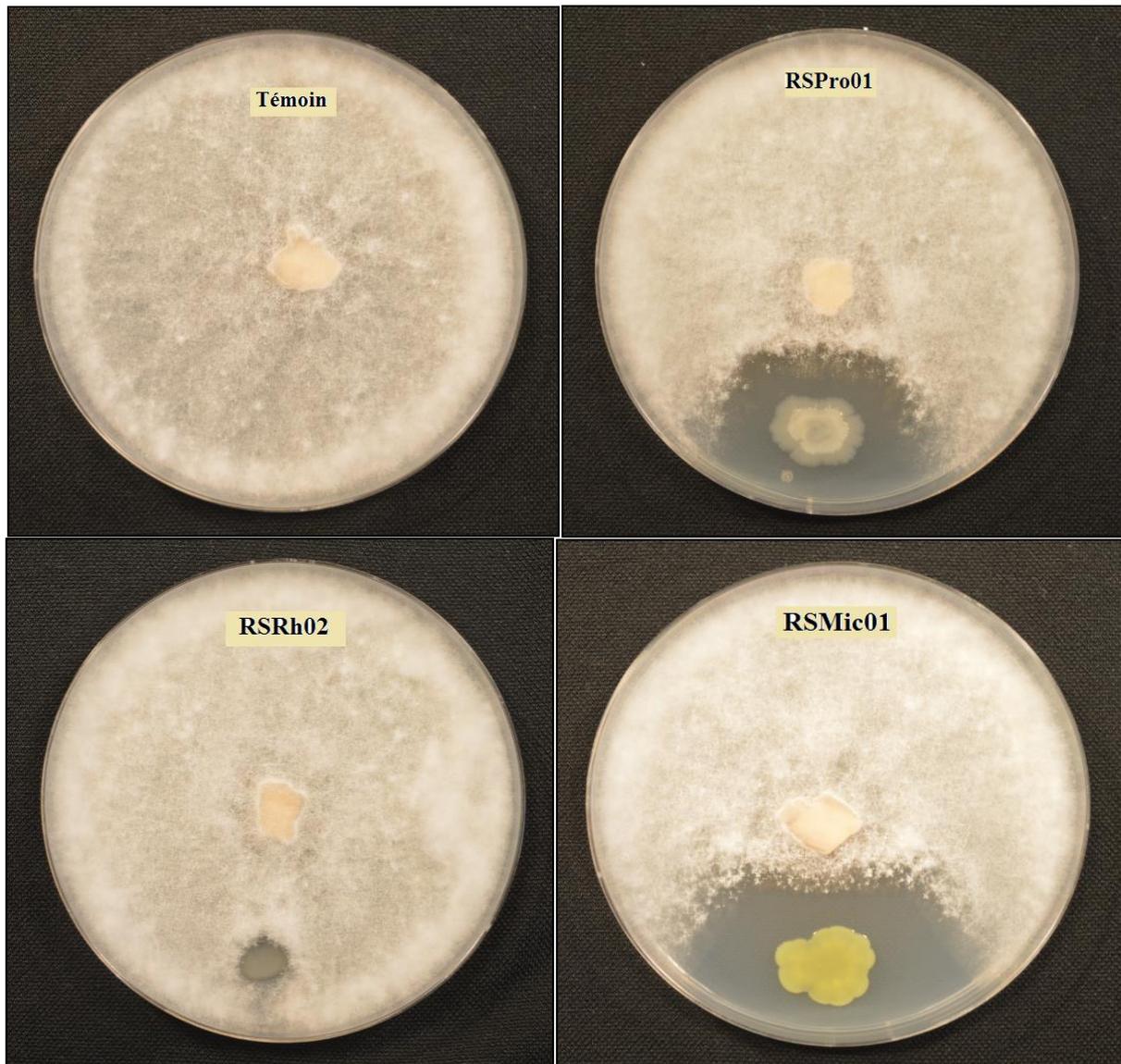


Figure 29. Activité antifongique des isolats bactériens *in vitro*

3. 4. 2. *In vivo*

L'étude de l'effet protecteur *in vivo* des isolats sélectionnés est mise en évidence par inoculation des isolats sur les racines des plants de *Medicago truncatula* via une confrontation directe avec l'agent phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum*. L'activité de biocontrôle est évaluée toute les 24 heures dans des conditions de croissance contrôlées. Les résultats obtenus après 6 jours montrent que le lot « Agent phytopathogène + isolat » révèle un faible développement de l'agent phytopathogène dans les racines par rapport au lot « Témoin », ce qui montre l'activité antifongique des isolats promotrices de la croissance des plantes (Figure 30).

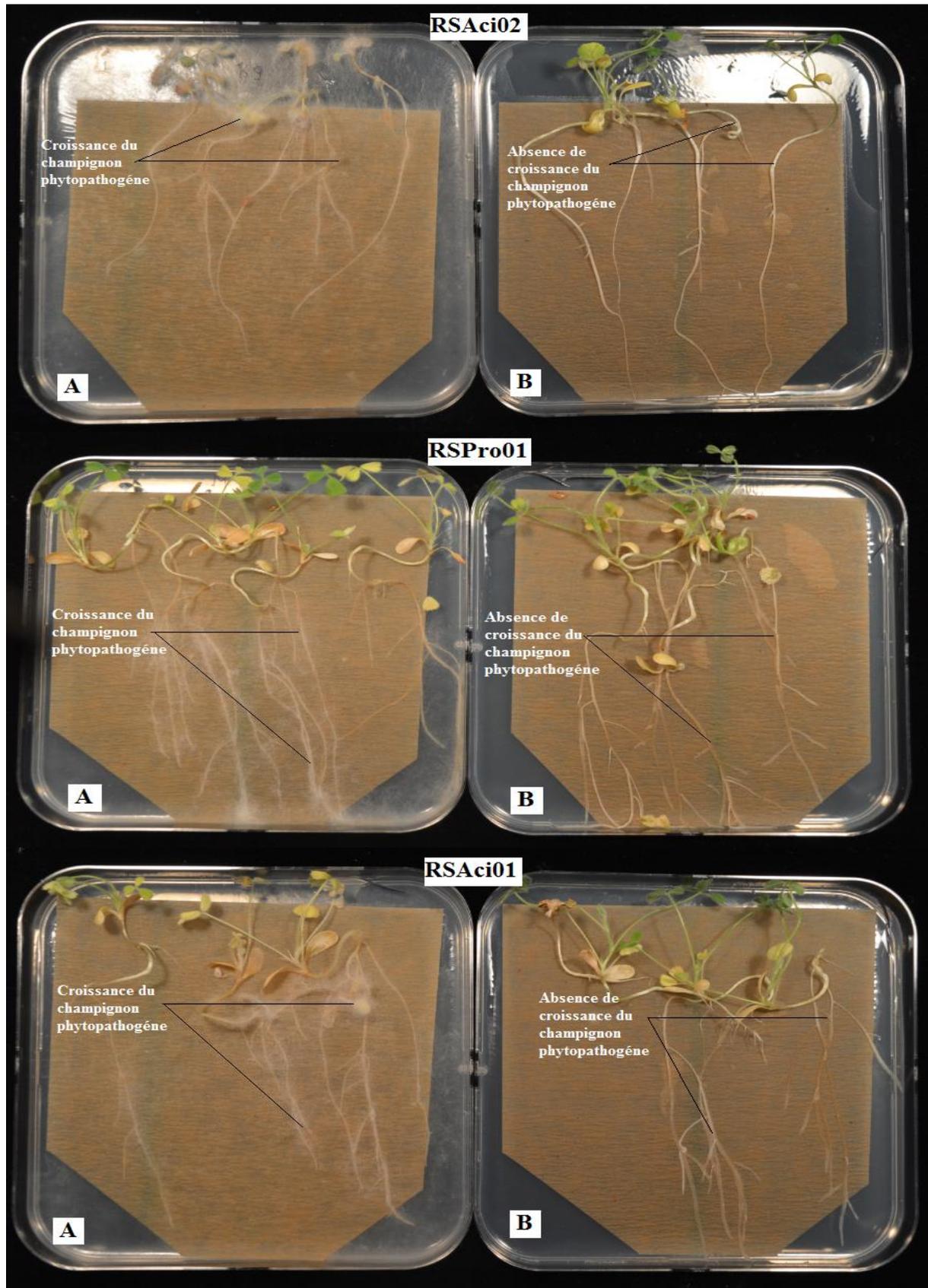


Figure 30. Activité antifongique des isolats bactériens *in vivo*.

A- Agent pathogène témoin, **B-** Agent pathogène + isolat

3. 5. Discussion

L'importance des rhizobactéries dans la résistance aux métaux lourds et leur capacité à favoriser la croissance de la plante hôte dans un environnement contaminé par des métaux en font le choix privilégié pour les études de phytoremédiation (**Etesami 2018**). Pour cette raison les caractéristiques favorisant la croissance des plantes, telles que la production de siderophores, de molécules antifongiques, d'enzymes extracellulaires et la solubilisation du phosphate minéral ont été étudiées plus en détail.

Les PGPR englobent de nombreux genres bactériens (**Hassan et al. 2019**) et sont dans notre travail, affiliées aux genres de *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Providencia*, *Staphylococcus*, *Microbacterium* et *Micrococcus*.

Le phosphate (P) existe sous une forme insoluble, que les plantes ne peuvent pas utiliser directement à partir du sol. Cependant, certaines bactéries jouent un rôle important dans la solubilisation du P, par la sécrétion d'enzymes (phosphonates, phosphatases et C-P lyases) et d'acides organiques (acide citrique, acide lactique, acide gluconique), qui transforment le P insoluble en une forme soluble (**Glick 2012**). Dans des conditions de déficience en P, certains isolats résistants aux métaux lourds ; facilitent la mobilisation du P en sécrétant des phytases extracellulaires, ce qui améliore la disponibilité des nutriments dans la région rhizosphérique soumise à un stress dû aux métaux lourds (**Arif et al. 2017**).

Le test de solubilisation du phosphate inorganique montre que seulement 21 parmi les 49 isolats sont capables de solubiliser le P inorganique et avec une variation des diamètres des halos. Des résultats similaires ont été rapportés en confirmant que les bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetaobacter* et *Rhizobium* sont très efficaces dans la solubilisation des formes complexes du phosphate insoluble.

Plusieurs études ont déjà mentionné que la solubilisation du phosphate est détectée chez les bactéries du genre *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas* (**Sbabou et al. 2016 ; Ye et al. 2020**). D'autres ont également montré que certaines souches d'*Acinetaobacter* et *Enterobacter* sont capables de solubiliser le phosphate (**Benidire et al. 2016 ; Joyati and Priyabrata 2018 ; Ferchichi et al. 2019**).

Les sidérophores sont des protéines chélatrices de fer à haute affinité qui jouent un rôle essentiel grâce à leur capacité à atténuer la toxicité des métaux lourds en se liant avec ces

éléments toxiques (**Etesami et Maheshwari 2018**). La majorité des isolats testés appartenant aux différents genres ont la capacité de produire des sidérophores, ce qui n'est pas surprenant puisque les α , β , γ -protéobactéries, bacilles, actinobactéries associées aux plantes ont la capacité de produire des sidérophores sous une faible disponibilité en fer (**Tian et al. 2009**).

Nos résultats montrent que la plus forte production de siderophore est obtenue par les isolats qui appartiennent au genre *Providencia*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Diverses études ont signalé que des espèces du genre *Pseudomonas* produisent des sidérophores (**Patel et Archana 2017 ; Ferchichi et al. 2019 ; Ye et al. 2020**) ; il est rapporté par certains chercheurs que le genre *Providencia* présente une forte capacité de production des sidérophores (**Rana et al. 2011**). Une meilleure production de sidérophores a été également détectée chez *Enterobacter* sp. isolée des sols miniers (**Ferchichi et al. 2019**).

La production d'enzymes extracellulaires est un autre caractère important des PGPR qui influence indirectement la croissance des plantes. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur l'activité de ces enzymes chez les bactéries associées à des plantes tolérantes aux métaux lourds.

Notre étude montre que tous nos isolats bactériens sont capables de produire au moins une activité enzymatique. La production de cellulase est la plus courante parmi les isolats (91,83 %), suivie de l'uréase (73,46 %), de l'estérase (55,10 %), de l'amylase (30,61 %), et enfin l'activité protéasique qui est limitée à quelques isolats seulement (20,40 %). Ces résultats suggèrent que la colonisation des plantes par les rhizobia et les endophytes est étroitement liée à leur capacité à produire des enzymes extracellulaires.

Selon **Jha et Kumar (2007)**, la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire est un mécanisme important pour la colonisation des bactéries. Ces enzymes lytiques microbiennes sont également connues pour leur rôle dans l'antagonisme contre différents champignons phytopathogènes en dégradant la composition de leurs parois cellulaires (**Siddiqui 2006**). **Tsegaye et al. (2019)** ont constaté que le PGPR qui synthétise une ou plusieurs de ces enzymes extracellulaires à une capacité de biocontrôle contre une série de champignons et de bactéries pathogènes pour les plantes et améliore le rendement des cultures.

Nos résultats montrent que les isolats appartenant aux genres *Cupriavidus*, *Pseudomonas* et *Actinetobacter* ont au moins 4 des 5 propriétés enzymatiques testées. Des

travaux similaires ont montré que les genres *Cupriavidus*, *Pseudomonas* et *Actinobacter* isolés à partir de diverses plantes appartenant à la famille *Poaceae* étaient capables de produire des enzymes extracellulaires *in vitro* (Patel et Archana 2017). La production des enzymes extracellulaires est une propriété commune chez le groupe des *Pseudomonas* présents dans le sol minier (Pereira et al. 2014, 2015).

Nos résultats montrent également la capacité de 40 isolats à inhiber *Sclerotinia sclerotiorum*. Ce champignon peut infecter de nombreuses espèces de plantes cultivées dans le monde entier (Boland et Hall 1994). Il infecte les organes végétaux, tels que les gousses, les feuilles et les tiges à différents stades de développement, en pénétrant directement dans la plante ou en l'envahissant par la pénétration d'un site de blessure (Gerlagh et al. 1999 ; Kuang et al. 2011).

De manière intéressante, dans notre collection bactérienne, quatre isolats affiliés aux genres *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Acinetobacter* et *Providencia* montrent une forte activité antifongique contre ce phytopathogène. Notre recherche a mis en évidence l'effet bénéfique de ces isolats à explorer dans le processus de biocontrôle des maladies de pourriture des racines dans les cultures des *Trifolium*. L'inhibition des phytopathogènes par les bactéries endophytes peut être expliquée par la compétition avec les agents pathogènes pour la niche/substrat écologique (Zhao et al. 2018).

L'activité antifongique de nos isolats contre le champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* pourrait être fortement liée aux substances inhibitrices. Yuan et al. (2012) ont noté que les composés volatils produits par les bactéries a réduit la croissance du mycélium et inhibé la germination des spores de *Fusarium oxysporum*.

Les résultats de cette étude montrent également que la plupart des isolats bactériens résistants aux métaux lourds ont de multiples traits PGP. Ces bactéries peuvent être utilisées pour améliorer la croissance et la résistance des légumineuses de *Trifolium* dans des conditions de stress aux métaux lourds.

4. Etude de la tolérance des isolats bactériens aux stress métallique et salin

4. 1. Tolérance aux métaux lourds

4. 1. 1. Sur milieu solide

4. 1. 1. 1. Résistance des isolats au plomb (Pb)

Le plomb est le métal le moins toxique car même à très forte concentration, la croissance des isolats n'est pas affectée (Figure 31). Tous les isolats poussent à des concentrations de 25 jusqu'à 400 $\mu\text{g/ml}$. Tandis que 78 et 38% des isolats se développent à des concentrations de 600 jusqu'à 700 $\mu\text{g/ml}$ et 800 jusqu'à 1000 $\mu\text{g/ml}$ respectivement et 18% seulement des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07, RSCup08 et *Pseudomonas putida* RSPs01 résistent jusqu'à 1300 $\mu\text{g/ml}$.

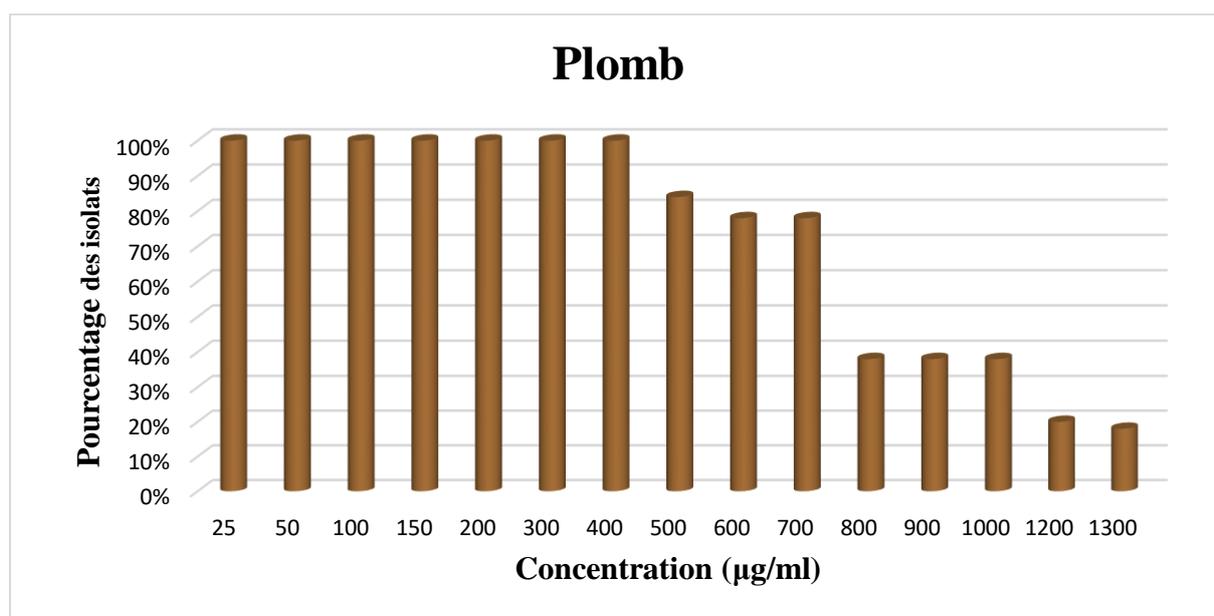


Figure 31. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de plomb

4. 1. 1. 2. Résistance des isolats au zinc (Zn)

Une importante croissance est observée en présence de zinc (Figure 32). En effet, tous les isolats poussent à des concentrations de 25 jusqu'à 50 $\mu\text{g/ml}$. Alors que 94, 74 et 28% des isolats se développent à des concentrations de 100, 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivement et uniquement 16% des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03,

RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 résistent à des concentrations qui varient de 600 jusqu'à 1200 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 33).

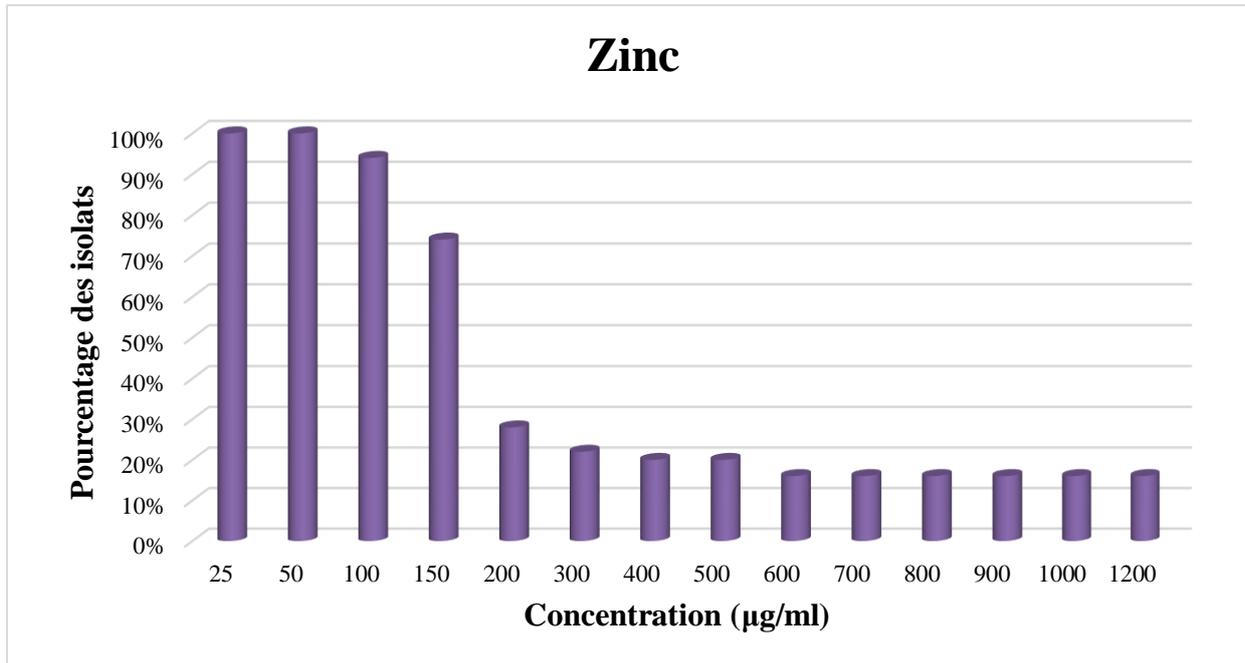


Figure 32. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de zinc



Figure 33. Résistance des isolats bactériens à 1200 $\mu\text{g/ml}$ de zinc sur milieu solide

4. 1. 1. 3. Résistance des isolats au nickel (Ni)

L'ensemble des isolats résistent à des concentrations très élevées en nickel jusqu'à 100 µg/ml sans aucune inhibition de la croissance. Tandis que 64, 28 et 18 % des isolats se développent à des concentrations de 150, 200 et 400 µg/ml respectivement et uniquement 16% des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 résistent à des concentrations qui varient de 500 jusqu'à 1000 µg/ml (Figure 34).

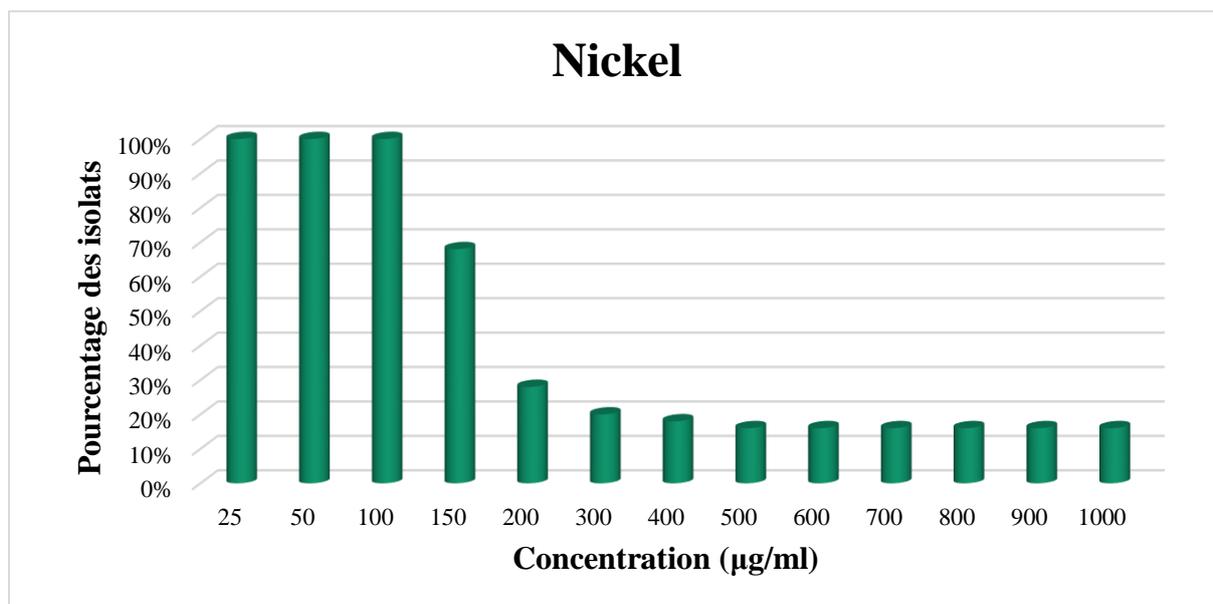


Figure 34. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de nickel

4. 1. 1. 4. Résistance des isolats au cadmium (Cd)

La croissance des isolats est plus au moins faible en présence de cadmium (Figure 35). En effet, 90% des isolats poussent à la plus faible concentration 25 µg/ml. Alors que 82, 54 et 28% des isolats se développent à des concentrations de 50, 100 et 200 µg/ml respectivement et uniquement 16% des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 résistent à des concentrations qui varient entre 300 jusqu'à 1000 µg/ml (Figure 36).

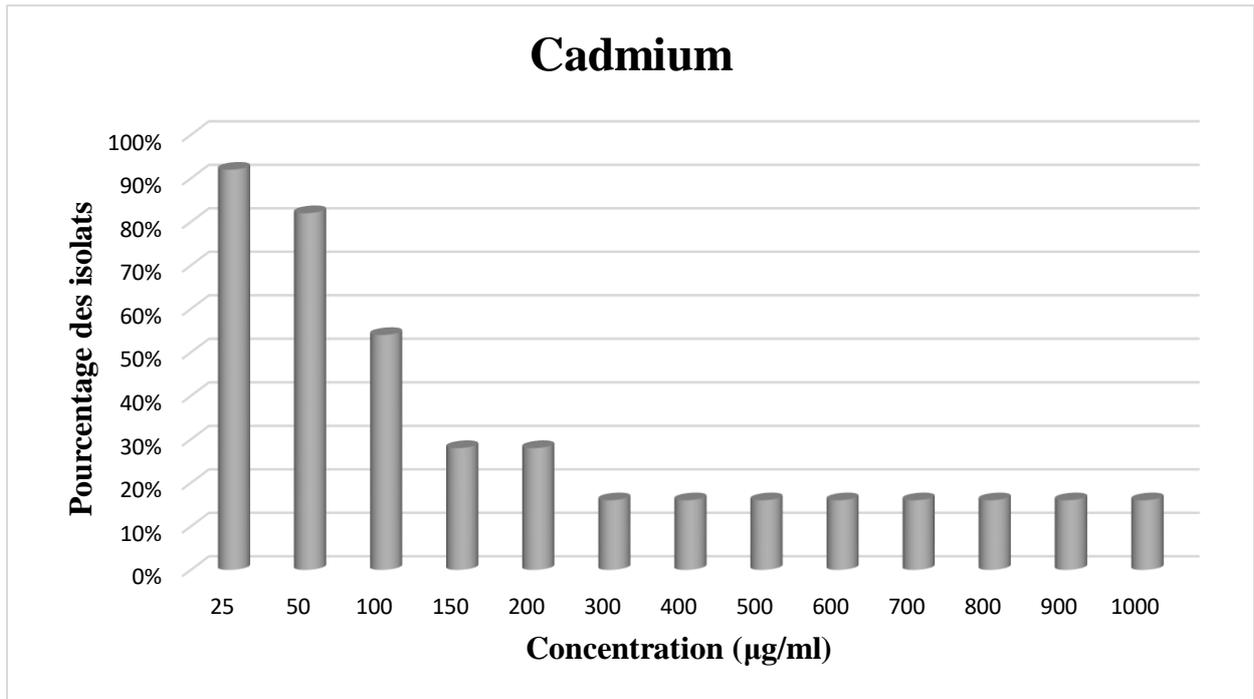


Figure 35. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cadmium

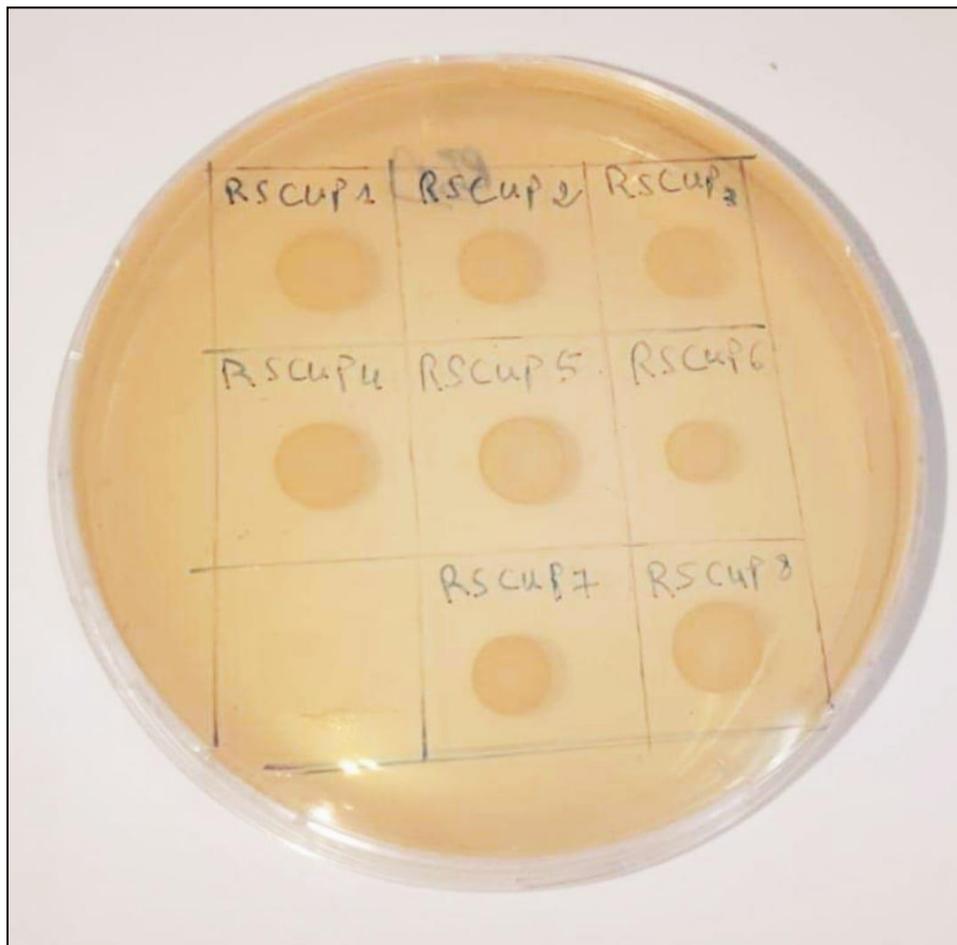


Figure 36. Résistance des isolats bactériens à 1000 µg/ml de cadmium sur milieu solide

4. 1. 1. 5. Résistance des isolats au cuivre (Cu)

La résistance au cuivre montre que 100% des isolats poussent à des concentrations jusqu'à 50 µg/ml. Tandis que 88, 54 et 22% des isolats se développent jusqu'à des concentrations de 100, 200 et 300 µg/ml respectivement et 16% des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 résistent jusqu'à 500 µg/ml (Figure 37).

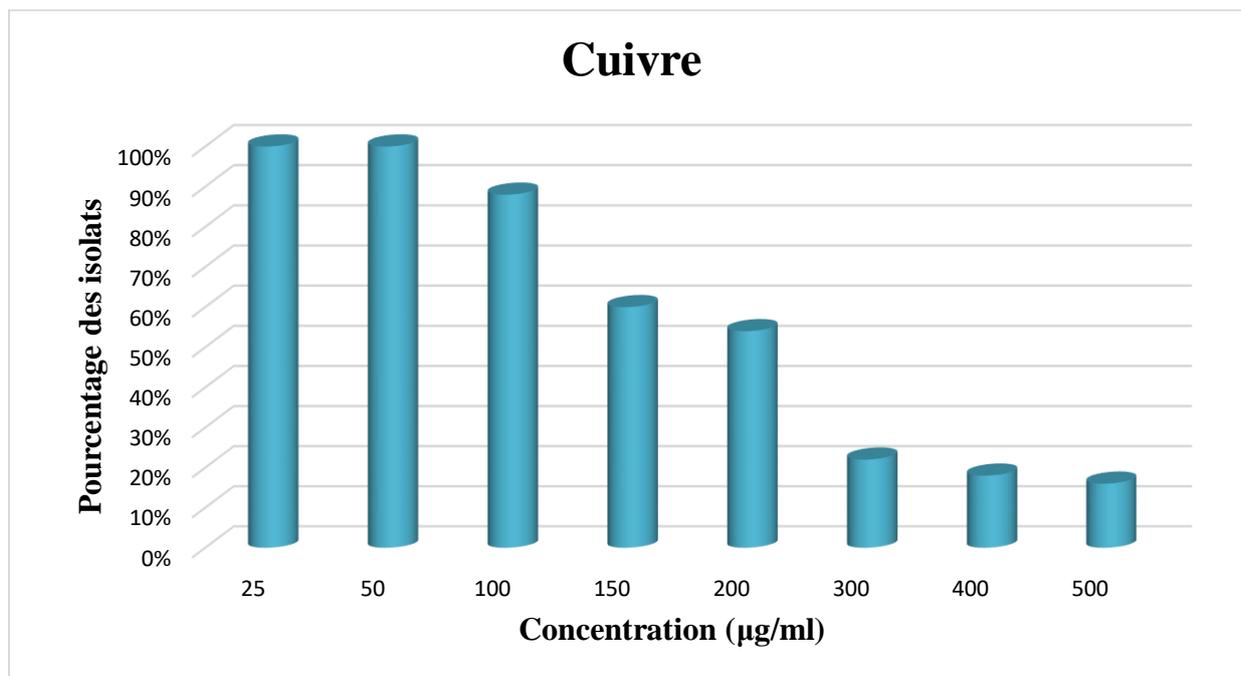


Figure 37. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cuivre

4. 1. 1. 6. Résistance des isolats au cobalt (Co)

Les résultats de la résistance des isolats au cobalt montrent que 100% des isolats résistent jusqu'à 50 µg/ml. Tandis que 42, 24 et 20 % se développent à des concentrations de 100, 150 et 200 µg/ml respectivement et 16 % des isolats affiliés au genre *Cupriavidus* RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 résistent à une concentration de 400 µg/ml (Figure 38).

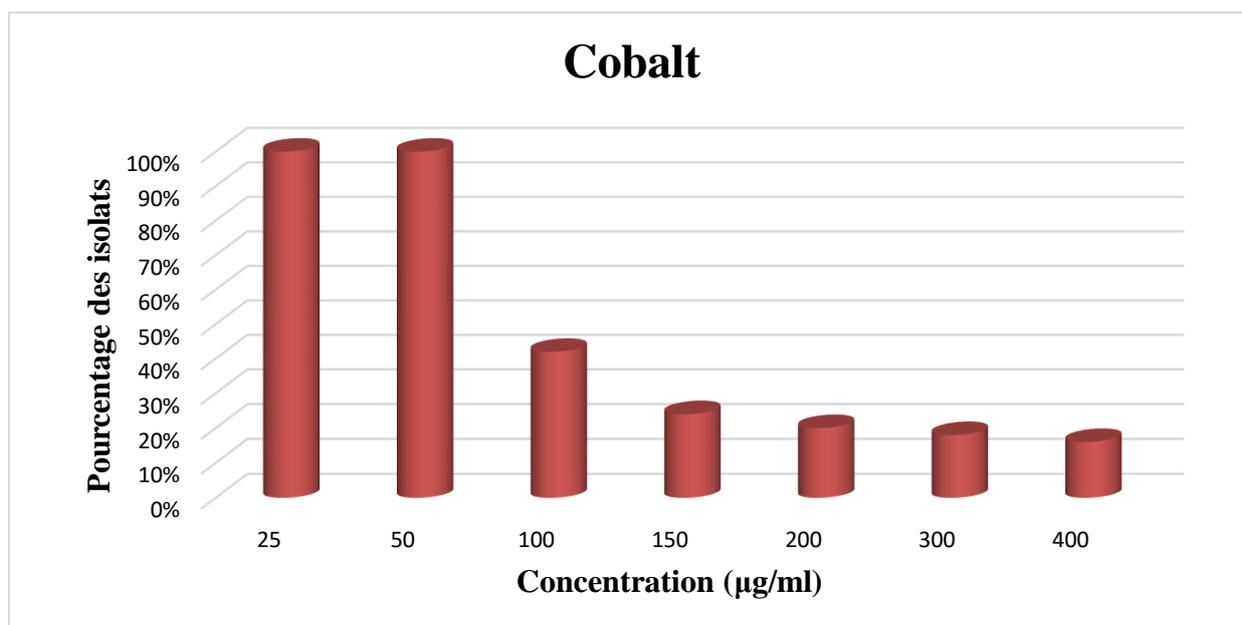


Figure 38. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations de cobalt

4. 1. 1. 7. Résistance des isolats au chrome (Cr)

Le chrome est considéré comme le métal le plus toxique, la croissance des isolats et ce même à de faibles concentrations (Figure 39). En effet, 74% des isolats poussent à une faible concentration qui est de 25 µg/ml. Alors qu'uniquement 6% des isolats affiliés à *Kocuria dechangensis* RSKoc01, *Micrococcus yunnanensis* RSMicc01 et *Bacillus niacini* RSBac02 résistent à une concentration de 50 µg/ml.

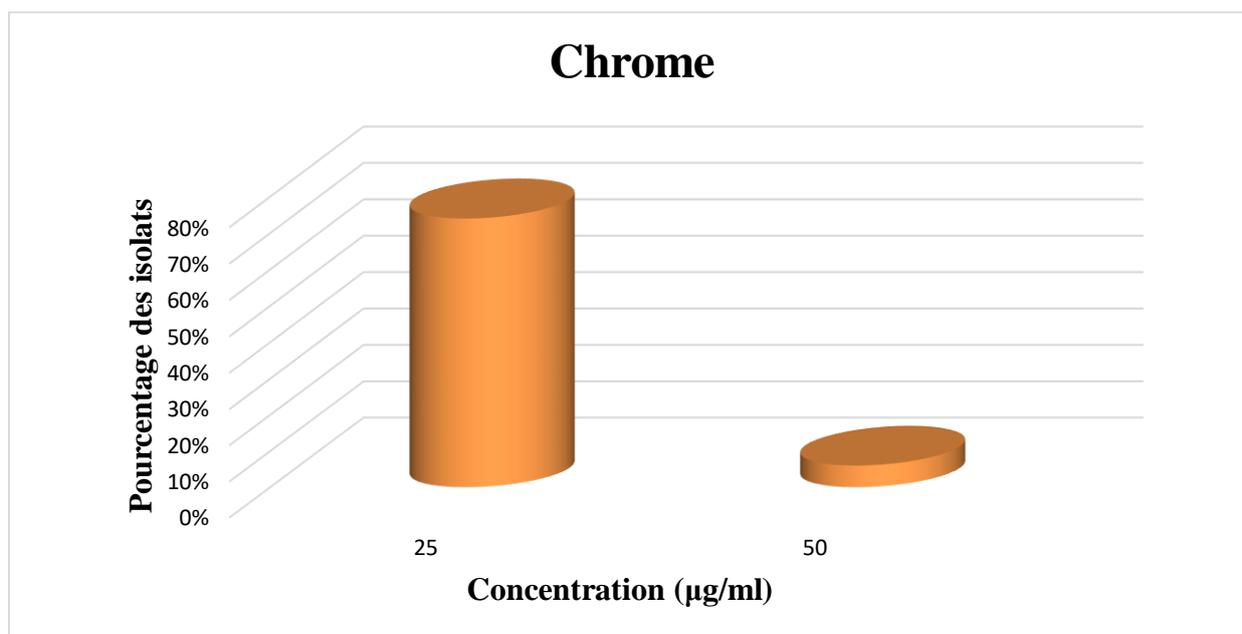


Figure 39. Croissance des isolats bactériens à différentes concentrations du chrome

Les résultats du test de la résistance des isolats aux métaux lourds montrent que l'ordre de résistance aux métaux des isolats est réduit comme suit : $Pb^{++} > Zn^{++} > Ni^{++} > Cd^{++} > Cu^{++} > Co^{++} > Cr^{VI+}$ (Figure 40).

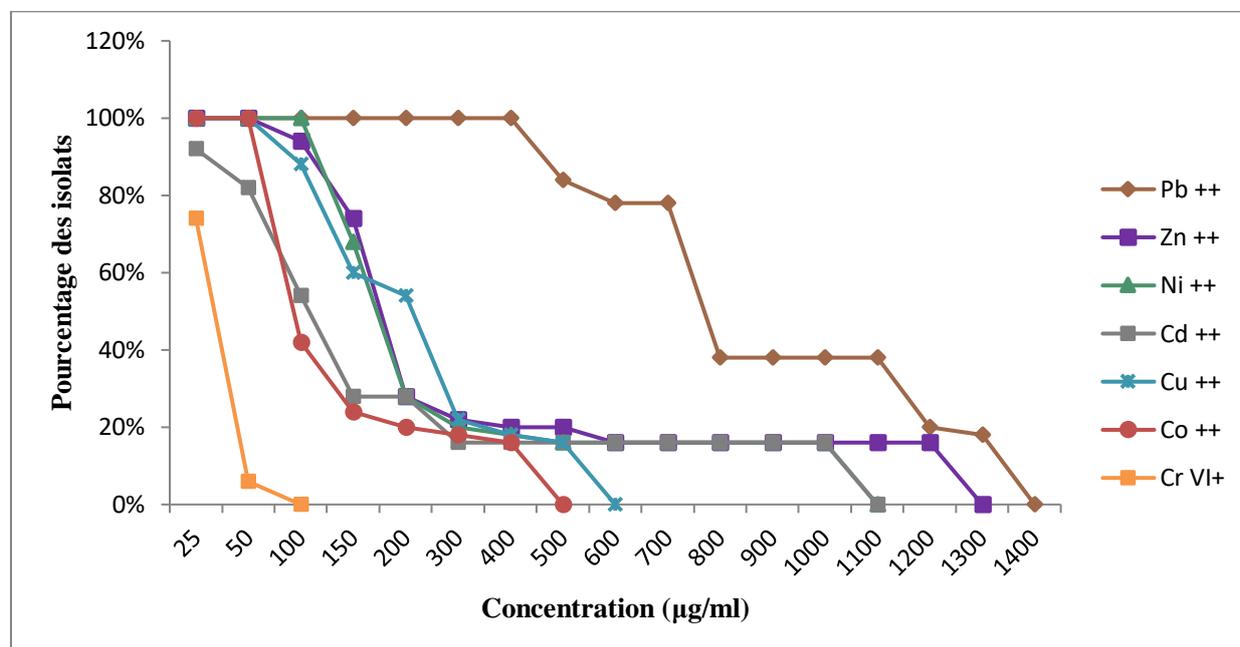


Figure 40. L'ordre de résistance aux métaux lourds des isolats bactériens

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des métaux lourds vis-à-vis des isolats testés sont représentées dans le tableau 11 :

Tableau 11 : Les concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds et NaCl des isolats bactériens

Code des isolats	NaCl	Pb ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Cd ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Co ⁺⁺	Cr ^{VI+}
	%	µg/ml						
RSCup01	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup02	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup03	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup04	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup05	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup06	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup07	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSCup08	4	1300	1200	1000	1000	500	400	25
RSPs01	6	1300	300	400	100	400	300	25
RSPs02	10	700	500	200	200	300	100	25
RSAct01	4	700	500	150	200	200	200	-

Partie III : Résultats et discussion

RSSta01	20	1200	200	300	100	200	100	50
RSMicc01	10	800	150	150	50	200	100	50
RSEnt01	6	700	200	100	200	300	50	-
RSBac01	8	700	150	200	-	200	150	25
RSPro01	8	700	150	200	200	200	100	25
RSMic01	6	700	150	150	25	200	50	25
RSMic02	6	700	150	150	25	200	50	25
RSMic03	6	700	150	150	50	200	50	25
RSMic04	6	700	150	150	25	200	50	25
RSMic05	6	700	150	150	50	200	50	25
RSMic06	6	700	150	150	50	200	50	25
RSMic07	6	700	150	150	25	200	50	25
RSMic08	6	700	150	150	25	200	50	25
RSAci02	8	800	150	100	200	150	100	-
RSPs06	6	800	100	150	50	100	50	25
RSPs07	6	800	100	150	50	100	50	25
RSPs08	6	800	100	150	50	100	50	25
RSPs09	4	800	100	150	50	100	50	25
RSPs03	6	700	100	150	50	100	50	25
RSPs04	6	700	100	150	50	100	50	25
RSPs05	6	700	150	100	50	100	50	25
RSBac03	3	700	100	150	-	200	50	25
RSBac02	6	500	50	150	-	200	50	50
RSKoc01	10	800	150	200	100	150	100	25
RSFr01	3	800	150	150	200	150	150	25
RSRos01	3	800	50	100	-	50	100	25
RSRh07	-	400	200	100	50	50	50	25
RSRh01	-	400	150	100	50	50	50	-
RSRh02	-	400	150	100	100	100	50	-
RSRh03	-	400	150	100	100	100	50	-
RSRh04	-	500	150	100	100	100	50	-
RSRh05	-	400	150	100	100	100	50	-
RSRh06	-	400	150	100	100	100	50	-
RSRh08	-	400	100	100	100	50	50	-
RSRh09	-	500	50	100	100	100	50	25
RSRh10	-	700	150	100	100	100	100	-

RSRh11	-	700	100	100	100	50	50	-
RSPar01	8	700	150	100	50	50	100	-

4. 1. 2. Sur milieu liquide

Les résultats des tests de résistance aux métaux lourds sur le milieu solide obtenus nous ont permis de sélectionner les meilleurs isolats résistants aux différentes concentrations des métaux lourds.

Pour faire le suivi de la croissance de l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01 en présence de plomb, zinc, nickel, cadmium, cuivre et cobalt la culture est quantifiée en mesurant la densité optique (DO 600 nm) pendant 8 jours dans un milieu liquide (TY). Pour chaque métal testé, trois concentrations respectives sont ajoutées aux cultures. En guise de contrôle, la croissance des isolats est analysée dans des milieux dépourvus des métaux lourds respectifs. Les courbes de croissance montrent une réduction des valeurs de la densité optique pour les cultures d'essai avec des concentrations croissantes de plomb, zinc, nickel, cadmium, cuivre et cobalt mettant en évidence l'effet de ces métaux lourds sur les cultures de *Cupriavidus paucula* RSCup01.

En présence de plomb, l'isolat RSCup01 peut s'adapter et pousser après une phase de croissance dont la durée est entre 0 et 72h, après 72h la phase stationnaire se produit et la culture atteint une DO de 1.11 à 1100 µg/ml, à 1200 µg/ml de plomb dans le milieu la valeur DO diminue légèrement à 0.950 et à 1300 µg/ml la croissance est complètement inhibée jusqu'à une valeur DO de 0.450 (Figure 41).

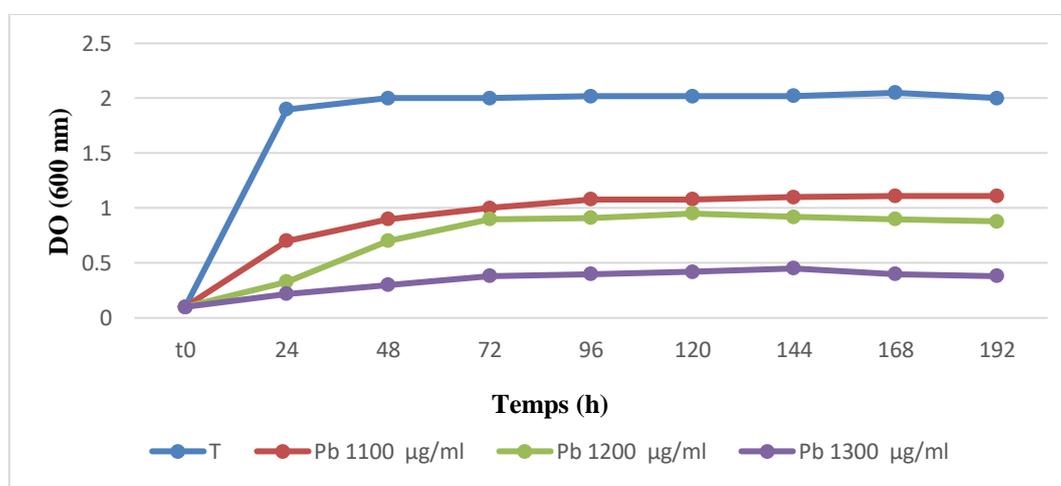


Figure 41. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au plomb

En présence de zinc, l'isolat RSCup01 peut s'adapter et pousser après une longue phase de croissance dont la durée est entre 0 et 120h, après 120h la phase stationnaire se produit et la culture après exposition à 1000 µg/ml et 1100 µg/ml atteint une valeur DO de 0.9 et 0.8 respectivement. En présence de 1200 µg/ml la valeur DO diminue légèrement et atteint une valeur DO de 0.5 (Figure 42).

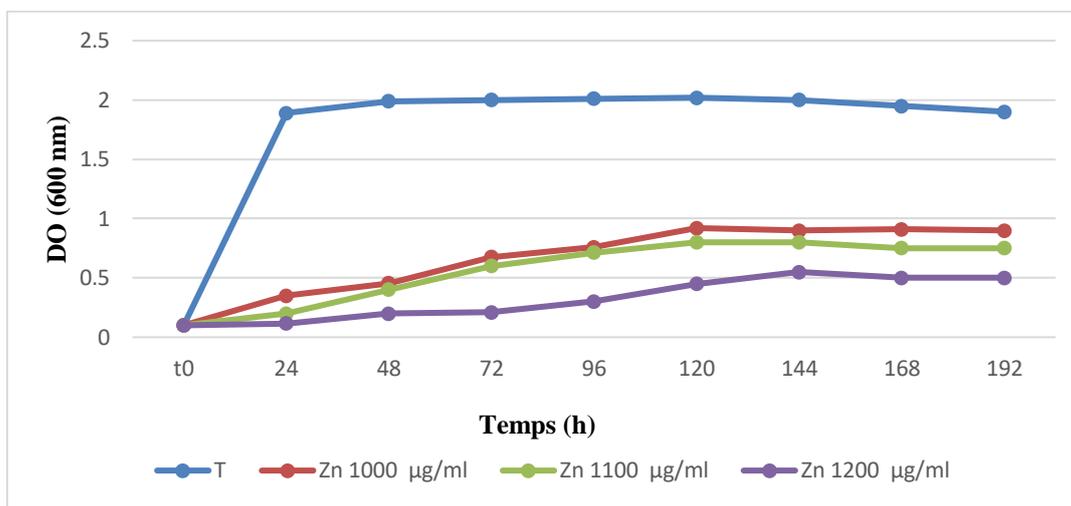


Figure 42. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au zinc

Dans les essais de tolérance au nickel, comme pour le plomb l'isolat RSCup01 peut s'adapter et pousser après une longue phase de croissance dont la durée est entre 0 et 120h, après 120h la phase stationnaire se produit et la culture après exposition à 800 µg/ml et 900 µg/ml de nickel dans le milieu atteint une valeur DO de 0.900 et 0,600 respectivement. Dans les cultures contenant 1000 µg/ml de nickel, la croissance est inhibée de manière significative et atteint une valeur de 0.420 (Figure 43).

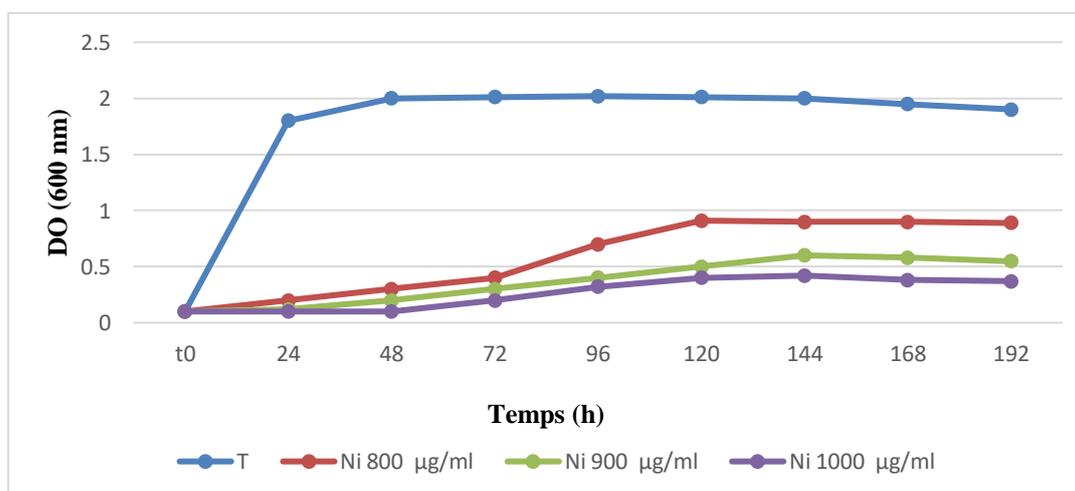


Figure 43. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au nickel

En présence de cadmium, l'isolat RSCup01 peut s'adapter et pousser après une phase de croissance dont la durée est entre 0 et 72h, après 72h la phase stationnaire se produit et la culture atteint une DO de 1.13 à 800 µg/ml de Cd dans milieu, dans les cultures contenant 900 µg/ml la croissance est inhibée et atteint une valeur DO de 0.900, à 1000 µg/ml la croissance est encore diminuée à une valeur de 0.750 (Figure 44).

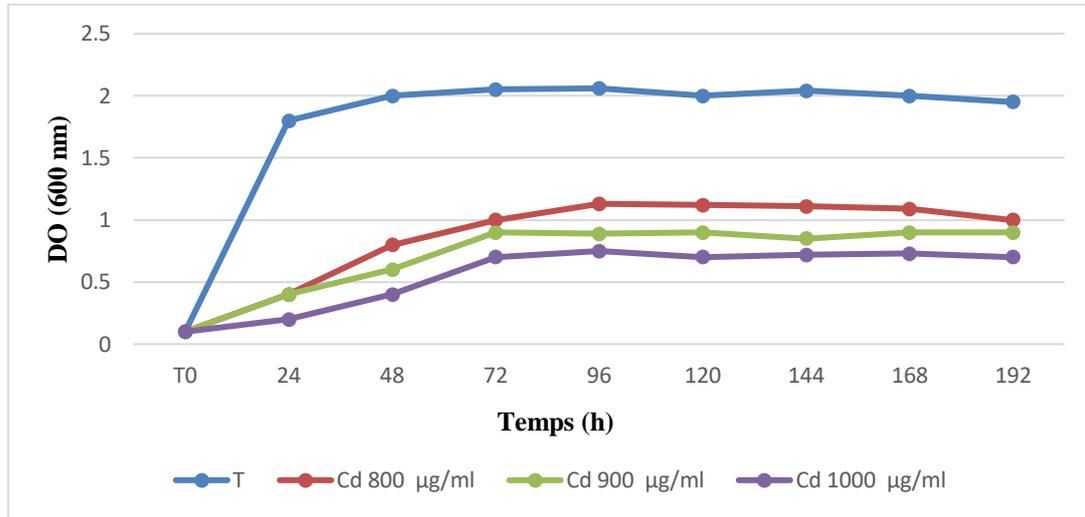


Figure 44. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cadmium

Dans les essais de tolérance au cuivre, l'isolat RSCup01 peut s'adapter et pousser après une phase de croissance dont la durée est entre 0 et 120h, après 120h la phase stationnaire se produit et la culture atteint en présence de 300 µg/ml la valeur de 1,3 au, en présence de 400 µg/ml la valeur DO diminue légèrement et atteint 1.03 et à 500 µg/ml la croissance est complètement inhibée avec une valeur de DO à 0.500 (Figure 45).

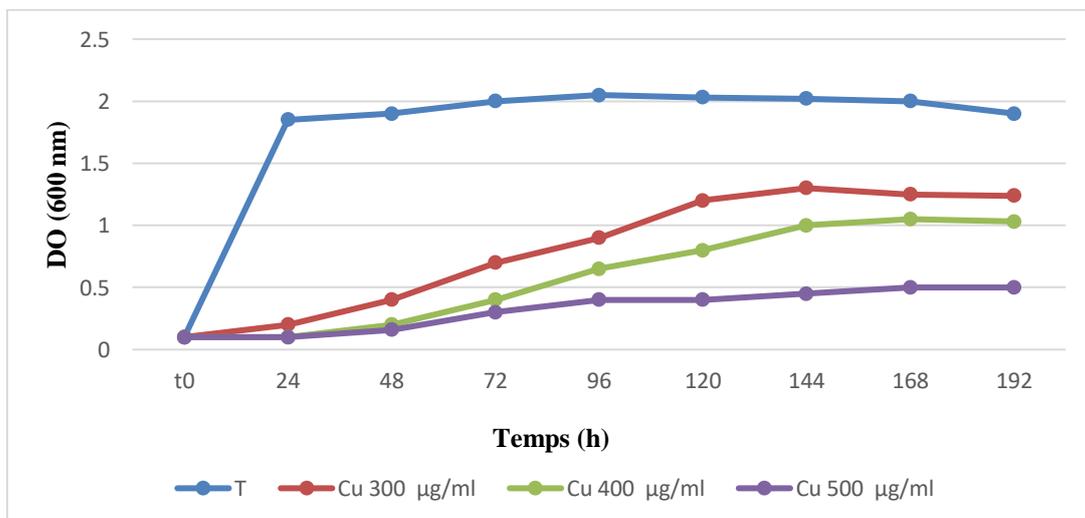


Figure 45. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cuivre

En ce qui concerne le cobalt l'isolat RSCup01 se développe bien à 200 µg/ml et peut s'adapter et pousser après une phase de croissance dont la durée est entre 0 et 48h, après 48h la phase stationnaire se produit et la culture atteint une valeur de 1.4. Cependant à 300 et 400 µg/ml dans le milieu la phase de croissance dure entre 0 et 144h, lors de la phase stationnaire les cultures ont atteint des DO variant entre 1.2 et 0.7 respectivement (Figure 46).

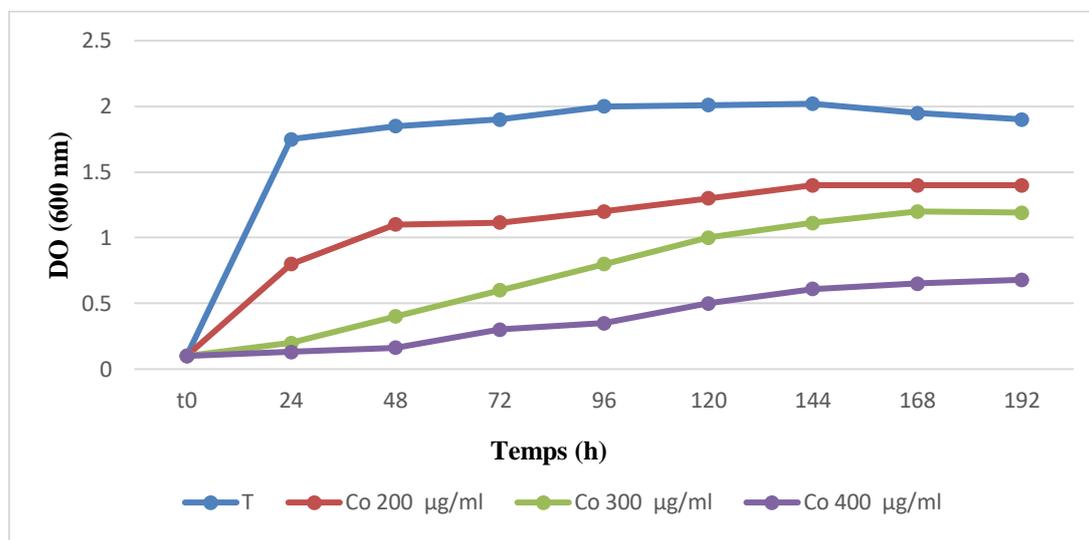


Figure 46. Courbes de résistance de l'isolat RSCup01 au cobalt

4. 1. 3. Etude des gènes de résistance aux métaux lourds

La présence des deux gènes de résistance aux métaux lourds *nccA*, *czcD* est déterminée par PCR en utilisant des amorces spécifiques.

Parmi les isolats sélectionnés présentant une forte résistance aux métaux lourds *Cupriavidus paucula* RSCup01, *Acinetobacter beijerinckii* RSAci01, *Pseudomonas putida* RSPs01, *Pseudomonas* sp. RSPs02, seulement l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01 possède les deux gènes de résistance *nccA* et *czcD*.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *czcD* donne une bande de 500 pb et suite à l'analyse de la séquence BLAST, le gène identifié chez *Cupriavidus paucula* RSCup01 est identique à 100 % à celui de *Cupriavidus metallidurans* et *Cupriavidus* sp. L'arbre phylogénétique montre que l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01 forme une branche indépendante et est regroupé avec les deux souches *Cupriavidus metallidurans* (WP017510531) et *Cupriavidus basilensis* (WP059414501) avec une valeur bootstrap de 81% (Figure 47).

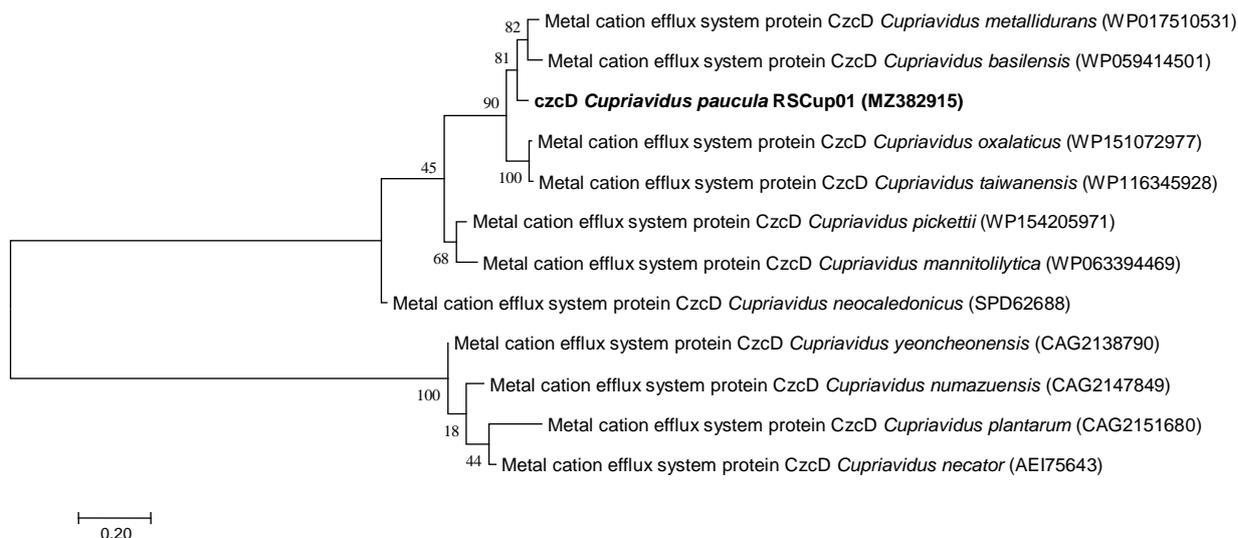


Figure 47. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène *czcD* par la méthode de Neighbour-joining (NJ) basé sur 124 sites d'acides aminés présentés et traduits à partir de l'ADN de la souche *Cupriavidus paucula* RSCup 01. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses. Les séquences sont alignées avec ClustalW.

Tandis que pour le gène de résistance *nccA*, l'analyse de la séquence révèle une bande d'environ 1200 pb et l'analyse de la séquence BLAST montre que les amorces pour *nccA* donnent des résultats positifs avec le gène *nccA* de la souche *Cupriavidus metallidurans* mais aussi le gène *czcA* des bactéries du genre *Cupriavidus* (Annexe IV).

Pour identifier les déterminants de la résistance aux métaux lourds, les plus proches parents des produits protéiques de ce gène de résistance sont étudiés à l'aide d'une analyse phylogénétique. L'arbre phylogénétique montre que le gène *nccA* de l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01 est identique à 100 % avec de la souche *Cupriavidus metallidurans* (ABF13004) (Figure 48).

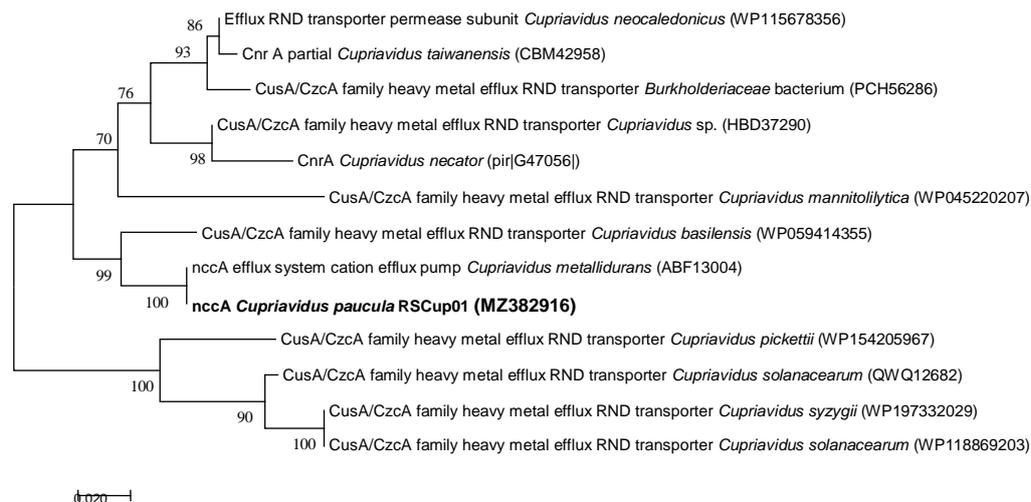


Figure 48. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène *nccA* par la méthode de Neighbour-joining (NJ) basé sur 349 sites d'acides aminés présentés et traduits à partir de l'ADN de la souche *Cupriavidus paucula* RSCup 01. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et des isolats étudiés sont indiqués entre parenthèses. Les séquences sont alignées avec ClustalW.

4. 2. Tolérance à la salinité

4. 2. 1. Sur milieu solide

Le test de salinité est réalisé pour étudier la capacité des isolats à croître en présence de concentrations croissantes de NaCl : 1.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 et 20%.

La sensibilité des isolats à différentes concentrations en sel représenté dans le tableau 11 montre que les isolats étudiés sont très tolérants à des concentrations élevées en NaCl. Nos résultats montrent que les isolats se comportent différemment face au stress salin (Figure 49), la tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel. Toutefois, 78 % des isolats peuvent tolérer une concentration jusqu'à 3% NaCl et plus de 50% tolèrent une concentration de 6% NaCl. Au-delà de cette concentration le nombre des isolats tolérants diminue, 4 isolats RSSta01, RSPs02, RSMicc01 et RSKoc01 fortement tolérants qui peuvent croître à 10% NaCl sont également signalés à l'exception d'un seul isolat RSSta01 qui peut pousser à une concentration de 20% (Figure 50).

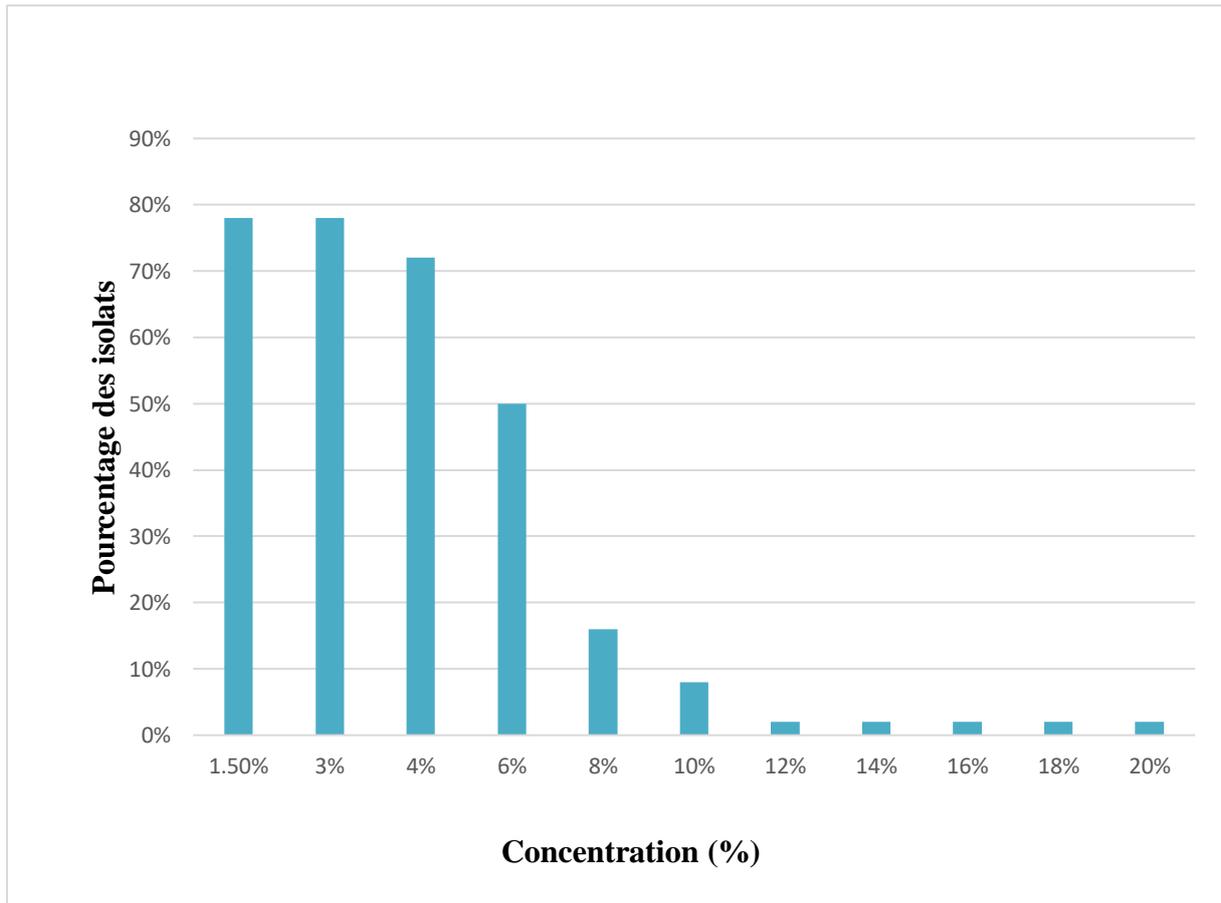


Figure 49. Tolérance des isolats bactériens à la salinité

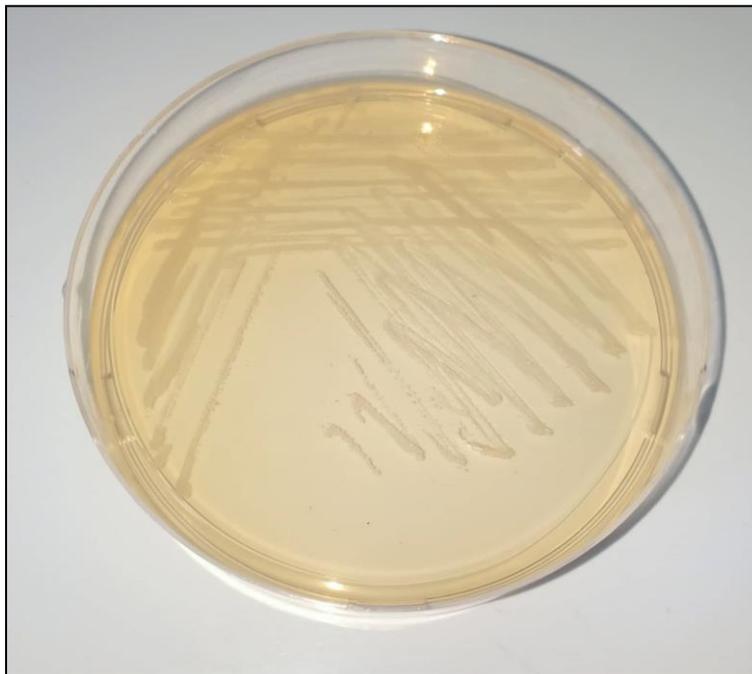


Figure 50. Résistance de la souche RSSta01 à 20% de NaCl

4. 2. 2. Sur milieu liquide

Nous avons étudié la résistance au NaCl de l'isolat *Staphylococcus xylosus* RSSta01 sur milieu TY liquide et en mesurant la densité optique de celle-ci suivant un intervalle de temps, nous avons obtenu les résultats suivants :

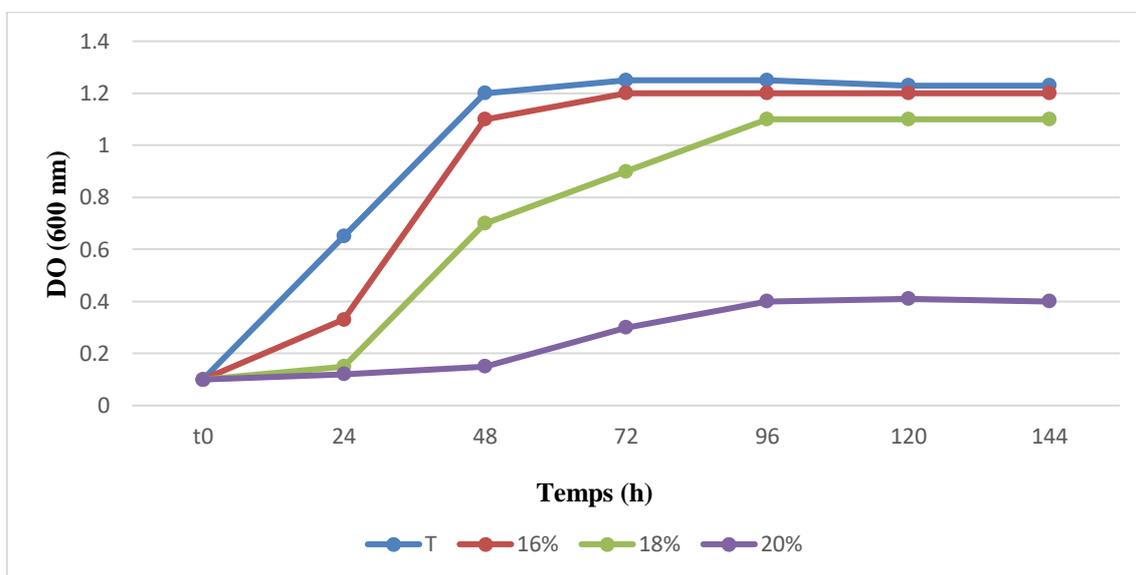


Figure 51. Courbes de résistance de l'isolat RSSta01 au NaCl

La figure 51 montre la cinétique de croissance de l'isolat *Staphylococcus xylosus* RSSta01 en milieu contenant différentes concentrations de NaCl allant de 16 à 20% pendant 144 heures afin de confirmer la CMI de cette bactérie.

Après une phase de latence et de croissance dont la durée est entre 0 et 48 h, la DO du témoin atteint une valeur de 1.208 et en présence de 16% de NaCl la culture atteint une DO de 1.200, ce qui est presque identique au témoin. Cependant, en présence de 18 et 20% en NaCl la phase stationnaire se produit après 96 h et la culture atteint une DO de 1.1 et 0.400 respectivement.

4. 3. Analyse en composantes principales (ACP) : Relation entre résistance aux métaux lourds, la résistance à la salinité et les activités PGPR

L'analyse de l'ACP (Figure 52) est utilisée pour étudier la relation qui existe entre le comportement des individus (isolats) vis-à-vis les huit variables suivantes : la résistance aux métaux lourds (Pb^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} , Co^{++} et Cr^{VI+}), résistance à la salinité, production des siderophores, solubilisation du phosphate, activité antifongique, nodulation,

fixation d'azote et la production des enzymes extracellulaires (uréase, protéase, amylase, estérase et cellulase).

L'analyse en composantes principales (ACP) montre 64.99% de l'information totale :

- Le premier axe principal, qui représente 42.67 % de la variance totale est l'axe le plus significatif de cette dernière, il est corrélé positivement avec les variables métaux lourds (Pb^{++} (0,938), Zn^{++} (0,911), Ni^{++} (0,936), Cd^{++} (0,896), Cu^{++} (0,926), Co^{++} (0,938), Cr^{VI+} (0,380)), salinité (0,241), siderophores (0,411), activité antifongique (0,523) et enzymes extracellulaires (uréase (0,176), protéase (0,842), estérase (0,594) et cellulase (0,036)) et corrélé négativement avec les variables solubilisation du phosphate (-0,578), nodulation (-0,482), fixation d'azote (-0,482) et l'amylase (-0,133).

- Le deuxième axe principal, qui représente 22.32 % de la variance totale, est corrélé positivement avec les variables métaux lourds Pb^{++} (0,075) et Cr^{VI+} , salinité (0,724), activité antifongique (0,571) et les deux enzymes extracellulaires (estérase (0,097) et amylase (0,736)) et corrélé négativement avec les variables métaux lourds (Zn^{++} (-0,333), Ni^{++} (-0,255), Cd^{++} (-0,373), Cu^{++} (-0,054), Co^{++} (-0,259), Cr^{VI+} (0,611)), solubilisation du phosphate (-0,520), enzymes extracellulaires (uréase (-0,657), protéase (-0,320) et cellulase (-0,283)), sidérophore (-0,279) nodulation (-0,667) et fixation d'azote (-0,667).

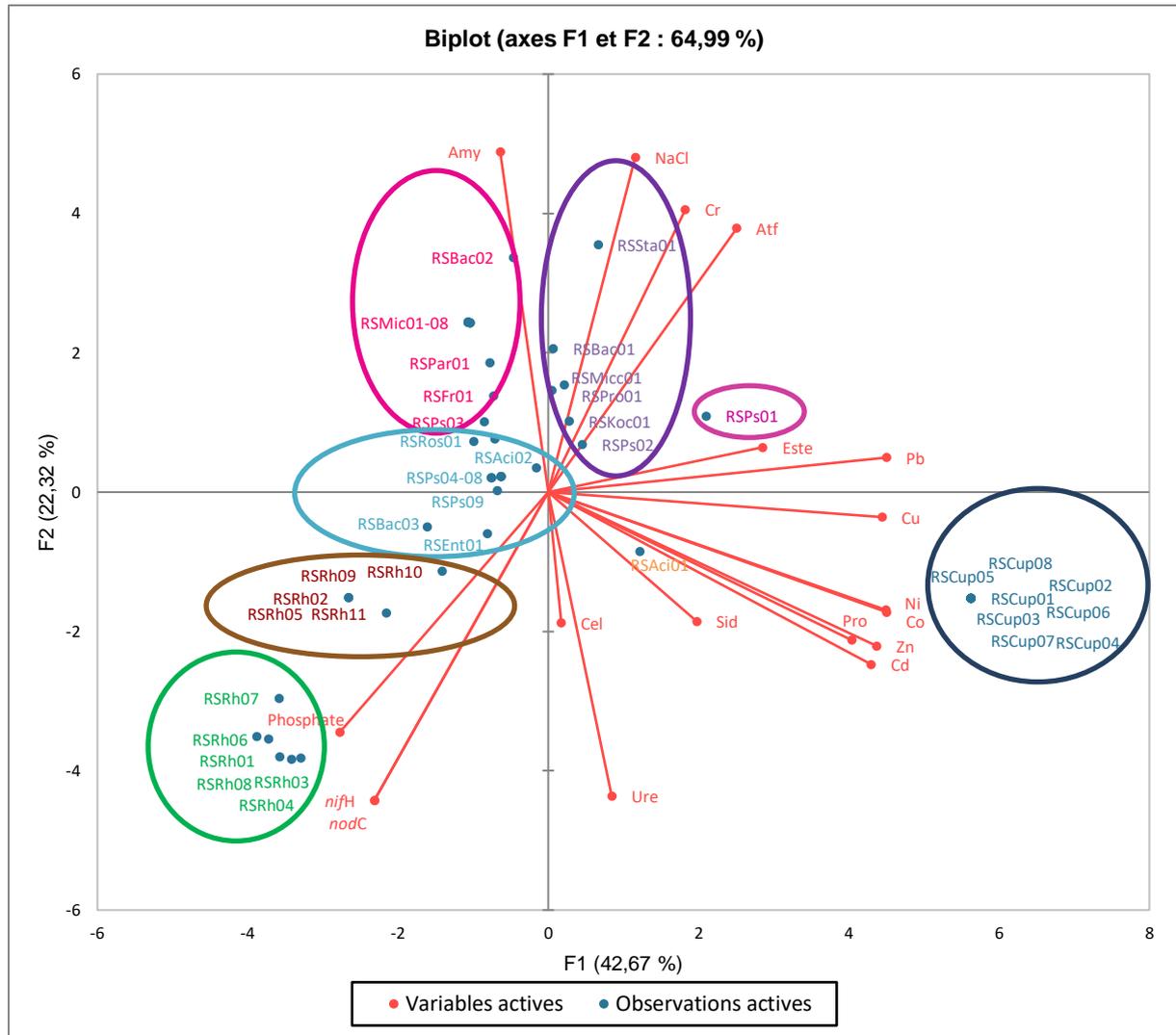


Figure 52. Analyse en composantes principales montrant la relation entre la résistance aux métaux lourds, la résistance à la salinité et les activités PGPR.

Les abréviations utilisées pour les phénotypes : Atf : Activité antifongique, Sid : production de sidérophore, Cel : activité de la cellulase, Ure : activité de l'uréase, Amy : activité de l'amylase, Pro, activité de la protéase, Este : activité de l'estérase, Pro : activité protéasique.

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

- Une corrélation positive est confirmée entre le Ni^{++} et Co^{++} .
- La solubilisation du PR est négativement corrélée avec la résistance aux métaux lourds (Pb^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} , Co^{++} , $\text{Cr}^{\text{VI}+}$).
- La résistance à la salinité est corrélée positivement avec la résistance au $\text{Cr}^{\text{VI}+}$.

- La résistance au Zn^{++} est corrélée positivement avec la résistance au Cd^{++} et la production de la protéase.
- Une corrélation positive est confirmée entre la nodulation et la fixation d'azote.

Pour le comportement des isolats vis-à-vis les huit variables cités ci-dessus, nous pouvons les classer en huit groupes :

- Le premier groupe (couleur bleu) comporte les isolats ; RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 et RSCup08 ayant une très forte résistance à la majorité des métaux lourds testés ; Pb^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} et Co^{++} , produisent 4 enzymes extracellulaires ; uréase, protéase, estérase et cellulase ainsi que les sidérophores.

- Le deuxième groupe (couleur mauve) comporte que l'isolat RSPs01 qui a une très forte résistance aux Pb^{++} et Cu^{++} et une bonne résistance aux Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Co^{++} et au NaCl, produit 4 enzymes extracellulaires ; uréase, estérase, amylase et cellulase, et possède une activité antifongique.

- Le troisième groupe (couleur orange) comprend que l'isolat RSACi01 qui a une bonne tolérance à la majorité des métaux lourds testés ; Pb^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} et Co^{++} , produit 4 enzymes extracellulaires ; uréase, protéase, estérase et cellulase ainsi que les sidérophores.

- Le quatrième groupe (couleur violet) comporte les isolats ; RSSta01, RSKoc01, RSPro01, RSPs02, RSMicc01 et RSBac02 ayant une très forte résistance au NaCl et une bonne tolérance aux métaux lourds ; Pb^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} et Co^{++} , une meilleure tolérance au Cr^{VI+} et ont une activité antifongique.

- Le cinquième groupe (couleur rose) comporte les isolats ; RSBac02, RSPar01, RSFr01, RSPs03, RSMic01, RSMic02, RSMic03, RSMic04, RSMic05, RSMic06, RSMic07 et RSMic08 ayant une résistance moyenne aux métaux lourds testé et produisent l'amylase.

- Le sixième groupe (couleur bleu ciel) comporte les isolats ; RSBac03, RSEnt01, RSACi02, RSRos01, RSPs04, RSPs05, RSPs06, RSPs07, RSPs08 et RSPs09 ayant une résistance moyenne aux métaux lourds et solubilisent le phosphate.

- Le septième groupe (couleur verte) comporte les isolats ; RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 et RSRh08 ayant une faible résistance aux métaux lourds mais solubilisent le phosphate et possèdent les deux gènes de nodulation *nodC* et de fixation d'azote *nifH*.

- Le huitième groupe (couleur marron) comporte les isolats ; RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh10 et RSRh11 ayant une faible résistance aux métaux lourds et solubilisent le phosphate mais ne possèdent pas les deux gènes de nodulation *nodC* et de fixation d'azote *nifH*.

4. 4. Discussion

La sélection des bactéries résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre les bactéries et les légumineuses résistantes comme un moyen efficace de bioremédiation contre la contamination des sols par les métaux lourds.

Les plantes hyper-accumulatrices sont capables de stockés des concentrations élevées de métaux lourds et ont besoin des rhizobia et autres bactéries associées aux plantes pour survivre dans ce milieu et améliorer la résistance de leur hôte (**Idris et al. 2004**).

Les bactéries isolées sont étudiées pour déterminer leur capacité à tolérer des concentrations importantes en métaux lourds. La détermination du degré de tolérance des bactéries constitue une démarche essentielle pour évaluer l'adaptation de ces bactéries aux différents métaux lourds et repérer des isolats à sélectionner dans des essais de bioremédiation.

Les résultats du test de la résistance des isolats aux métaux lourds montrent que la capacité des isolats à résister à des concentrations croissantes de métaux lourds : cobalt, nickel, chrome, cuivre, plomb, cadmium et zinc diffère d'un isolat à un autre. **Balakrishnan et al. (2017)** à démontrer que la résistance aux métaux lourds varie entre les bactéries même si elles sont isolées de la même niche écologique, prouvant que la tolérance aux métaux lourds est une caractéristique dépendant de la souche et du type de métal.

L'ordre de résistance aux métaux des isolats de cette étude est réduit comme suit : $Pb^{++} > Zn^{++} > Ni^{++} > Cd^{++} > Cu^{++} > Co^{++} > Cr^{VI+}$. Le chrome est le métal le plus toxique, à une concentration de 50 µg /ml, seules 18% des isolats résistent. Tandis que les autres métaux, même à des concentrations relativement élevées sont moins néfastes pour la majorité des isolats testés. Le plomb est le métal le moins toxique car même à très forte concentration, la croissance des isolats n'est pas affectée.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les concentrations des métaux lourds trouvées dans les sols peuvent influencer la tolérance bactérienne, et de ce fait les bactéries développent une résistance vis-à-vis les métaux qui contaminent leur habitat (**Del Busso Zampieri et al. 2016**).

Il a été signalé que les bactéries exposées à des niveaux élevés de polluants toxiques dans leur environnement s'adaptent à ce stress en développant divers mécanismes de résistance, tels que l'exclusion des métaux par exportation active, la transformation et/ou la détoxification des métaux, la précipitation des métaux lourds, la séquestration intracellulaire et extracellulaire et la réduction des métaux toxiques en formes moins toxiques (**Zubair et al. 2016**).

Nos résultats montrent que le niveau de résistance aux métaux lourds des endophytes, apparaît relativement plus élevé par rapport à celui manifesté en générale par les rhizobia. Les résultats obtenus dans cette étude montrent également que la CMI la plus élevée des isolats atteint 1300 µg/ml de Pb⁺⁺, 1200 µg/ml de Zn⁺⁺, 1000 µg/ml de Ni⁺⁺, 1000 µg/ml de Cd⁺⁺, 500 µg/ml de Cu⁺⁺, 400 µg/ml de Co⁺⁺ et 50 µg/ml de Cr^{VI+} respectivement, et sont obtenues principalement par les isolats de *Cupriavidus paucula* RSCup01- RSCup08 qui montrent une forte résistance à tous les métaux lourds testés.

Les isolats du genre *Cupriavidus* sont connus pour leur résistance importante aux métaux lourds. En effet, il a été rapporté que les bactéries du genre *Cupriavidus* étaient très abondantes dans de nombreux environnements contaminés par les métaux lourds et présentent les niveaux maximums de résistance aux métaux lourds (**Monsieurs et al. 2011 ; Shi et al. 2020**). Ce genre a été identifié comme de puissant biorémédiateur, en particulier ceux associés aux plantes, favorisant leur croissance même sous des stress environnementaux tels que la toxicité des métaux lourds (**Bravo et al. 2020**).

Des études de **Zhao et al. (2012)** ont montré que la souche *Cupriavidus metallidurans* XXXKD-1 présentait une très grande résistance à divers métaux lourds avec des CMI très élevées pour le cadmium, cobalt, chrome, nickel, cuivre, et zinc. Ces niveaux élevés de tolérance par les microorganismes sont dû à des mécanismes génétiques spécifiques conférant une résistance aux métaux lourds (**Etesami 2018 ; Etesami et Maheshwari 2018**).

L'amplification par PCR et la visualisation par électrophorèse montrent que parmi les bactéries sélectionnées l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup 01 possède les gènes de résistance *czcD* et *nccA* qui sont responsables de la résistance à de multiples métaux lourds.

Le gène *czcD* est impliqué dans l'exportation de zinc, cobalt et cadmium du cytoplasme vers le périplasme (**Nies 1992**). Le gène *nccA* a un mécanisme similaire, il offre une résistance au nickel, au cadmium et au cobalt (**Schmidt et Schlegel 1994**). Nos résultats

montrent qu'il y'a une corrélation entre la résistance aux métaux lourds et la présence de gènes *czcD* et *nccA* chez l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01.

Dans la présente étude, divers isolats montrent une bonne résistance aux métaux lourds, cela indique que ces bactéries se sont adaptées à la toxicité des métaux lourds. Parmi la communauté bactérienne, *Pseudomonas* et les bactéries Gram-négatives apparentées aux genres *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Rhizobium* montrent une résistance efficace en présence de divers métaux lourds.

Le genre *Pseudomonas* est un genre bactérien ubiquitaire et qui a développé des mécanismes d'adaptation et de survie dans diverses conditions. **Singh et al. (2019)** ont signalé que les souches de *Pseudomonas* sont dominantes dans les sites contaminés par les métaux lourds et qu'elles peuvent tolérer des concentrations élevées de métaux lourds. **Hu et Zhao (2007)** ont rapporté que la souche de *Pseudomonas putida* CD2 a une capacité de tolérance multiples aux métaux lourds suivant zinc, plomb, cobalt, cadmium, nickel et cuivre.

Il a aussi été montré que les bactéries du genre *Rhizobium* associées aux *Trifolium* sp. sont capables de croître en présence de plusieurs métaux lourds tel que le zinc, plomb, cobalt, cadmium, nickel et cuivre (**Nonnoi et al. 2012**). Une autre étude de **Benidire et al. (2016)** a montré que les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Enterobacter* ont une bonne résistance au cuivre, zinc et cadmium.

En dehors de ces bactéries, les isolats Gram positifs principalement *Bacillus*, *Microbacterium*, *Kocuria* et *Staphylococcus* montrent également une résistance considérable aux métaux lourds. Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux observés par **Roman-Ponce et al. (2016)** qui ont montré que les bactéries du genre *Bacillus*, *Microbacterium*, *Kocuria* et *Staphylococcus* ont une tolérance élevée à plusieurs métaux lourds. Une autre étude de **Nayak et al. (2020)** a signalé que les *Bacillus* et *Microbacterium* ont une bonne résistance au cuivre plomb et zinc.

En plus de la résistance aux métaux lourds, nos isolats montrent également une remarquable résistance à la salinité. Il a été établi que les microorganismes qui peuvent se développer bien en dessous de la salinité de 3 % sont classés dans la catégorie des bactéries halophiles (**Jiang et al. 2017**). Par conséquent, dans notre étude, environ 78 % des souches pourraient être considérées comme des bactéries modérément halophiles.

En général, il existe peu de rapports sur bactéries halophiles résistantes aux métaux lourds (Voica et al. 2016). Récemment, Jiang et al. (2017) ont étudié la capacité des bactéries résistantes aux métaux lourds à tolérer la salinité. Ils ont montré que les bactéries du genre *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Acinetobacter* sont résistantes à une salinité allant jusqu'à 7 % (Jiang et al. 2017). Roman-Ponce et al. (2016) ont rapporté des niveaux de tolérance chez des bactéries du genre *Staphylococcus* isolées des plantes tolérantes aux métaux lourds pouvant aller jusqu'à 20% en NaCl.

En comparant nos résultats avec les résultats des autres études, nous pouvons conclure que nos isolats sont très résistants et qu'ils ont le potentiel d'être utilisées dans des zones à salinité élevé et pollué par les métaux lourds.

5. Isolat-levure RSRod01

5. 1. Caractéristiques morphologiques

5. 1. 1. Observation macroscopique

L'examen macroscopique montre que l'isolat RSRod01 pousse en 24h sur le milieu TY. Les colonies de l'isolat sont de formes rondes, bombées, opaques, crémeuse et lisses avec des bords réguliers et de couleur rose (Figure 53).



Figure 53. Aspect macroscopique de l'isolat RSRod01

5. 1. 2. Observation microscopique

L'observation microscopique montre des cellules de forme ovales, séparées les unes des autres, avec un noyau central ainsi que l'absence totale de thalle et de pseudomycélium (Figure 54).

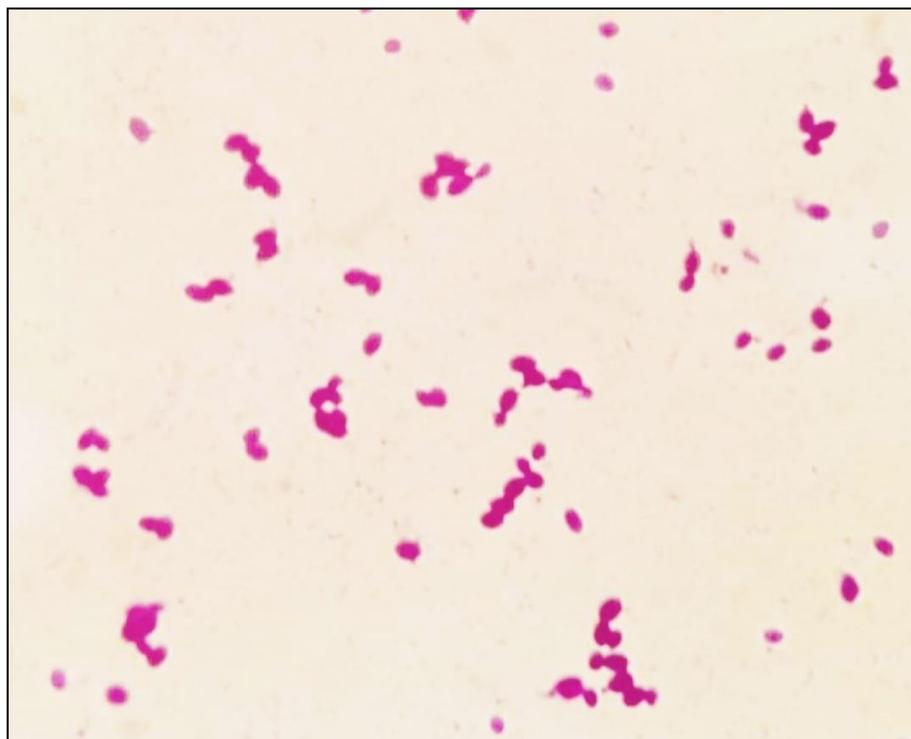


Figure 54. Aspect microscopique X 100 de l'isolat RSRod01

5. 2. Identification moléculaire

L'amplification de l'isolat RSRod01 par les amorces ITS 1 et ITS 4, a donné un amplicon d'une longueur de 547 pb. Cette séquence correspond aux séquences ITS I et ITS 4 régions complètes ; la partie 5'du gène (18S, 5.8S) et la séquence de l'extrémité 3'du gène (28S) (Figure 55).

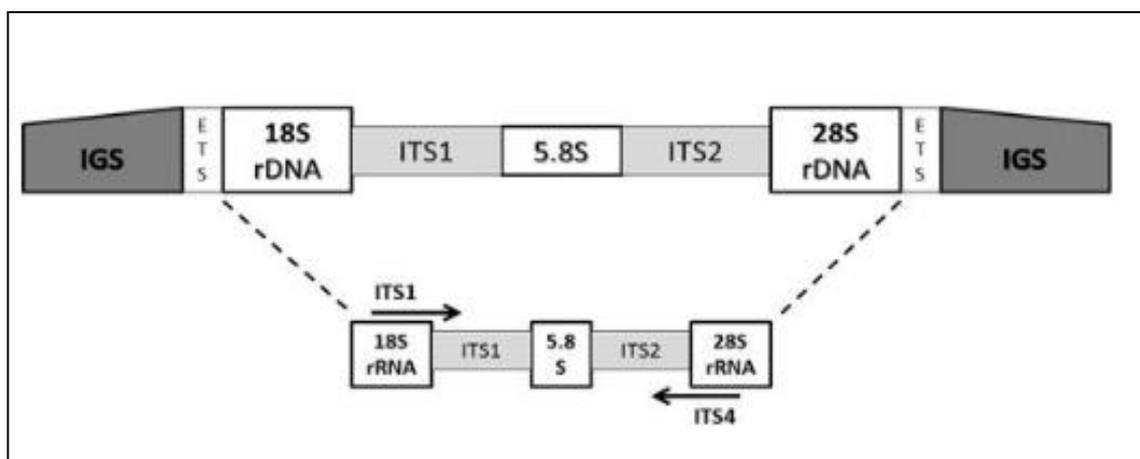


Figure 55. Représentation schématique des régions inter génique (ITS) avec les emplacements de liaison des amorces (**Mazari et al. 2017**).

Pour rechercher les ressemblances génétiques, la séquence obtenue par le séquençage du gène ITS 1 et ITS 4 de notre isolat RSRod01 est comparée aux séquences publiées dans la banque de données (NCBI-GenBank).

L'analyse par BLAST pour la recherche de l'homologie avec les espèces similaires existant dans les banques de données (GenBank), est utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique par le logiciel MEGA 7 (Figure 56).

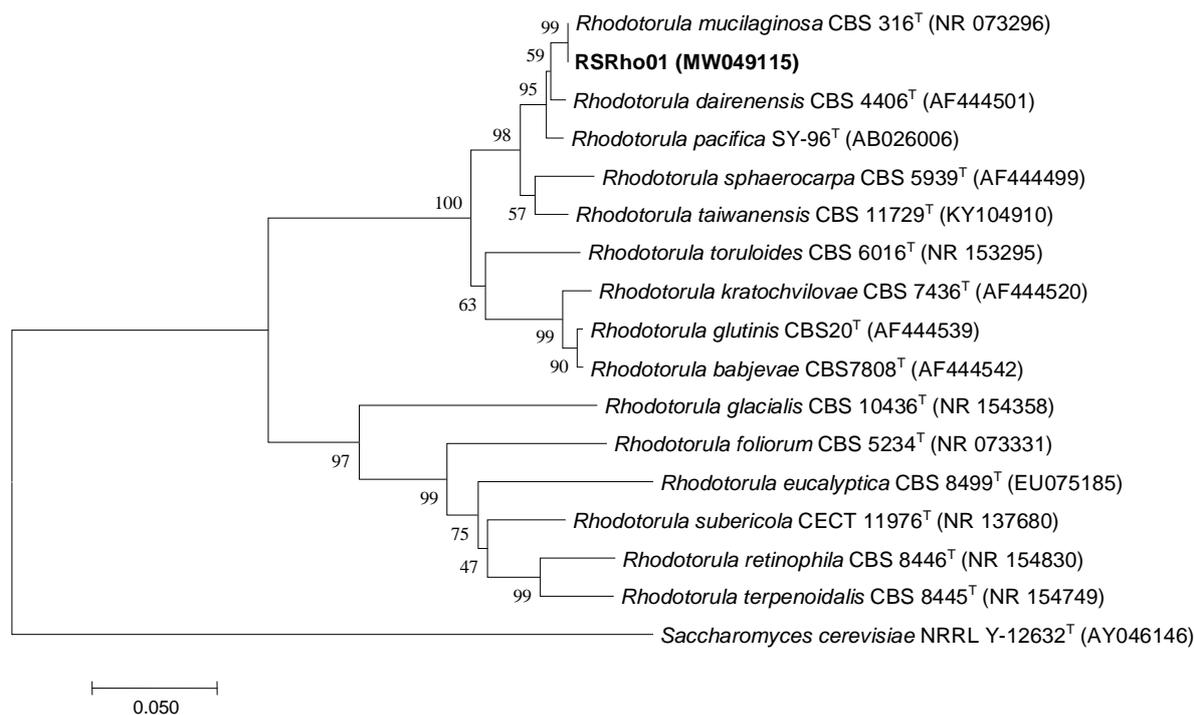


Figure 56. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ITS (547 pb) par la méthode de Neighbour-joining. Les valeurs Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accès des souches de référence et de l'isolat RSRod01 sont indiqués entre parenthèses

L'arbre phylogénétique Neighbor Joining (NJ) montre que la séquence ITS de l'isolat RSRod01 et de *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T sont regroupées dans le même clade et présentent une homologie à 99 %. Par conséquent, l'isolat RSRod01 est identifié comme étant *Rhodotorula mucilaginosa* et sa séquence nucléotidique est déposée et enregistrée dans la base des données GenBank sous la référence MW049115.

5. 3 Etude du comportement de l'isolat RSRod01 par rapport à l'azote

5. 3. 1 Croissance sur milieu sans source d'azote

Les résultats de ce test montrent que l'isolat RSRod01 a la capacité de se développer sur le milieu sans azote (MA) même après plusieurs repiquages. Cependant, ce résultat seul n'est pas suffisant pour démontrer que cette levure fixe l'azote (Figure 57).

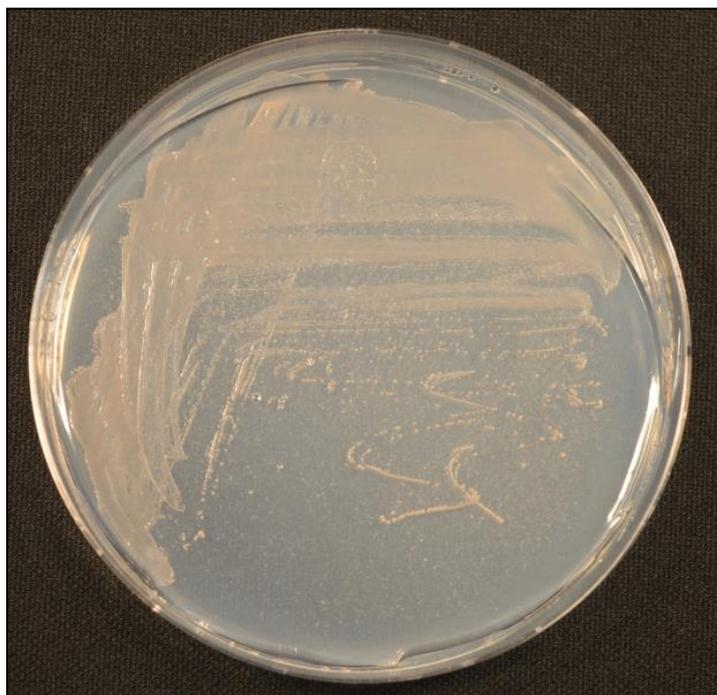


Figure 57. Croissance de l'isolat RSRod01 sur le milieu N-free

5. 3. 2 Mesure de l'activité de réduction de l'acétylène (test ARA)

Le principe du test ARA repose sur la capacité de la nitrogénase à convertir l'acétylène en éthylène. En effet, cette enzyme permet de briser à la fois la triple liaison ($N\equiv N$) du diazote contenu dans l'atmosphère avant de le transformer en ammonium mais également de briser la triple liaison de l'acétylène ($H-C\equiv C-H$) pour le réduire en éthylène (Hardy et al. 1968).

L'efficacité de la fixation d'azote de l'isolat RSRod01 est vérifiée en conditions contrôlées en utilisant le test de réduction de l'acétylène (test ARA). Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de réduction d'acétylène et que l'isolat pourrait ne pas fixer l'azote.

5. 4. Résistance de l'isolat RSRod01 aux métaux lourds et NaCl sur milieu solide

Les résultats du test de la résistance de l'isolat RSRod01 aux métaux lourds et au NaCl, nous ont permis de noter la capacité de résistance à tous les métaux lourds testés sauf au chrome qui inhibe complètement la croissance de l'isolat RSRod01 et ça même en présence d'une très faible concentration dans le milieu. Concernant le NaCl l'isolat RSRod01 a résisté jusqu'à 4%. Les CMI de chaque métal et NaCl sont représentés sur le tableau 12.

Les résultats montrent également que l'ordre de résistance aux métaux de l'isolat RSRod01 est réduit comme suit : $Pb^{++} > Cu^{++} > Co^{++} > Zn^{++} = Ni^{++} > Cd^{++} > Cr^{VI+}$.

Tableau 12 : Les concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds et NaCl de l'isolat RSRod01

ML Et NaCl	NaCl	Pb ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Cd ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Co ⁺⁺	Cr ^{VI+}
	%	µg/ml						
CMI	4	1300	300	300	200	500	400	-

5. 5. Criblage de l'isolat RSRod01 à traits PGP

Les résultats des tests PGP montrent que l'isolat RSRod01 (Tableau 13) :

- Ne solubilise pas les phosphates inorganiques sur milieu PVK
- Produit faiblement des siderophore (Figure 58-A)
- Produit 3 des 5 enzymes extracellulaires testés ; estérase, uréase et cellulase (Figure 58-B.C. D)
- Possède une bonne activité antifongique *in vivo* et *in vitro* (Figure 58 -E. F)

Tableau 13 : Activités PGP de l'isolat RSRod01

Enzyme extracellulaires					Production de siderophores	Solubilisation du phosphate	Activité antifongique	
Estérase	Caseinase	Amylase	Uréase	Cellulase			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
+	-	-	+	+	+	-	+	+

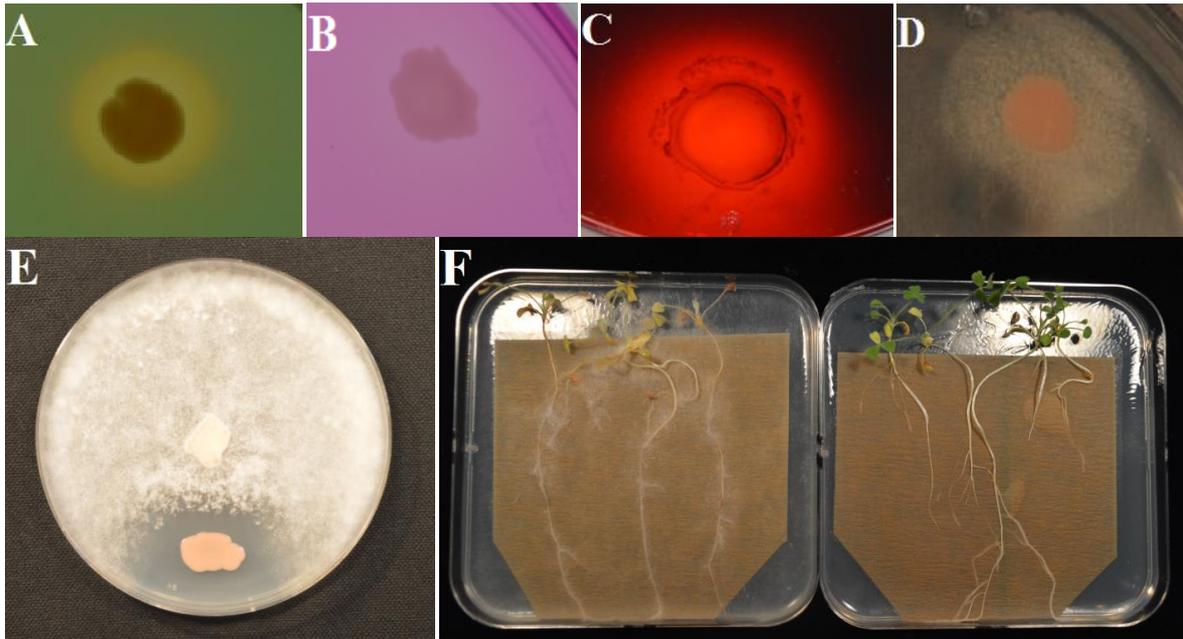


Figure 58. Activités PGP de l'isolat RSRod01

A- Production des sidérophore, **B-** Activité uréasique, **C-** Activité cellulosique,
D- Activité estérasique, **E-** Activité antifongique *in vitro*, **F-** Activité antifongique *in vivo*.

5. 6. Discussion

Depuis des décennies il est admis que les nodules abrités uniquement des bactéries et représentés une niche écologique pour les rhizobia et les endophytes (Peix et al. 2015). Cependant, Thanuja et al. (2020) ont démontré que les nodules peuvent aussi être colonisés par des levures en cohabitation avec les rhizobia.

L'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* appartient aux levures capsulées et produisent des pigmentations de couleur rose. La capsule et les pigments les protègent de différentes conditions de stress (Molinè et al. 2010).

Le genre *Rhodotorula* est isolé de différents environnements, allant des climats extrêmes dans le sol, l'air, la rhizosphère de certaines plantes (Hong et al. 2002 ; Hong et al. 2006) y compris dans les sites contaminés par les métaux lourds (Zhang et al. 2015) et est employé dans la bioremédiation en raison de sa capacité à survivre au stress causé par la présence des métaux lourds (Garza-Gonzalez et al. 2016) et aussi comme agents de bio contrôle ou promoteurs de croissance des plantes (El-Mehalawy 2004 ; Mestre et al. 2011).

Bien que les levures du genre *Rhodotorula* associées aux plantes semblent avoir plusieurs effets bénéfiques sur l'hôte plutôt que des effets délétères, leur interaction avec les plantes et leurs stratégies de vie n'ont pas encore été étudiées (Sen et al. 2019).

Dans la présente étude, l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* montre une bonne croissance sur le milieu sans source d'azote, les résultats obtenus concordent avec ceux observés par Sen et al. (2019) qui ont caractérisé une levure endophyte *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1 résistante aux métaux lourds et capable de se développer sans azote.

Le genre *Rhodotorula* a fait l'objet d'une attention particulière pour sa capacité à se développer en l'absence de source d'azote (Nemeth et al. 1959). Bien que les auteurs n'aient pas signalé d'endosymbiont dans leur étude, Firrincieli et al. (2015) ont signalé que *R. graminis* WP1 possède un gène de dinitrogène réductase (*nifH*) (Knoth et al. 2014).

La propriété de fixation de N₂ est absente chez les eucaryotes, cependant, selon Sen et al. (2019) les souches de *Rhodotorula* ne pourraient pas convertir les nitrates et nitrites en ammonium mais peuvent améliorer la fixation de l'azote en s'associant avec des microbes fixateurs de N₂ permettant aux deux partenaires d'exploiter des niches difficiles. L'azote semble être l'un des facteurs critiques contrôlant les associations symbiotiques entre les

bactéries et les plantes. Parmi les exemples d'interactions susceptibles d'améliorer la nutrition azotée des eucaryotes associés, *Rhodotorula mucilaginosa*, les endobactéries fixatrices de N₂ (*Pseudomonas stutzeri*) et la plante (Paul et al. 2019).

Paul et al. (2019) suggèrent que l'environnement au sein de la levure facilite la fixation de N₂ par les endobactéries diazotrophes, ce qui rappelle la fixation de N₂ de *Rhizobium* au sein d'un nodule racinaire.

Les tests d'activités enzymatiques et de promotion potentielle de la croissance des plantes montrent que la l'isolat RSRod01 produit trois enzymes : la cellulase, l'uréase et l'estérase. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire des plantes (Schulz et Boyle 2005). Par conséquent, la présence de ces enzymes peut aider les levures rhizosphériques à coloniser la rhizosphère.

Nos résultats montrent également que la levure RSRod01 produit les sidérophore et également les molécules antifongiques. Auparavant, il a été signalé que certains champignons, y compris la levure du genre *Rhodotorula*, pouvaient produire les sidérophore dans des conditions de carence en fer, ce qui exerce un effet antagoniste contre d'autres champignons filamenteux (Calvente et al. 2001). Il a été signalé que le sidérophore pourrait augmenter la résistance des producteurs aux métaux lourds ou aux métalloïdes (Schalk et al. 2011), améliorer la fertilité du sol et inhiber les champignons pathogènes (Ali et Vidhale 2013).

En cas de stress dû aux métaux lourds, les champignons peuvent affecter l'absorption des métaux lourds et la tolérance des plantes hôtes (Li et al. 2011). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur les levures associées aux plantes résistantes aux métaux lourds. Dans notre étude, la levure RSRod01 présente une bonne croissance en présence des métaux lourds la CMI atteint 1300 µg/ml de Pb⁺⁺, 500 µg/ml de Cu⁺⁺, 400 µg/ml de Co⁺⁺, 300 µg/ml de Zn⁺⁺ et de Ni⁺⁺, 200 µg/ml de Cd⁺⁺ respectivement.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent également que l'ordre de résistance de l'isolat RSRod01 est de : Pb⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Co⁺⁺ > Zn⁺⁺ = Ni⁺⁺ > Cd⁺⁺ > Cr^{VI+}.

Ramos-Garzaet al. (2015) ont caractérisé deux souches du genre *Rhodotorula* endophyte résistantes aux métaux lourds, qui sont résistantes au zinc, plomb et cuivre, et qui peuvent améliorer la croissance et l'extraction des métaux lourds des plantes inoculées.

Kan et al. (2019) ont également isolée une souche *Rhodotorula mucilaginosa* AN5 qui a une très bonne résistance au plomb, cadmium, cuivre et chrome.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion générale

Les effets toxiques des métaux lourds sur la biosphère ont attiré l'attention des chercheurs sur la nécessité de développer des solutions appropriées pour éliminer ces polluants de l'environnement. Bien que de nombreuses stratégies physicochimiques et biologiques aient été développées, la phytoremédiation est une approche très fiable et efficace pour l'élimination des métaux.

L'utilisation des micro-organismes associés aux légumineuses isolés des sols miniers sont plus efficaces pour augmenter la résistance des plantes aux stress abiotiques que ceux isolés d'habitats non stressés, ces microorganismes peuvent être utilisés pour augmenter la croissance et éventuellement le rendement des plantes cultivées et pour engendrer une agriculture durable dans les zones affectées par le stress.

Le trèfle (*Trifolium*) est une légumineuse qui a été choisie dans notre étude en raison de ses capacités à tolérer des conditions de croissance difficiles, le stress abiotique et même biotique.

Cette étude est réalisée dans le but d'isoler, identifier et de caractériser les rhizobactéries présentes dans les nodules racinaires des légumineuses du genre *Trifolium* isolées de la mine Djedada de plomb et zinc situé à Hammam N'Bail dans la région de Guelma.

Le séquençage de l'ARNr 16S, des 49 isolats révèle une grande diversité bactérienne, les isolats identifiés appartiennent aux genres suivants ; *Rhizobium*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Roseomonas*, *Paracoccus*, *Frondehabitans*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Providencia*, *Micrococcus* et *Staphylococcus*. En plus des bactéries, une levure est isolée et identifiée comme *Rhodotorula mucilaginosa* par séquençage de la région ITS (Internal Transcribed Spacer).

Les analyses phylogénétiques des deux gènes de symbioses *nodC* et *nifH* montrent que les isolats *Rhizobium* sp. appartiennent au symbiovar trifolii.

Notre recherche montre que les isolats qui vivent en association avec la légumineuses *Trifolium* récoltée d'un sol minier sont très tolérantes aux métaux lourds. La concentration maximale de tolérance aux métaux lourds des isolats atteint jusqu'à 1300 µg/ml de Pb⁺⁺, 1200 µg/ml de Zn⁺⁺, 1000 µg/ml de Ni⁺⁺, 1000 µg/ml de Cd⁺⁺, 500 µg/ml de Cu⁺⁺, 400 µg/ml de

Co⁺⁺ et 50 µg/ml de Cr^{VI+} et l'ordre de résistance des isolats aux métaux lourds est : Pb⁺⁺ > Zn⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Co⁺⁺ > Cr^{VI+}.

L'amplification par PCR des deux gènes *czcD* et *nccA* responsables de la résistance au zinc, cadmium, cobalt et nickel est réalisée sur les quatre isolats suivants : *Cupriavidus paucula* RSCup01, *Acinetobacter beijerinckii* RSAci01, *Pseudomonas putida* RSPs01, *Pseudomonas* sp. RSPs02. Les résultats montrent que les deux gènes sont détectés seulement chez l'isolat *Cupriavidus paucula* RSCup01.

Nous avons aussi testé la tolérance des isolats à la salinité et les résultats montrent qu'ils ont une capacité remarquable à se développer à une concentration de NaCl allant jusqu'à 20%. Nous pouvons dire que la majorité des isolats qui résistent aux métaux lourds tolèrent de fortes concentrations en NaCl.

La plupart des isolats étudiés montrent également un fort potentiel pour produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes tel que la solubilisation des phosphates, la production des sidérophores (fer), des enzymes extracellulaires et des molécules antifongiques.

Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives et pourraient également servir de base pour des travaux ultérieurs:

- Préciser la position taxonomique de nos isolats via un séquençage complet du génome.
- Séquencer d'autres gènes de résistances aux métaux lourds.
- Utiliser nos isolats dans des essais de dépollution des sols contaminés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdelguerfi A et Abdelguerfi-Laouar M, Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral: Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen, Cahiers Options Méditerranéennes, 2004, 62:29-41.
- Abdelkrim S, Jebara S.H, Saadani O, Chiboub M, Abid G, Mannai K et Jebara M, Heavy metal accumulation in *Lathyrus sativus* growing in contaminated soils and identification of symbiotic resistant bacteria, Arch Microbiol, 2019, 201:107-121.
- Abdelkrim S, Jebara S.H, Saadani O, Abid G, Taamalli W, Zemni H, Mannai K, Louati F et Jebara M, In situ effects of *Lathyrus sativus*- PGPR to remediate and restore quality and fertility of Pb and Cd polluted soils, Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 192:110260.
- Abou-Shanab R.A, Van Berkum P et Angle J.S, Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*, Chemosphere, 2007, 68:360-7.
- Acikgoz E, Yem Bitkileri (Fodder Plants), Uludag University Press, Bursa, 2001,182.
- Ahmad E, Zaidi A, Khan M.S et Oves M, Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes, In: Zaidi A et al (eds) Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation, Wien, 2012, pp. 29-44.
- Ali H, Khan E et Sajad M.A, Phytoremediation of heavy metals concepts and applications, Chemosphere, 2013, 91:869e881.
- Ali H, Khan E et Ilahi I, Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation, J. Chem, 2019, 6730305.
- Ali S.S et Vidhale N.N, Bacterial siderophore and their application: a review, Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 2013, 2:303-331.
- Amari T, Ghnaya T et Abdelly C, Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction, South Afric J Bot, 2017, 111:99-110.
- Andrés J.A, Rovera M, Guiñazú L.B, Pastor N.A et Rosas S.B, Interactions between legumes and rhizobia under stress conditions, In: Maheshwari DK (ed) Bacteria in agrobiolgy: stress management, Berlin, 2012, pp. 77-94.
- Arif S, Shahzad S.M, Yasmeen T, Riaz M, Ashraf M, Ashraf M.A, Mubarik M.S et Kausar R, In: Naeem, M., et al. (Eds.), Improving Plant Phosphorus (P) Acquisition by Phosphate-Solubilizing Bacteria, Springer International Publishing AG, Essential Plant Nutrients, 2017, pp. 513-556.

- Aserse A.A, Räsänen LA, Aseffa F, Hailemariam A et Lindström K, Diversity of sporadic symbionts and non-symbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97:10117-10134.
- Ashraf S, Ali Q, Zahir Z.A, Ashraf S et Asghar H.N, Phytoremediation: environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils, *Eco. Env. Saf*, 2019, 174:714-727.
- Ayangbenro A.S et Babalola O.O, A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2017, 14:94.
- Ayotamuno J.M, Kogbara R.B et Egwuenum P.N, Comparison of corn and elephant grass in the phytoremediation of a petroleum-hydrocarboncontaminated agricultural soil in Port Harcourt, Nigeria, *J. Food Agric. Environ*, 2006, 4:218e222.
- Azimi A, Azri A, Rezkazemi M et Ansarpour M, Removal of heavy metals from industrial wastewaters: a review, *Chem Bio Eng Reviews*, 2017, 4:37-59.

B

- Balakrishnan B, Sahu B.K, Ranishree J.K, Lourduraj A.V, Nithyanandam M, Packiriswamy N et Panchatcharam P, Assessment of heavy metal concentrations and associated resistant bacterial communities in bulk and rhizosphere soil of *Avicennia marina* of Pichavaram mangrove, India, *Environmental Earth Sciences*, 2017, 76 (1):58.
- Bandowe B.A, Bigalke M, Boamah L, Nyarko E, Saalia F.K et Wilcke W, Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): bioaccumulation and health risk assessment, *Environ Int*, 2014, 65:135-46.
- Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C et Mengoni A, Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*, *Microb Ecol*, 2007, 53:306-316.
- Basu A, Prasad P, Das S.N, Kalam S, Sayyed R.Z, Reddy M.S et El Enshasy H, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants:Recent Developments, Constraints, and Prospects, *Sustainability*, 2021, 13:1140.
- Benidire L, Pereira S.I.A, Castro P.M.L et Boularbah A, Assessment of plant growth promoting bacterial populations in the rhizosphere of metallophytes from the Kettara mine Marrakech, *Environ. Sci. Pollut. Res*, 2016, 23:21751e21765.
- Boland G.J et Hall R, Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Can J Plant Pathol*, 1994, 16:93100.

- Borowik A, Wyszowska J, Kucharski J, Baćmaga M et Tomkiel M, Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor, *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24:1910-1925.
- Borymski S, Cycon M, Beckmann M, Mur L.A.J et Piotrowska-Seget Z, Plant Species and Heavy Metals Affect Biodiversity of Microbial Communities Associated With Metal-Tolerant Plants in Metalliferous Soils, *Front Microbiol*, 2018, 9:1425.
- Bowen G.D et Rovira A.D, The rhizosphere and its management to improve plant growth, *Advances in Agronomy*, 1999, 66:1-102.
- Bravo G, Vega-Celedón P, Gentina J.C et Seeger M, Bioremediation by *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 of Mercury-Polluted Agricultural Soil in a Rotary Drum Bioreactor and Its Effects on Nitrogen Cycle Microorganisms, *Microorganisms*, 2020, 8(12):1952.
- Brown M.R et Foster J.H, A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*, *J Clin Pathol*, 1970, 23:172-7.

C

- Calvente V, de Orellano M.E, Sansone G, Benuzzi D et Sanz de Tosetti M.I, Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 4:226-9.
- Cardoso P, Alves A, Silveira P, Sá C, Fidalgo C, Freitas R et Figueira E, Bacteria from nodules of wild legume species: phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance, *Sci Total Environ*, 2018, 645:1094-1102.
- Carrim A.J.I, Barbosa E.C et Vieira J.D.G, Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinhado-campo), *Braz Arch Biol Technol*, 2006, 49:353-359.
- Changqing Z, Huan L, Denghong W, Yuchuan C, Zongyao R, Debo L, Yue W, Fudong J, Zhenghui C et Xuyang M, A preliminary review of metallogenic regularity of Pb-Zn deposits in China, *Acta Geologica Sinica*, 2015, 4:1333-58.
- Cuypers A, Remans T et Weyens N, Soil-plant relationships of heavy metals and metalloids. In: Alloway BJ (ed) *Heavy metals in soils*, Springer, Dordrecht, 2015, pp. 161-193.

D

- Das R et Jayalekshmy V.G, Mechanism of heavy metal tolerance and improvement of tolerance in crop plants, *J Glob Biosci*, 2015, 4:2678-2698.

- De-Bashan L.E, Hernandez J.P, Bashan Y et Maier R.M, *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings, *Environ Exp Bot*, 2011, 69:343-352.
- Deb M et Sarkar S.C, Minerals and allied natural resources and their sustainable development, Singapore: Springer Geology, 2017.
- Del Busso Zampieri B, Bartelochi Pinto A, Schultz L, De Oliveira M.A, De Oliveira A.J.F et Zampieri B.D.B, Diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in polluted sediments of the araça bay, são sebastião (SP), and the relationship between heavy metals and organic matter concentrations, *Microb. Ecol*, 2016, 72:1-13.
- Delarras C, Microbiologie. In : 90 heures de travaux pratiques, Editer par Gaëtan Morin, 1998, pp.124-126.
- Delarras C, Pratique en microbiologie de laboratoire, Lavoisier, 2014, pp. 144.
- Deschatre M, Ghillebaert F, Guezennec J et Colin C.S, Sorption of copper(II) and silver(I) by four bacterial exopolysaccharides, *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171:1313-27.
- De Meyer S.E, De Beuf K, Vekeman B et Willems A, A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium), *Soil Biol Biochem*, 2015, 83:1-11.
- De Meyer S.E, Van Hoorde K, Vekeman B, Braeckman T et Willems A, Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in diferent regions of Flanders (Belgium), *Soil Biol Biochem*, 2011, 43:2384-2396.
- Direction générale des mines, Algérie, 2015.

E

- Efrose R.C, Rosu C.M, Stedel C, Stefan A, Sirbu C, Gorgan L.D, Labrou N.E et Flemetakis E, Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2018, 111:135-153.
- Efstathiadou E, Savvas D et Tampakaki A.P, Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece, *Syst Appl Microbiol*, 2020, 43:126149.
- Elci S, Baklagil ve Bugdaygil Yem Bitkileri (Leguminosae and Gramineae Fodder Plants), Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Rural Affairs Press: Ankara, 2005.
- El-Helow E.R, Sabry S.A et Amer R.M, Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations, *Biometals*, 2000, 13:273-80.

- Ellison N.W, Liston A, Steiner J.J, Williams W.M et Taylor N.L, Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39:688-705.
- El-Mehalawy A, The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*, *Int. J. Agri. Biol*, 2004, 6:310-316.
- Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F et Xie Y, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response, *Sci World J*, 2015, 2015:1-18.
- Etesami H, Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects, *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 2018, 147:175-191.
- Etesami H et Beattie G.A, Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions, *Probiotics and Plant Health*, 2017, Singapore, pp. 163-200.
- Etesami H et Beattie G.A, Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops, *Front Microbiol*, 2018, 9:148.
- Etesami H et Maheshwari D.K, Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects, *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 2018, 156:225-246.

F

- Fan M, Liu Z, Nan L, Wang E, Chen W, Lin Y et Wei G, Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area, *Microbiol Res*, 2018, 217:51-59.
- Felsenstein J, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 1985, 39:783-791.
- Ferchichi N, Toukabri W et Boularess M, Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil, *Arch. Microbiol*, 2019.
- Firriencieli A, Otilar R et Salamov A, Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1, *Front. Microbiol*, 2015, 6:978.
- Frérot H, Lefèbvre C, Gruber W et Collin C, Dos Santos A et Escarré J, Specific interactions between local metalicolous plants improve the phytostabilization of mine soils, *Plant Soil*, 2006, 282:53-65.

Fuge R, Glove S.P, Pearce N.J et Perkins W.T, Some observations on heavy metal concentrations in soils of the Mendip region of north Somerset, *Environ. Geochem. Health*, 1991, 13:193-196.

G

García-Moyano A, González-Toril E, Aguilera Á et Amils R, Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment, *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 81:303-14.

Garza-Gonzalez M.T, Perez D.B, Rodriguez A.V, Garcia- Gutierrez D.I, Zarate X, Cardenas M.E.C et Medina-Ruiz P, Correction: Metal-induced production of a novel bioadsorbent exopolysaccharide in a native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican northeastern region, *PloS one*, 2016, 11:e0150522.

Gerber U, Hübner R, Rossberg A, Krawczyk-Bärsch E et Merroun M.L, Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine, *PLoS One*, 2018, 13(8):e0201903.

Gerlagh M, Goossen-van de Geijn H, Fokkema N et Vereijken P, Long term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*, infected crops *Phytopathology*, 1999, pp. 141-147.

Giller K.E, Witter E et McGrath S.P, Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review, *Soil Biol Biochem*, 1998, 30:1389-1414.

Giovanella P, Cabral L, Bento F.M, Gianello C et Camargo F.A, Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A, *N Biotechnol*, 2016, 33:216-23.

Glick B.R, *Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and Applications*, Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, 2012.

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami V.K et Chauhan B, Microbial α Amylases : a biotechnological perspective, *Process Biochem*, 2003, 38 :1599-1616.

H

Habi S et Daba H, Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among enterobacteriaceae isolated from Algerian streams, *Pak J Biol Sci*, 2009, 12:1474-82.

Hall J.L, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J Exp Bot*, 2002, 53:1-11.

- Hao X, Taghavi S, Xie P, Orbach M.J, Alwathnani H.A, Rensing C et Wei G, Phytoremediation of heavy and transition metals aided by Legume-Rhizobia Symbiosis, *Int J Phytorem*, 2014, 16:179-202.
- Hardy R.W.F, Holsten R.D, Jackson E.K et Burns R.C, The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation, *Plant Physiol*, 1968, 43:1185-1207.
- Hassan M.K, McInroy J.A et Kloepper J.W, The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere, *Agriculture*, 2019, 9:142.
- Hong S.G, Lee K.H et Bae K.S, Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea, *J. Microbiol*, 2002, 40:55-62.
- Hong S.G, Lee K.H et Kwak J, Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*, *J. Microbiol*, 2006, 44:674-679.
- Hu N et Zhao B, Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2, *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 267:17-22.
- Huynh T.M.D, Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique, Thèse de doctorat, Université Paris est, France, 2009, pp. 7-10.
- Ibañez F, Angelini J, Taurian T, Tonelli M.L et Fabra A, Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria, *Syst and Appl Microbiol*, 2009, 32:49-55.

I

- Idris R, Trivonova R, Puschenreiter M, Monchy S, Wenzel W.W et Sessitch A, Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni-hyperaccumulator *Thlaspi geosingense*, *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:2667-2677.

J

- Jacob J.M, Karthik C, Saratale R.G, Kumar S.S, Prabakar D, Kadirvelu K et Pugazhendhi A, Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature, *J. Environ. Manage*, 2018, 217:56-70.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A et Herouart D, H₂O₂ is required for an optimal establishment of the *Medicago / Sinorhizobium meliloti* symbiosis, *JB Accepts*, 2007 (non publie).
- 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.
- Jiang J, Pan C, Xiao A, Yang X et Zhang G, Isolation, identification, and environmental adaptability of heavy-metal-resistant bacteria from ramie rhizosphere soil around mine refinery, *3 Biotech*, 2017, 7(1):5.

Jordan D.C, "Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL" In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st éd. (N. R.) Krieg, (J. G.) Holt édés, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984, pp. 234-256.

Joyati D et Priyabrata S, Remediation of arsenic in mung bean (*Vigna radiata*) with growth enhancement by unique arsenic-resistant bacterium *Acinetobacter lwoffii*, Sci. Total Environ, 2018, 624:1106-1118.

K

Kan G, Wang X, Jiang J, Zhang C, Chi M, Ju Y et Shi C, Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN5 isolated from sea ice, Antarctic, Microbiology open, 2019, 8(3):e00657.

Kandeler E, Tschirko D, Bruce K.D, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett R.D et Amelung W, Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biology and Fertility of Soils, 2000, 32:390-400.

Karelová E, Harichová J, Stojnev T, Pangallo D et Ferianc P, The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal contaminated site, Biologia, 2011, 66:18-26.

Keskin M, The genus *Trifolium* L. Sect. Chronosemium (Fabaceae) in Turkey, In Plants of the Balkan Peninsula: in to the next Millennium, 2001.

Khalid S, Shahid M, Niazi N.K, Murtaza B, Bibi I et Dumat C, A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils, J. Geochem. Explor, 2017, 182: 247-268.

Knoth J.L, Kim S.H, Ettl G.J et Doty S.L, Biological nitrogen fixation and biomass accumulation within poplar clones as a result of inoculations with diazotrophic endophyte consortia, New Phytol, 2014, 201:599-609.

Kuang J, Hou Y.P, Wang J.X et Zhou M.G, Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to fludioxonil: in vitro determination of baseline sensitivity and resistance risk, Crop Protection, 2011, 30:876-882.

Kulakovskaya T, Ryazanova L, Zvonarev A, Khokhlova G, Ostroumov V et Vainshtein M, The biosorption of cadmium and cobalt and iron ions by yeast *Cryptococcus humicola* at nitrogen starvation, Folia Microbiol (Praha), 2018, 63:507-510.

Kumar N.R, Arasu V.T et Gunasekaran P, Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*, Curr Sci, 2002, 82:1463-1466.

Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C et Negi S, Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth

promotion (PGP) activities: an in vitro study, Recent Res. Sci. Technol, 2012, 4:01-05.

Kumar S, Stecher G et Tamura K, MEGA7: Mol. Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, Mol Biol Evol, 2016, 33:1870-1874.

L

Laguerre G, Nour S.M, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P et Amarger N, Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts, Microbiology, 2001, 147:981-993.

Leita L, De Nobili M, Muhlbachova G, Mondini C, Marchiol L et Zerbi G, Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation, Biol. Fertil. Soils, 1995, 19:103-108.

Leite J, Fischer D, Rouws L.F.M, Fernandes-Júnior P.I, Hofmann A, Kublik S, Schloter M, Xavier G.R et Radl V, Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype, Front Plant Sci, 2017, 7:2064.

Li T, Liu M.J, Zhang X.T, Zhang H.B, Sha T et Zhao Z.W, Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*, Sci Total Environ, 2011, 409:1069-74.

Li F, Wang W, Li C, Zhu R, Ge F, Zheng Y et Tang Y, Self-mediated pH changes in culture medium affecting biosorption and biomineralization of Cd²⁺ by *Bacillus cereus* Cd01, J Hazard Mater, 2018, 358:178-186.

Liu S.H, Zeng G.M, Niu Q.Y, Liu Y, Zhou L, Jiang L.H, Tan X.F, Xu P, Zhang C et Cheng M, Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review, Bioresour Technol, 2017, 224:25-33.

Liu C, Lin H, Dong Y, Li B et Liu Y, Investigation on microbial community in remediation of lead-contaminated soil by *Trifolium repens* L, Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 165:52-60.

M

Ma Y, Rajkumar M et Freitas H, Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria, Journal of Hazardous Materials, 2009, 166: 1154-1161.

Malik A, Metal bioremediation through growing cells, Environment International, 2004, 30: 261-278.

Meena V.S, Maurya B.R, Verma J.P, Aeron A, Kumar A, Kim K et Bajpai V.K, Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica, Ecol. Eng, 2015, 81:340-347.

- Mehes-Smith M, Nkongolo K et Cholewa E, Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil. In: Silvern S, Young S (eds) Environmental change and sustainability, InTech, Rijeka, 2013, pp. 1-39.
- Merdas B, Contribution à l'étude géologique des minéralisations de la région de Hammam N'bail (Nord Est algérien), Thèse Magister. USTHB, Alger, 2006.
- Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyns K, Wattiau P et Smolders E, Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil, Environ Microbiol, 2006, 12:2170-8.
- Mestre M.C, Rosa C.A et Safar S.V, Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina, FEMS. Microbiol. Ecol, 2011, 78:531-541.
- Moline M, Flores M.R et Libkind D, Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin, Photochem. Photobiol. Sci, 2010, 9:1145-1151.
- Monsieurs P, Moors H, Van Houdt R, Janssen R.P, Janssen A, Coninx I, Mergeay M et Ley N, Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network, Biometals, 2011, 24:1133-1151.
- Missbah El-Idrissi M, Lamin H, Bouhnik O, Lamrabet M, Alami S, Jabrone Y, Bennis M, Bedmar EJ et Abdelmoumen H, Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar viciae in *Rhizobium acidisoli*, Syst Appl Microbiol, 2020, 43:126084.
- Mudd G.M, Jowitt S.M et Werner T.T, The world's lead-zinc mineral resources: Scarcity, data, issues and opportunities, Ore Geology Review, 2017, 80:1160-90.

N

- Nayak T, De D, Barman C, Karmakar P, Deb A et Dhal P.K, Characterization of indigenous bacteria from radon-rich groundwater and their tolerance to physicochemical stress, Int. J. Environ. Sci. Technol, 2020, 17:1627-1636.
- Nemeth G, Nature, 1959, 183:1460-1461.
- Niazi N.K, Bishop T.F.A et Singh B, Evaluation of spatial variability of soil arsenic adjacent to a disused cattle-dip site, using model-based geostatistics, Environ. Sci. Technol, 2011, 45:10463-10470.
- Niazi N.K, Singh B et Minasny B, Mid-infrared spectroscopy and partial leastsquares regression to estimate soil arsenic at a highly variable arsenic-contaminated site, Int. J. Environ. Sci. Tech, 2015, 12:1965-1974.

- Nies D.H, *CzcR* and *CzcD*, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*, *J Bacteriol*, 1992, 174:8102-8110.
- Nies D.H, Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27:313-39.
- Nonnoi F, Chinnaswamy A, García de la Torre V.S, Coba de la Pena T, Lucas M.M et Pueyo J.J, Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils, *Applied Soil Ecology*, 2012, 61:49-59.

O

- Ojuederie O.B et Babalola O.O, Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review, *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(12): 1504.
- Oldroyd G.E, Murray J.D, Poole P.S et Downie J.A, The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis, *Annu Rev Genet*, 2011, 45:119-44.
- Olenska E et Małek W, Genetic differentiation of *Trifolium repens* microsymbionts deriving from Zn–Pb waste-heap and control area in Poland, *J Basic Microbiol*, 2015, 55:462-470.
- Olenska E, Imperato V, Małek W, Włostowski T, Wójcik M, Swiecicka I, Vangronsveld J et Thijs S, *Trifolium repens*-Associated Bacteria as a Potential Tool to Facilitate Phytostabilization of Zinc and Lead Polluted Waste Heaps, *Plants*, 2020, 9:1002.
- Olowu R.A, Adewuyi G.O, Onipede O.J, Lawal O.A, Sunday O.M, Olowu R.A, Adewuyi G.O, Onipede O.J, Lawal O.A et Sunday O.M, Concentration of heavy metals in root, stem and leaves of *Acalypha indica* and *Panicum maximum* jacq from three major dumpsites in ibadan metropolis, south west Nigeria, *Am. J. Chem*, 2015, 5:40e48.

P

- Pajuelo E, Rodríguez-Llorente I.D, Lafuente A et Caviedes M.Á, Legume–*Rhizobium* Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. In: Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J (eds) *Bio management of metal-contaminated soils, Environmental pollution*, 2011, Dordrecht, pp. 95-123.
- Pardo R, Herguedas M, Barrado E et Vega M, Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*, *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376:26- 32.
- Patel J.K et Archana G, Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat, *Plant Soil*, 2017, 417:99-116.

- Patel P.R, Shaikh S.S et Sayyed R.Z, Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron, *Environmental Sustainability*, 2018, 1:81-87.
- Paul K, Chinmay S, Nag M, Mandal D, Naiya H, Sen D, Mitra S, Kumar M, Bose D, Mukherjee G, Naskar N, Lahiri S, Ghosh U, Tripathi S, Sarkar M.P, Banerjee M, Kleinert A, Valentine A.J, Tripathy S, Sinharoy S et Seal A, Tripartite interaction among the basidiomycete *Rhodotorula mucilaginosa*, N₂-fixing endobacteria, and rice improves nitrogen nutrition in plants, *Plant Cell*, 2019, 32:486-507.
- Peix M.H, Ramírez-Bahena E, Velázquez A et Bedmar E.J, Bacterial associations with legumes, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2015, pp. 17-42.
- Pereira S.I.A et Castro P.M.L, Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils, *Environ. Sci. Pollut. Res*, 2014, 21:14110-14123.
- Pereira S.I.A, Barbosa L et Castro P.M.L, Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in Zn and Cd contaminated sites, *Int. J. Environ. Sci. Technol*, 2015, 12:2127-2142.
- 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*, 2017, 5:14-17.
- Pikovskaya R.I, Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species, *Microbiol*, 1948, 17:362-370.
- Prasad M.N.V et Freitas H.M.D, Metal hyperaccumulation in plants—biodiversity prospecting for phytoremediation technology, *Electron J Biotechnol*, 2003, 93:285-321.
- Pulsawat W, Leksawasdi N, Rogers P.L et Foster L.J, Anions effects on biosorption of Mn(II) by extracellular polymeric substance (EPS) from *Rhizobium etli*, *Biotechnol Lett*, 2003, 25:1267-70.

R

- Rajkumar M, Ae N, Prasad M.N et Freitas H, Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction, *Trends Biotechnol*, 2010, 28:142-9.
- Ramanjaneyulu A.V, Neelima T.L, Madhavi A et Ramprakash T, Phytoremediation: an overview. In: Humberto, R.M., Ashok, G.R., Thakur, K., Sarkar, N.C. (Eds.), *Applied Botany*. American Academic Press, 2017, pp. 42-84.
- Ramos-Garza J, Bustamante-Brito R, Ángeles de Paz G, Medina-Canales M.G, Vásquez-Murrieta M.S, Wang E.T et Rodríguez-Tovar A.V, Isolation and characterization of

- yeasts associated with plants growing in heavy-metal- and arsenic-contaminated soils, *Can J Microbiol*, 2016, 62:307-19.
- Rana A, Saharan B, Kabi S.R, Prasanna R, Nain L, Providencia, a PGPR with biocontrol potential elicits defense enzymes in wheat, *Ann Plant Protect Sci*, 2011, 19:138141.
- Rehman K, Fatima F, Waheed I et Akash M.S.H, Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences, *J Cell Biochem*, 2017, 119:157-184.
- Remenár M, Kamlárová A, Harichová J, Zámocký M et Ferianc P, The Heavy-Metal Resistance Determinant of Newly Isolated Bacterium from a Nickel-Contaminated Soil in Southwest Slovakia, *Pol J Microbiol*, 2018, 67:191-201.
- Renvoisé A, Rolain J.M, Socolovschi C et Raoult D, Widespread use of realtime PCR for rickettsial diagnosis, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 64:126-129.
- Rezania S, Ponraj M, Talaiekhosani A, Mohamad S.E, Md Din M.F, Taib S.M, Sabbagh F et Sairan F.M, Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater, *J. Environ. Manag*, 2015, 163:125e133.
- Rezania S, Taib S.M, Md Din M.F, Dahalan F.A et Kamyab H, Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater, *J. Hazard. Mater*, 2016, 318:587e599.
- Robb L, Introduction to ore-forming processes. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005.
- Román-Ponce B, Ramos-Garza J, Vásquez-Murrieta M.S, RiveraOrduña F.N, Chen W.F, Yan J et Wang E.T, Cultivable endophytic bacteria from heavy metal(loid)-tolerant plants, *Arch Microbiol*, 2016, 198:941-956.
- Rösch C, Mergel A et Bothe H, Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil, *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:3818-3829.

S

- Sai S et Khan M.S, Assessment of heavy metals toxicity on plant growth promoting rhizobacteria and seedling characteristics of *Pseudomonas putida* SFB3 inoculated greengram, *Acta Sci. Agric*, 2017, 1:47-56.
- Saïdi S, Chebil S, Gtari M et Mhamdi R, Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates, *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29:1099-1106.
- Saratale G.D, Saratale R.G, Chang J.S et Govindwar S.P, Fixed-bed decolorization of Reactive Blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM-2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge, *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 2011, 65:494e503.

- Sarma H, Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation Technology, *Environ. Sci. Technol*, 2011, 4:118-138.
- Sbabou L, Idir Y, Bruneel O, Le Quéré A et Aurag J, Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Hedysarum spinosissimum* L, growing in mining sites of northeastern region of Morocco, *SOJ Microbiol Infect Dis*, 2016, 4:1-8.
- Schalk I.J, Hannauer M et Braud A, New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance, *Environ Microbiol*, 2011, 13:2844-54.
- Schmidt T et Schlegel H.G, Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A, *J Bacteriol*, 1994, 176:7045-7054.
- Schulz B et Boyle C, The endophytic continuum, *Mycol Res*, 2005, 109:661-86.
- Schwyn B et Neilands J.B, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal Biochem*, 1987, 160:47-56.
- Sen D, Paul K, Saha C, Mukherjee G, Nag M, Ghosh S, Das A, Seal A et Tripathy S, A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint, *DNA Res*, 2019, 26:131-146.
- Sepehri M, Rastin N.S, Rahmani H.A et Alikhani H, Effects of soil pollution by cadmium on nodulation and nitrogen fixation ability of native strains of *Sinorhizobium meliloti*, *J Sci Technol Agric Nat Res*, 2006, 10:153–163.
- Shahid M, Khalid S, Abbas G, Shahid N, Nadeem M, Sabir M, Aslam M et Dumat C, Heavy metal stress and crop productivity, In: Hakeem, K.R. (Ed.), *Crop Production and Global Environmental Issues*, Springer International Publishing, 2015, pp. 1-25.
- Shamseldin A, Carro L, Peix A, Velázquez E, Moawad H et Sadowsky M.J, The symbiovar trifolii of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt, *Syst Appl Microbiol*, 2016, 39:275-279.
- Sharma R, Bhardwaj R, Gautam V, Kohli S.K, Kaur P, Bali R.S, Saini P, Thukral A.K, Arora S et Vig A.P, Microbial Siderophores in Metal Detoxification and Therapeutics: Recent Prospective and Applications, *Plant Microbiome: Stress Response*, Springer, 2018, pp. 337-350.
- Shi Z, Zhang Z, Yuan M, Wang S, Yang M et Yao Q, Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2, *Chemosphere*, 2020, 247:125834.
- Siddiqui Z.A, PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens, In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization*, Springer Netherlands, 2006, pp. 111-142.
- Sierra G, A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1957, 23:15-22.

- Singh B, Kaur R et Singh K, Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek), *Afr. J. Biotechnol*, 2008, 7:3671-3676.
- Singh S.K, Singh P.P et Gupta A, Tolerance of heavy metal toxicity using PGPR strains of pseudomonas species. In: Singh AK, Kumar A, Singh PK (eds) *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, Elsevier, Amsterdam, 2019, pp. 239-252.
- Smibert R.M et Krieg N.R, Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 1994, pp. 611-651.
- Somasegaran P et Hoben H.G, *Methods in Legume Rhizobium Technology*, United States Agency for International Development (USAID), 1985.
- Somasegaran P et Hoben H.J, *Handbook for Rhizobia, Methods in Legume-Rhizobium Technology*, New York, 1994, pp. 240-58.
- Sumiahadi A et Acar R, A review of phytoremediation technology: heavy metals uptake by plants, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 2018, 142: 012023.
- Sun L.N, Zhang Y.F, He L.Y, Chen Z.J, Wang Q.Y, Qian M et Sheng X.F, Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland, *Bioresour Technol*, 2010, 101:501-509.

T

- Tak H.I, Ahmad F et Babalola O.O, Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals, *Rev Environ Contam Toxicol*, 2013, 223:33-52.
- Taniguchi J, Hemmi H, Tanahashi K, Amano N, Nakayama T et Nishino T, Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. strain HZM-1, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54:581-8.
- Teitzel G.M et Parsek M.R, Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:2313-20.
- Thanuja K.G, Annadurai B, Thankappan S et Uthandi S, Non-rhizobial endophytic (NRE) yeasts assist nodulation of *Rhizobium* in root nodules of blackgram (*Vigna mungo* L.), *Arch Microbiol*, 2020.
- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L et Du B, Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere, *Braz J Microbiol*, 2009, 40:276-284.
- Tiwari S et Lata C, Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microbes: An Overview, *Front Plant Sci*. 2018, 9:452.

Tong Y.P, Kneer R et Zhu Y.G, Vacuolar compartmentalization: a second- generation approach to engineering plants for phytoremediation, Trends Plant Sci, 2004, 9:7-9.

Tsegaye Z, Yimam M, Bekele D, Chaniyalew S et Assefa F, Characterization and identification of native Plant Growth-Promoting Bacteria colonizing Tef (*Eragrostis Tef*) rhizosphere during the flowering stage for a Production of bio inoculants, Biomed J Sci & Tech Res, 2019, 22:16444-16455.

U

Ullah A, Heng S, Munis M.F.H, Fahad S et Yang X, Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review, Environ. Exper. Bot, 2015, 117:28e40.

V

Vijayaraghavan K et Yun Y.S, Bacterial biosorbents and biosorption, Biotechnol. Adv, 2008, 26:266-291.

Vincent J.M, A manual for the practical study of root nodule bacteria, IBP handbook 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

Voica D.M, Bartha L, Banciu H.L et Oren A, Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea, FEMS Microbiol Lett, 2016, 363(14):fnw146.

W

Wang L, Lin H, Dong Y, He Y et Liu C, Isolation of vanadium resistance endophytic bacterium PRE01 from *Pteris vittata* in stone coal smelting district and characterization for potential use in phytoremediation, J Hazard Mater, 2018, 341:1-9.

Wani P.A, Khan M.S et Zaidi A, Effect of metal-tolerant plant growth-promoting Rhizobium on the performance of pea grown in metal-amended soil, Arch. Environ. Contam. Toxicol, 2008, 55:33-42.

Weisburg W.G, Barns S.M, Pelletier D.A et Lane D.J, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, J Bacteriol, 1991, 173:697-703.

Wheaton G, Counts J, Mukherjee A, Kruh J et Kelly R, The confluence of heavy metal biooxidation and heavy metal resistance: implications for bioleaching by extreme thermoacidophiles, Minerals, 2015, 5:397-451.

White T.J, Bruns T.D, Lee S.B et Taylor J.W, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), Academic Press, San Diego, 1990.

Wong M.H, Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils, *Chemosphere*, 2003, 50:775–780.

X

Xiong T, Leveque T, Shahid M, Foucault Y, Mombo S et Dumat C, Lead and cadmium phytoavailability and human bioaccessibility for vegetables exposed to soil or atmospheric pollution by process ultrafine particles, *J Environ Qual*, 2014, 43:1593-1600.

Y

Yadav S.K, Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants, *S Afr J Bot*, 2010, 76:167-179

Yang W, Li P, Rensing C, Ni W et Xing S, Biomass, activity and structure of rhizosphere soil microbial community under different metallophytes in a mining site, *Plant soil*, 2018, 434:245-262.

Yang F, Wu J, Zhang D, Chen Q, Zhang Q et Cheng X.L, Soil bacterial community composition and diversity in relation to edaphic properties and plant traits in grasslands of southern China, *Appl Soil Ecol*, 2018, 128:43-53.

Ye D, Li T, Liu J, Yi Y, Zou L, Zhang X et Xie M, Characteristics of endophytic bacteria from *Polygonum hydropiper* and their use in enhancing P-phytoextraction, *Plant Soil*, 2020, 448:647-663.

Yin K, Li B, Wang X, Zhang W et Chen L, Ultrasensitive colorimetric detection of Cu²⁺ ion based on catalytic oxidation of L-cysteine, *Biosens Bioelectron*, 2015, 64:81-7.

Young J.P.W, Moeskjær S, Afonin A, Rahi P, Maluk M, James E.K, Cavassim M.I.A, Rashid M.H, Aserse A.A, Perry B.J, Wang E.T, Velázquez E, Andronov E.E, Tampakaki A, Félix J.D.F, González R.R, Youseif S.H, Lepetit M, Boivin S, Jorriin B, Kenicer GJ, Peix A, Hynes M.F, Ramírez-Bahena M.H, Gulati A et Tian C, Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex, *Genes*, 2021, 12:111.

Younis M, Responses of Lablab purpureus-*Rhizobium* symbiosis to heavy metals in pot and field experiments, *World J Agric Sci*, 2007, 3:111-122.

Youseif S.H, Lepetit M, Boivin S, Jorriin B, Kenicer G.J, Peix A, Hynes M.F, Ramírez-Bahena M.H, Gulati A et Tian C, Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex, *Genes*, 2021, 12:111.

Yuan J, Raza W, Shen Q et Huang Q, Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, *Appl. Environ. Microbiol*, 2012, 78:5942-5944.

Yue Z.B, Li Q, Li C.C, Chen T.H et Wang J, Component analysis and heavy metal adsorption ability of extracellular polymeric substances (EPS) from sulfate reducing bacteria, *Bioresour Technol*, 2015, 194:399-402.

Z

Zhang H, Huang T et Chen S, Ignored sediment fungal populations in water supply reservoirs are revealed by quantitative PCR and 454 pyrosequencing, *BMC Microbiol*, 2015,15:44.

Zhang J.J, Liu T.Y, Chen W.F, Wang E.T, Sui X.H, Zhang X.X, Li Y, Li Y et Chen W.X, *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L, *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62: 2737-2742.

Zhang W, Chen L et Liu D, Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93:1305-14.

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.

Zhao L, Xu Y et Lai X, Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growthpromoting properties, *Braz J Microbiol*, 2018, 49: 269-278.

Zohary M, *Trifolium* L., In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, University Press: Edinburgh, 1970, 3:384-448.

Zubair M, Shakir M, Ali Q, Rani N, Fatima N, Farooq S, Shafiq S, Kanwal N, Ali F et Nasir I.A, Rhizobacteria and phytoremediation of heavy metals, *Environ Technol Rev*, 2016, 5:112-119

ANNEXES

Annexe I

Milieu Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA)	
Mannitol	10 g
K₂HPO₄	0,5 g
MgSO₄.7H₂O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
Solution de rouge Congo	10 ml
pH	6.8

Milieu Glucose Peptone Agar (GPA)	
Glucose	5 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
Solution de BCP	100 ml
pH	6.8

Milieu Tryptone Yeast Extract Agar (TY)	
Tryptone peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
CaCl₂ (1M)	10 ml
pH	6.8

Milieu Pikovskaya (PVK)	
Glucose	10 g
Ca₃(PO₄)₂	5 g
MgSO₄.7H₂O	0,1 g
(NH₄)₂SO₄	0.5 g
KCl	0.2 g
FeSO₄.7H₂O	0.002 g
MnSO₄.7H₂O	0.002 g
NaCl	0,2 g
Extrait de levure	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Milieu Fahraeus		
Macro-éléments	NH ₄ NO ₃ (1 M)	1 mM
	CaCl ₂ (1 M)	0,9 mM
	MgSO ₄ (1 M)	0,5 mM
	KH ₂ PO ₄ (1 M)	0,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ (1 M)	0,4 mM
	Citrate de fer (III) ammoniacal (20 mM)	20 µM
Micro-éléments	CuSO ₄ (1 mg/ml)	100 µg/L
	ZnCl ₂ (1 mg/ml)	
	H ₃ BO ₃ (1 mg/ml)	
	Na ₂ MoO ₄ (1 mg/ml)	
	MnCl ₂ (1 mg/ml)	
	Agar Kalys	13g
	pH	7.5

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)	
Glucose	20 g
Pommes de terre	200 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Milieu Gélose nutritive (GN)	
Peptone	5 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2.5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Milieu Gélose à Amidon	
Gélose nutritive	100 ml
Amidon	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 20	
Extrait de levure	5 g
NaNO₃	1 g
CaCl₂. 2H₂O	0,1 g
Tween 20	10 ml

Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
Solution saline	50 ml
pH	6.8

Milieu carboxyméthylcellulose (CMC)	
KH₂PO₄	0.5 g
MgSO₄. 7H₂O	0.25 g
CMC	2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Milieu CAS :

2,7 mg de FeCl₃.6H₂O dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 1,21g/l de chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur bleu foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 1,821g de HDTMA (Hexa méthylammonium bromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 121 °C /15 min.

Annexe II

Solution du Rouge Congo (RC)	
Rouge Congo	0.25 g
Eau distillée	100 ml

Solution de Bleu de Bromothymol (BBT)	
Bleu de bromothymol	0.5 g
Ethanol	100 ml

Solution de pourpre de Bromocrésol (Bromocresol Purple BCP)	
Pourpre de bromocrésol	0.5 g
Ethanol	100 ml

Annexe III

Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de Lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe IV

Séquences du gène ARNr 16S des isolats

>RSCup01 *Cupriavidus pauculus* (MW049066)

GCAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATACG
 ACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 CGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
 GGTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGAC
 GGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGT
 GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGAGGCGGTTTTGTAAGACAGGC
 GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCA
 GAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 GGCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCA
 TTTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAT
 TAAAACCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGA
 TGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAG
 GTGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCAC
 TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
 CCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCGC
 GAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTA
 CGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAA
 CCGCAAGGAGG

>RSCup02 *Cupriavidus pauculus* (MW049067)

GCAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATACG
 ACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 CGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
 GGTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGAC
 GGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGT
 GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGGC
 GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCA
 GAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 GGCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCA
 TTTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAT
 TAAAACCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGA
 TGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAG
 GTGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCAC
 TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
 CCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCGC
 GAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTA
 CGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAA
 CCGCAAGGAGGGCGAT

>RSCup03 *Cupriavidus pauculus* (MW049068)

CAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACA

TCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACGA
 CCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGAT
 TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAC
 GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG
 GTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGACG
 GTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTG
 CGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGGCGGTTTTGTAAAGACAGGCG
 TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAG
 AGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
 GCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCA
 TTTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGA
 TTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTTCG
 ATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTA
 GGTGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCA
 CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG
 GCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCG
 CGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACT
 ACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTA
 ACCGCAAGGAGGGCGATACC

>RSCup04 *Cupriavidus pauculus* (MW049069)

GCAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACG
 ACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 CGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
 GGTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGAC
 GGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
 GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGGCGGTTTTGTAAAGACAGGC
 GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCA
 GAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 GCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCA
 TTTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGA
 TTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTTCG
 ATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTA
 GGTGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCA
 CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG
 GCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCG
 CGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACT
 ACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTA
 ACCGCAAGGAGGGCGA

>RSCup05 *Cupriavidus pauculus* (MW049070)

GTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGNTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATC
 GGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACGACC
 TGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGATTA
 GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
 TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAAT
 TTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
 TGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGACGGT
 ACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCG
 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGGCGGTTTTGTAAAGACAGGCGTG

AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAGAG
 GGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC
 GAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATT
 TCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGC
 AACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGTG
 CCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGNTCGTGTGTCGTGAGATG
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTANNCAAGAGCACTCT
 AGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC
 TTATGGGTANGGCTTACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCANNCCGCGAG
 GGGGAGCTAATCCCAGAANNCGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGT
 GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT

>RSCup06 *Cupriavidus pauculus* (MW049071)

CAGTCGAACCGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACA
 TCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACGA
 CCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGAT
 TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAC
 GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG
 GTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGACG
 GTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTG
 CGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAAGACAGGCG
 TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAG
 AGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
 GCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAAT
 TTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATT
 AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGAT
 GCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGG
 TGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA
 TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCACT
 CTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC
 CCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCG
 AGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTAC
 GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAAC
 CGCAAGGAGGGCGATACCAC

>RSCup07 *Cupriavidus pauculus* (MW049072)

AGTCGAACCGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACAT
 CGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACGAC
 CTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGATT
 AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
 ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAAT
 TTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
 TTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGACGG
 TACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
 GAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAAGACAGGCGT
 GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAGA
 GGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
 CGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATT
 TTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA
 AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATG
 CAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGT
 GCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAT
 GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTC
 TAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCC

CTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGA
 GGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACG
 TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC
 TTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAAC
 GCAAGGAGGNCGAT

>RSCup08 *Cupriavidus pauculus* (MW049073)

GCAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACG
 ACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGTCTGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 CGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCG
 GGTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATTGCTCTGGCTAATACCTGGGGTAGATGAC
 GGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGGT
 GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGGC
 GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCA
 GAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTTGGAGGAATACCGA
 TNGCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGGAT
 TCATTTTCTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCA
 AGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAT
 TCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCA
 TTAGGTGCCCGAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGCAAGA
 GCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCT
 ATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAAC
 CCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCG
 ACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGTCTGTACACACCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGC
 CTAACCGCAAGGAGGGCGAT

>RSMic01 *Microbacterium foliorum* (MW049074)

CCATGCAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAG
 TAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACT
 GGATACGAGTAGCGACCGCATGGTCAGTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCT
 CGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGC
 CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGA
 CGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
 AAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTAT
 CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGG
 AGGCTCAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGG
 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATACAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAG
 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCC
 GTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACG
 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGG
 AACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATG
 GGATACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGT
 GGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCCGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGA
 AGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
 GTACACACCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACCT
 TGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGATCGA

>RSMic02 *Microbacterium foliorum* (MW049075)

CAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA

CGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATA
 CGAGTAGCGACCGCATGGTCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCGG
 CCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAG
 AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAA
 GCGCCGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGA
 ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCT
 CAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTC
 TGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATAACCTG
 GTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGAC
 GCAGTCAACGCATTAAGTTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACT
 CGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATA
 CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTC
 TTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGC
 GAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCG
 GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
 CACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACCC

>RSMic03 *Microbacterium foliorum* (MW049076)

CGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCC
 TGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAGTAGCGACCGCATG
 GTCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGT
 GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACAC
 TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
 GCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTC
 TTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGA
 GCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGCAG
 TGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAA
 TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGC
 TGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAA
 CGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAG
 TTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC
 ACAATCGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
 CATATCAGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGA
 TGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT
 CGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTGCCGGGGTCAACTCG
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGC
 TACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGG
 TCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
 AGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCA
 TGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTGNGGAGGGAGCCGTCGAAG

>RSMic04 *Microbacterium foliorum* (MW049077)

GCAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
 ACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGAT
 ACGAGTAGCGACCGCATGGTCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCG
 GCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGA
 GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
 CTTCCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAA
 AGCGCCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGC
 TCAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCT

CTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCT
 GGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAGTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCCGTGA
 CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG
 GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAAATGGTCAACTCTTTGGACAC
 TCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCATGGGAT
 ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGT
 CTTGGGCTTACGNNTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAG
 CGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTC
 GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCC

>RSMic05 *Microbacterium foliorum* (MW049078)

GGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCCT
 GACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAGTAGCGACCCGATGG
 TCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
 AGGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGG
 GCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
 TTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
 CTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGCAGT
 GGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGNATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAA
 TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGC
 TGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAA
 CGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAG
 TTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC
 ACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
 CATATACGAGAACGGGCCAGAAAATGGTCAACTCTTTGGACTCCTGTAACAGGTGGTGCA
 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
 CGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTGCCGGGGTCAACTCG
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGC
 TACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGG
 TCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
 AGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCA
 TGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACC

>RSMic06 *Microbacterium foliorum* (MW049079)

CAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
 CGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATA
 CGAGTAGCGACCGCATGGTCACTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCGG
 CCTATCAGCTTGTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAG
 AGGGTAGCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAA
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGA
 ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCT
 CAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTC
 TGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTG
 GTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGAC
 GCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAAATGGTCAACTCTTTGGACT
 CGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATA
 CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTC
 TTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGC
 GAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCG

GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
 CACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGNNG
 AGGGAGCCGTCGAA

>RSMic07 *Microbacterium foliorum* (MW049080)

GGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCT
 GACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAGTAGCGACCGCATGG
 TCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
 AGGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
 GCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCT
 TTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGT
 CCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
 CTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGCAGT
 GGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
 GCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCT
 GAGGAGCGAAAGGTTGGGAGCAAACAGGCTTAGATAACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAAC
 GTTGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGT
 TCCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
 CAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC
 ATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCAT
 GGTGTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC
 GTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTGCCGGGGTCAACTCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGNNTGCT
 ACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGT
 CCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA
 GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCAGTCAT
 GAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCG

>RSMic08 *Microbacterium foliorum* (MW049081)

GCAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
 ACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGAT
 ACGAGTAGCGACCGCATGGTCAGTTACTGGAAAGATTTATTGGTTGGGGATGGGCTCGCG
 GCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGA
 GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
 CTTCCGGGTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAA
 AGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAATCCGGAGGC
 TCAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAGATCT
 CTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGAGCAAACAGGCTTAGATAACCCT
 GGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGA
 CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG
 GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACAC
 TCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGAT
 ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGT
 CTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAG
 CGAATCCCAAAAAGCCGGTCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTC
 GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAACCTTG

>RSPs01 *Pseudomonas putida* (MW049082)

CGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCTCTTCGATTCAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGA
 ACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGNCCTTGCCTATC
 AGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCC
 GTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC

GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
 GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAAACCTA
 ATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
 TGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTG
 GCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
 ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAA
 CTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAA
 CTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
 CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGT
 TACCAGCACGTAATGGTGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAANGTCT
 GGTACAGAGGGTTNCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCG
 GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT
 GTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACAC

>RSPs02 *Pseudomonas* sp. (MW049083)

GATGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCT
 GGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAA
 GCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACT
 GGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
 GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT
 TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAAT
 AAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGAATGTGAAAGCCCCGG
 GCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGNGTGGA
 ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
 CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTG
 GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
 TGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA
 ACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGTCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGG
 AGACTGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCAGCCCTTAC
 GGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTTGG
 AGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG
 TCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGT

>RSPs03 *Pseudomonas frederiksbergensis* (MW049084)

GCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
 ATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGT
 AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
 GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAAT
 ACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTG
 GTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAAACCTGTC
 GAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
 AGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAA
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAACT
 AGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACT
 TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCA

GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTA
 CCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCG
 TACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGA
 TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAA

>RSPs04 *Pseudomonas frederiksbergensis* (MW049085)

GCAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCANCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
 CTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGA
 TGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTCG
 GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGT
 GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGAT
 GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGTA
 GAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGT
 GGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTT
 GAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTG
 GTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTCTGAGAT
 GTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTG
 GGCCTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
 CATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAA
 GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC
 GACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCANNATGTGCGCGGTGAATACGTT
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAG
 TCTAACCTTCGGGGGGACGGT

>RSPs05 *Pseudomonas frederiksbergensis* (MW049086)

AATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATG
 AGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
 AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACG
 TTAGTGTTCGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT
 CGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAACTGTCGAG
 CTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG
 AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGC
 CGTTGGGAGCCTTGAGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCTGGGGAG
 TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTC
 CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
 CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCA
 GCACGTTATGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
 GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTAC
 AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCG
 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCANNATGTGCG
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAC
 CAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGGT

>RSPs06 *Pseudomonas thivervalensis* (MW049087)

TGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT
 GGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGG
 GACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA

TGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA
 GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT
 TGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTACGTTACCGACAGAATAAGCAC
 CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTA
 CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC
 CTGGGAACTGCATTCAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA
 CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCT
 AACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGA
 CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCAGGCCCTGACATCCAATGAACCTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCATTGAG
 ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAC
 GAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTCGCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATC
 CCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATC
 GCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGG

>RSPs07 *Pseudomonas thivervalensis* (MW049088)

GCAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
 CTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGA
 TGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTAC
 GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
 GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT
 GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGTA
 GAGGGTNGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG
 TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCT
 TGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAG
 GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACCTTCAGAGATGGATT
 GGTGCCTTCGGGAGCATGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGTA
 TGTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGT
 GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTCGCA
 AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
 CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

>RSPs08 *Pseudomonas thivervalensis* (MW049089)

GTCGAGCGGTAGAGAGNTGCTTGACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
 GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTC
 TACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTA
 GCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGA
 TCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
 TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTACGTT
 ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGA
 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTG
 AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAG
 GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC
 GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAG

CTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAG
 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
 CCTTCGGGAGCATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGC
 ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
 GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCC
 GCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
 TGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCG
 GGCTTGTACACACCGCCC

>RSPs09 *Pseudomonas thivervalensis* (MW049090)

GCAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
 CTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGA
 TGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGA
 ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTCGAC
 GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
 GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTCGTTAAGTTGGAT
 GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGTA
 GAGGGTNGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG
 TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCT
 TGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATT
 GGTGCCTTCGGGAGCATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA
 TGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGT
 GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCA
 AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
 CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTA
 GTCTAACCTTCGGGAGGACGGT

>RSRh01 *Rhizobium* sp. (MW049091)

CAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCT
 TGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAG
 ATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
 AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
 AGCCATGCCCGTGTAGTGAAGGCCCTAGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGAT
 AATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
 AAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGATCGATCAG
 TCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAACCTTGTACTGTCGATCTGGAGT
 ATGGAAGAGGTGAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGG
 CAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCG
 CAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
 ATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATG
 CAGGGTTCCTTCGGGGACCGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAG
 TTGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
 TCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGGAGTGGGCG
 CGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTTCGGATTGCACTCTGCAA
 CTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
 TTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTACCCGAAGGTAG

>RSRh02 *Rhizobium* sp. (MW049092)

GCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGAATAA
 CGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAG
 GATGAGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCA
 TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG
 AGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCG
 GAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGT
 TGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATC
 CCAGGGCTCAACCCTGGAACCTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAG
 TGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
 CGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTCCG
 GTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACAACTC
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGCTACCTGCAGAGATGCAGGGTTCCTTCG
 GGGACCGGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAG
 GGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTT
 ACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTG
 TGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAA
 GTTGGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCGCAA
 GGAGGCAGCTAA

>RSRh03 *Rhizobium* sp. (MW049093)

GCAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCC
 TTGACTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAA
 GATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
 CAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
 GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC
 CAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGA
 TAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCA
 GTCAGGGGTGAAATCCAGGGCTCAACCCTGGAACCTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAG
 TATGGAAGAGGTTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGA
 ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCG
 GGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGT
 CGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGA
 TGCAGGGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATT
 AGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTGCTACAATGGTGGTGCAGTGGGC
 AGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGC
 AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGT
 AGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAAC

>RSRh04 *Rhizobium* sp. (MW049094)

TCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGA
 CTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATT
 TATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
 GCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
 AAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
 CATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAAT
 GACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
 GGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCA
 GGGGTGAAATCCAGGGCTCAACCCTGGAACCTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATG

GAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACC
 AGTGGCGAAGGCGGCTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAG
 TATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTA AACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAA
 GATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATGCAG
 GGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTG
 GGC ACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC
 TCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGA
 GCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTC
 GAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
 CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGC
 GCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACCCAC

>RSRrh05 *Rhizobium* sp. (MW049095)

GTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTG
 ACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGAT
 TTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAA
 GCGGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
 CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
 CCATGCCCGGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAA
 TGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAA
 GGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTC
 AGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGA ACTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAGTAT
 GGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCA
 GTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTA AACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
 AGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
 TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATGCA
 GGGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTT
 GGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
 CTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCG
 AGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACT
 CGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTG
 CGCTAACCGCAAGGAGG

>RSRrh06 *Rhizobium* sp. (MW049096)

GCAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCC
 TTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAA
 GATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
 CAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
 GCCAAA ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC
 CAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGA
 TAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCA
 GTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGA ACTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAG
 TATGGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGTTAGCCGTCGG
 GCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTA AACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
 GCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGAT
 GCAGGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCA
 GTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 GTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA

GCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA
 ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTA
 GTGCGCTAACCGCAAGGAGCA

>RSRh07 *Rhizobium* sp. (MW049097)

CAGTCGAGCGCCCCGAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTT
 GACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGA
 TTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
 AGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
 CCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCA
 GCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATA
 ATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA
 AGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGT
 CAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAGTA
 TGGAAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAAAC
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGC
 AGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
 AAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
 TTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATGC
 AGGGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
 AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGT
 TGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
 CCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGC
 GAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAAC
 TCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGT
 GCGCTAACCGCAAGGAG

>RSRh08 *Rhizobium* sp. (MW049098)

CAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCT
 TGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAG
 ATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
 AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGAT
 AATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 AAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAG
 TCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAGT
 ATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGG
 GCAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
 GCAAGATTA AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGAT
 GCAGGGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCA
 GTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 GTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA
 GCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA
 ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTA
 GTGCGC

>RSRh09 *Rhizobium* sp. (MW049099)

CCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGAAT
 AACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCA
 AGGATGAGCCCGGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
 CATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTA

CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
 TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATC
 CGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACG
 GTTGTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAA
 TCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTG
 AGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 GGCGGCTCACTGGTCCACTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTT
 CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAAC
 GCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATGCAGGGTTCCCTT
 CGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGATGCTGTCGTCGTCGATGAGTGTGGGT
 TAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTGCCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTTA
 AGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCC
 TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAG
 TGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATG
 AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCGC
 AAGGAGGCAGC

>RSRh10 *Rhizobium* sp. (MW049100)

CAGTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCT
 TGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAG
 ATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
 AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
 AGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGAT
 AATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
 AAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAG
 TCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCTGATCTGGAGT
 ATGGAAGAGGTNGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGA
 ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCACTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCG
 GGCAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGT
 CGCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGA
 TGCAGGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGTCTGTC
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTGCCTTAGTTGCCAGCATT
 AGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGGACGCTCA
 AGTCCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGC
 AAGCAGCAGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTTGC
 AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGT
 AGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACCCAC

>RSRh11 *Rhizobium* sp. (MW049101)

GCAGTCGAGCGCCCCGAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCT
 TGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAG
 ATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
 AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
 AGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGAT
 AATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
 AAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAG
 TCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCTGATCTGGAGT
 ATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCACTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGG
 CAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCG
 CAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA

ATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACCTGCAGAGATG
 CAGGGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTACAG
 TTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
 TCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAG
 CGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAA
 CTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAG
 TGCCTAACCGCAAGGA

>RSBac01 *Bacillus licheniformis* (MW049102)

TCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTGACGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTT
 GATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACC
 CGCGGCGCAATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
 CTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAG
 CAGTAGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACGCGCGTGAAGTATGA
 AGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCG
 GCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAG
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
 TAGAGGGTTTTCCGCCCTTATGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
 GAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACC
 TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAG
 GGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
 CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG

>RSBac02 *Bacillus niacini* (MW049103)

GCAGTCGAGCGAATCTTGAGGTGCTTGACCTCTTGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
 ACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT
 AATCCTTTTCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGTCCGTTTACGCTGACACTTACAGATGG
 GCCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGA
 TGAAGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGC
 CGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCC
 TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGAC
 TTGAGTACAGAAGAGGAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCG
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
 GTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTATGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
 TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCC
 TAGAGATAGGATTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGC
 CAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
 AAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTTAGCCAATCCCATAAAACCACTCAGTTCGGATTG
 TAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCG
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACAC
 CCGAAGTCCGGTGGGGTAAAC

>RSBac03 *Bacillus niacini* (MW049104)

GAGGTGCTTGCACCTCTTGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT
 GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCTCTCAT
 GAGGAAAAGCTGAAAGTCGGTTTACGCTGACACTTACAGATGGGCCCCGCGGCATTAGC
 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCCT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTGC
 TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGACTTGAGTACAGAAGAGGA
 AAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGGTTAGAGGGTTTCCG
 CCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTNNGGGAGTACGGCCGCAAGGC
 TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAA
 AGAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACTT
 TCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA
 TGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGG
 GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
 ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGA
 CCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCACTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
 CCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGG
 GTAA

>RSEnt01 *Enterobacter xiangfangensis* (MW049105)

TCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATA
 ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGG
 GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
 GATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
 CGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACAGGGTTAATAACCCTGTGATTG
 ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
 GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGG
 ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAACCTGGCAGGCTAGAGTCTTG
 TAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
 GTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCC
 TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
 GGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA ACTTAGCAGAGATGGTT
 TGGTGCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
 ATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC
 GGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGA
 CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
 CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTT
 CCCGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTA
 GCTTA

>RSKoc01 *Kocuria dechangensis* (MW049106)

TGCAGTCGNCGATGANGTCCCGCTTGCGGGACGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAATA
 CGTGAGTAACCTGCCCTCGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACTGGATA
 CTA CTGCTCACCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGGGTTTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGG
 CCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTCACCNAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
 AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGANACACGNCCAGACTCCTACNGGAGGCAGCAGTG
 GGGAATATTGNACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCNCGTGAGGGATGACGGCC

TTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA
 ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGCTGTGTCGCTCTGCTGTGAAAGCCCGGGGCT
 CAACCCCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTC
 TGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGT
 GTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTCTCCGCGCC
 GTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAAGGCTTGACATCCGCCGACCCGCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGTC
 GGTGGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGA
 CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGTACGCTCAAATCATGCCCCATTATGTC
 TTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGC
 TAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCG
 GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGTG
 GGAGGGA

>RSACi01 *Acinetobacter beijerinckii* (MW049107)

GCAGTCGAGCGGGGAAAGGTAGCTTGGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
 TTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGA
 TGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGGACAATGGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTT
 GGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTATTAATACTACTGGATAGTGA
 CGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGG
 TCGGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTGATTAAGTCGGA
 TGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAATTGCATTCGATACTGGTCAGCTAGAGTATGGG
 AGAGGATGNGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
 ATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCT
 TTGAGGCTTTAGTGGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAA
 GACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGAT
 TGGTGCCTTCGGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGC
 CGGAACTTTAAGGACTGACGAGGCTACACAGTGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTC
 ATCATGGCCCTTACGACTACGAGGCTACACAGTGTGACAACTGGTACAAAGGGTGTGCT
 ACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAAC
 TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGACCAGAAGTAGGT
 AG

>RSACi02 *Acinetobacter* sp. (MW049108)

GCAGTCGAGCGGGGAAAGGTTGCTTCGGTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
 TTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATAACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTTCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGA
 TGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGGACAATGGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAT
 GGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTAGATTAATACTCTAGGATAGTGA
 CGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGG
 TCGGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCCATTTAAGTCAA
 TGTGAAATCCCGGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGATGGCTAGAGTATGGG
 AGAGGATGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
 ATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCT
 TTGAGGCTTTAGTGGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAA

GACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACCTTCCAGAGATGGAT
 TGGTGCCTTCGGAACTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGAGTAATGT
 CGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAAGT
 ATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCT
 ACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC
 TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACACCAGAAGTAGGT
 AGTCTAACCGCAAGGAGGACG

>RSMicc01 *Micrococcus yunnanensis* (MW049109)

GAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGC
 CCTTAACCTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGC
 ATGGTGGGTGTTGGAAGATTTATCGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTG
 GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGCCAC
 ACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACC
 TCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
 GAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGC
 GGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
 AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGAC
 GCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
 AACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTA
 AGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCACGAGCGCAAC
 CCTCGTTCATGTTGCCAGCACGTNGTGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAAC
 TCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCA
 TGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGC
 CGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTCGCTAGTAAT
 CGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAG
 TCACGAAAGTTCTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGG

>RSRos01 *Roseomonas vinaceus* (MW049110)

TTTCGGGTGTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAACATGTCCAGGGGTGGGGGA
 TAACGCTGGGAACTGGCGCTAATACCGCATGTGAGCTGAGGCTCAAAGCCGCGAGGCGC
 CTTTGGAGTGGCTGCGTCCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTTACCAAGGCGACG
 ATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
 GCGTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCCCTTTCGACGGGGACGATGATGACGGT
 ACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCT
 AGCGTTGCTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGGCGCGTAGGGCGTCAATTTAGTCAGGCGTG
 AAATCCCGGGCTTAACCTGGGGACTGCGCTTGATACTGGGTGACTAGAGGGTGGAAAGAG
 GGTGCTGGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGC
 GAAGGCGGCGACCTGGTCCACTGACGCTGAGGCGCGACAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGCGCTGGATGTTGGGTGACCTAGT
 CACTCAGTGTGCTAGCCAACGCGGTAAGCGCACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTG
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
 CAACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATGGTACGACCGGTGTGGAGACACACTTTT
 CCCGCAAGGGACGTGATGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATG
 TTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGCCACTAGTTGCCAGCACGTTTGGGTGG
 GCACTCTAGTGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC
 ATGGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCAGG
 CAGCGATGCCGAGCCGATCCCAAAAAGCCGTCTCAGTTCAGATTGCACCCTGCAACTCGG
 GTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTCTACCTTAAGTGGCTGCGC
 TAACCGCAAGGGGGCAGGTAC

>RSFr01 *Frondehabitans* sp. (MW049111)

TGAACTCCAGCTTGCTGGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTG
 CCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACCGGATATGACAATCGACGG
 CATCGTCTGGTTGTGGAAGAATTTCCGTTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGGTTGTT
 GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAAC
 CTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAACCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTG
 CAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
 GAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGA
 CGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT
 AAACGTTGGGCGCTAGATGTAGGGACCATTCCACGGTTTCTGTGTGCGCAGCTAACGCATT
 AAGCGCCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCC
 CGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
 TGACATATACCGGAAACGGCCAGAAATGGTGCGCCGCAAGGTTCGGTATACAGGTGGTGC
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATG
 CTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCG
 GTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
 CAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTC
 ATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCCTTG

>RSPar01 *Paracoccus marcusii* (MW049112)

CGGGTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAACGTGCCCTTCTCTACGGAATAGC
 CCCGGGAAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTTGGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGG
 ATCGGCCCCGCTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGCCGACGATCCAT
 AGCTGGTTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGC
 AGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTT
 GTTCGGAATTAAGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTGGAAAGTCAGAGGTGAAATCC
 CAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGAAACTATCAGTCTGGAGTTCGAGAGAGGTTGAGT
 GGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCCAGACGTGCGCAAGCATGCTTGTGCG
 TGTACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCG
 CAGAACCTTACCAACCCTTGACATGGCAGGACCCTGGAGAGATTGAGCTTTCTCGTAAG
 AGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTTCGTCGTGAGATGTTGCGTTAA
 GTCCGGCAACGAGCGCAACCCACGTCCCTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTATGG
 AAACCTCCGATGATAAGTTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTAC
 GGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGTTAATCCCCAAAAGCCATC
 TCAGTTCGGATTGCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
 AACAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGG
 GAGTTGGTTCTACCCGACGACGCTGCGCTAACCTTCGGGGGGCAGGC

>RSSta01 *Staphylococcus xylosus* (MW049113)

CTGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
 TAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC
 GGATAACATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGA
 TGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
 TGATGAAGGGTTTTCCGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAC
 TGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGG

TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA
 AACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATA
 TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAA
 GCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTA
 AGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAA
 CTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
 CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGT
 TGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAA
 TACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGA
 TTGTAGTGTCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGC
 TACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
 CACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATT

>RSPro01 *Providencia rettgeri* (MW049114)

CCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATA
 ACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATCTCTCAGGAGCAAAGCAGGGGAACCTCG
 GTCCTTGCGCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCAC
 CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
 CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGGGAGGA
 AGGCGTTGATGCTAATATCATCAACGATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCACC GGCTAAC
 TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
 AAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAT
 GGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACT
 GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
 GTAAACGATGTGATTTGAAGTTGTTCCCTAGAGGAGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTT
 AAATCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCT
 TGACATCCAGAGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGC
 TGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
 CCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGT
 ACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
 CGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCCGTCACAC
 CATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAAC

Séquence du gène ITS de l'isolat-levure

>RSRho01 *Rhodotorula mucilaginosa* (MW049115)

CGGAAGGATCATTAGTGAATATAGGACGTCCAACCTTAACCTGGAGTCCGAACTCTCACTT
 TCTAACCCTGTGCACTTGTGTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCAC
 TTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTAATTTATAACAAAATAAACTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGG
 AGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAG
 GTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTACGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCA
 TCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTC
 TTCGGACTAGAGCCGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAG
 ATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT

Séquences du gène *nodC* des isolats**>RSRh01 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080953)**

ATTGGCTGGCCTGCAATGAGGAGCGCGCCGCGCAGGGCCGCTTCGGTGCCGTGATGTGTT
 GCTGTGGACCTGTGCCATGTACCGCCGGTCCGCCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATATG
 AGACGCAGCTTTATCGGGGAAAGCCGAGTGACTTTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCC
 TAATGCTAAGCGCCGGCTTCCGTACCGAATATGTCCCAAGCGCCATCGCCGCAACCGTCG
 TTCCTGACCGTTTGGCTGCCTATCTGCGCCAGCAACTGCGTTGGGCACGGAGTACATTCC
 GAGATAACCTGCTTGGGCTTACCTCCTCCGTGACATGAACTGGTATCTGACTTTGGACG
 TCGTCGGGCAGAATGCCGGCCCTCTTCTGCTCGCTTTGTCCGTACTGGCGGGTCTTGCGC
 AGTTCGCCTTGACGGGTTCACTGCCGTGGTGGACGATAGGAACGATTGGATCATTGACGC
 TGATACGATGCGGCGTAGCTGCTTATCGTGCCAAGCAGCTTAGATTTGTTGGCTTCTCGC
 TGCACACGCTTGTGAACGTCTTCTATTACTTCCTGTGAAAGCTTATGCGCTCTGTACGT
 TGCCAACAGCG

>RSRh03 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080954)

CCGAGCAGATCGTCTATGCGGACGACTCGAGATTTCGAATTCATCATGCTTCCCAGGAATG
 TCGGAAAGCGCAAAGCGCAAATCGCTGCCATTTCCCGATCGTCCGGGGACCTGATCCTGA
 ACGTGGATTCAGACACCACTCTCGCCTCCGACGTGGTTTTCCAAACTCAGTCAGAAAATGC
 GCGATCCGGCGGTTCGGTGCCTGATGGGGCAGCTTGTAGCAAGCAATCAGAGCGACTCGT
 GGCTGACCCGATTGATCGACATGGAGTACTGGCTGGCCTGCAATGAGGAGCGCGCCGCGC
 AGGGCCGGTTCGGTCCGTGATGTGTTGCTGTGGACCCTGTGCCATGTACCGCCGGTCCG
 CCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATACGAGACGCAGCTTTATCGGGGAAAGCCGAGTGACT
 TTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCCTAATGCTAAGCGCCGGCTTCCGTACCGAATATG
 TCCCAAGCGCTATCGCCGCAACCGTCGTTTCTGACGGTTTGGCTGCCTATCTGCGCCAGC
 AACTGCGTTGGGCAGGAGTACATTCCGAGATACCTGCTTGGACTCACCTCCTCAGTG
 GCATGAACCTGGTATCTGACTTTGGACGTCGTCGGGCAGAATGCCGGCCCTCTTCTGCTTG
 CATTGTCCGTACTGGCGGGTCTTGACAGTTCGCCCTGACGGGTTCACTGCCCTGGTGA
 CGATAGGAACGATTGGATCATTGACGCTGATACGATGCGGCGTAGCTGCTTATCGTGCCA
 GGCAGCTTAGATTTCTGGTTTCTCGCTGCACACGCTCGTGAACGTCTTCTATTACTTC
 CGGTGAAGGCTTATGCGCTCTGTACGTTGTCCAAT

>RSRh04 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080955)

GAAATAGTGACGCGGTAGTGGCCGAGCAGATCGTCTATGCGGGTGACGCGAGATTCAAAT
 TCATCATGCTGCCAGGAATATCGGAAAGCGCAAAGCGCAAATCGCCGCCATTTCCCGAT
 CATCCGGGGACCTCATCTGAACGTGGATTCAGACACCACTCTCGCCAGCGATGTTGTTT
 CCAAACCTCAGTCAGAAAATGCGCGATCCGACGGTCCGGTGCCTGATGGGGCAGCTTGTAG
 CAAGCAATCAGAACGACTCGTGGCTGACCCGATTGATCGACATGGAGTACTGGCTGGCCT
 GCAATGAGGAGCGCGCCGCGCAGGGCCGCTTCGGTGCCTGATGTGTTGCTGTGGACCCT
 GTGCCATGTACCGCCGGTCCGCCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATATGAGACGCAGCTTT
 ATCGGGGAAAGCCGAGTGACTTTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCCTAATGCTAAGCG
 CCGGCTTCCGTACCGAATATGTCCCAAGCGCCATCGCCGCAACCGTCGTTTCTGACCGTT
 TGGCTGCCTATCTGCGCCAGCAACTGCGTTGGGCACGGAGTACATTCCGAGATACCCTGC
 TTGGGCTTACCTCCTCCGTGACATGAACTGGTATCTGACTTTGGACGTCGTCGGGCAGA
 ATGCCGGCCCTCTTCTGCTCGCTTTGTCCGTACTGGCGGGTCTTGCGCAGTTCGCCTTCA
 CGGGTTCAGTGCCCTGGTGGACGATAGGAACGATTGGATCATTGACGCTGATACGATGCG
 GCGTAGCTGCTTATCGTGCCAAGCAGCTTAGATTTGTTGGCTTCTCCCTGCACACGCTTG
 TGAACGTCTTCTATTACTTCTGTGAAAGCTTATGCGCTCTGTACGTTGTCCAA

>RSRh06 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080956)

CCGAGCAGATCGTCTATGCGGACGACTCGAGATTTCGAATTCATCATGCTTCCCAGGAATG
 TCGGAAAGCGCAAAGCGCAAATCGCTGCCATTTCCCGATCGTCCGGGGACCTGATCCTGA
 ACGTGGATTCAGACACCACTCTCGCCTCCGACGTGGTTTTCCAAACTCAGTCAGAAAATGC
 GCGATCCGGCGGTTCGGTGCCTGATGGGGCAGCTTGTAGCAAGCAATCAGAGCGACTCGT
 GGCTGACCCGATTGATCGACATGGAGTACTGGCTGGCCTGCAATGAGGAGCGCGCCGCGC
 AGGGCCGGTTCGGTCCGTGATGTGTTGCTGTGGACCCTGTGCCATGTACCGCCGGTCCG
 CCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATACGAGACGCAGCTTTATCGGGGAAAGCCGAGTGACT
 TTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCCTAATGCTAAGCGCCGGCTTCCGTACCGAATATG
 TCCCAAGCGCTATCGCCGCAACCGTCGTTTCTGACGGTTTGGCTGCCTATCTGCGCCAGC

AACTGCGTTGGGCACGGAGTACATTCCGAGATACCCTGCTTGGACTTCACCTCCTCAGTG
GCATGAACTGGTATCTGACTTTGGACGTCGTCGGGCAGAATGCCGGCCCTCTTCTGCTTG
CATTGTCCGTAAGGCGGGTCTTGCACAGTTCGCCCTGACGGGTTTCAGTGCCCTGGTGGGA
CGATAGGAACGATTGGATCATTGACGCTGATACGATGCGGGCGTAGCTGCTTATCGTGCCA
GGCAGCTTAGATTTCTTGGTTTCTCGCTGCACACGCTCGTGAACGTCTTTCTATTACTTC
CGGTGAAGGCTTATGCGCTCTGTACGTTGTCCAATAG

>RSRh07 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080957)

GGTTCAGAAATCGCGACGCCGTGGTGGCCGAACAGCTTGCCATGCGGGCGACGCGAGA
TTCGAATTCATCATGCTCCCCAGGAATGTCGGAAAGCGAAAAGCGCAAATCGCTGCCATT
TCCCGATCGTCCGGGGACCTGATCCTGAACGTGGATTTCAGACACCACTCTCGCCTCCGAC
GTGGTTTCCAAACTCAGTCAGAAAATGCGCGATCCGGCGGTTCGGTGCCGTGATGGGGCAG
CTTGTAGCAAGCAATCAGAGCGACTCGTGGCTGACCCGATTGATCGACATGGAGTACTGG
CTGGCCTGCAATGAGGAGCGCGCCGCGCAGGGCCGGTTCGGTGCCGTGATGTGTTGCTGT
GGACCCTGTGCCATGTACCGCCGGTCCGCCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATACGAGACG
CAGCTTTATCGGGGAAAGCCGAGTGACTTTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCCTAATG
CTAAGCGCCGGCTTCCGTACCGAGTATGTCCCAAGCGCTATCGCCGAACCCGTCGTTCT
GACGGTTTGGCTGCCTATCTGCGCCAGCAACTGCGTTGGGCACGGAGTACATTCCGAGAT
ACCTGCTTGGGCTTACCTCCTCCGTGGCATGAACTGGTATCTGACTTTGGACGTCGTC
GGGCAGAATGCCGGCCCTCTTCTGCTTGCATTGTCCGTAAGTGGCGGGTCTTGCACAGTTC
GCCCTGACGGGTTTCAGTGCCCTGGTGGACGATAGGAACGATTGGATCATTGACGCTGATA
CGATGCGGGCGTAGCTGCTTATCGTGCCAGGCAGCTTAGATTTCTTGGTTTCTCGCTGCAC
ACGCTCGTGAACGTCTTTCTATTACTTCCGGTGAAGGCTTATGCGCTCTGTACGTTGTCC
AATA

>RSRh08 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW080958)

GTTCCAGAAATCGCGACGCCGTGGTGGCCGAACAGCTTGCCATGCGGGCGACGCGAGAT
TCGAATTCATCATGCTCCCCAGGAATGTCGGAAAGCGAAAAGCGCAAATCGCTGCCATTT
CCCGATCGTCCGGGGACCTGATCCTGAACGTGGATTTCAGACACCACTCTCGCCTCCGACG
TGGTTTCCAAACTCAGTCAGAAAATGCGCGATCCGGCGGTTCGGTGCCGTGATGGGGCAGC
TTGTAGCAAGCAATCAGAGCGACTCGTGGCTGACCCGATTGATCGACATGGAGTACTGGC
TGGCCTGCAATGAGGAGCGCGCCGCGCAGGGCCGGTTCGGTGCCGTGATGTGTTGCTGTG
GACCCTGTGCCATGTACCGCCGGTCCGCCTTCGTCTTGCTTCTTGATCAATACGAGACGC
AGCTTTATCGGGGAAAGCCGAGTGACTTTGGCGAGGACCGTCATCTGACCATCCTAATGC
TAAGCGCCGGCTTCCGTACCGAGTATGTCCCAAGCGCTATCGCCGAACCCGTCGTTCCCTG
ACGGTTTGGCTGCCTATCTGCGCCAGCAACTGCGTTGGGCACGGAGTACATTCCGAGATA
CCCTGCTTGGGCTTACCTCCTCCGTGGCATGAACTGGTATCTGACTTTGGACGTCGTCG
GGCAGAATGCCGGCCCTCTTCTGCTTGCATTGTCCGTAAGTGGCGGGTCTTGCACAGTTCG
CCCTGACGGGTTTCAGTGCCCTGGTGGACGATAGGAACGATTGGATCATTGACGCTGATA
GATGCGGGCGTAGCTGCTTATCGTGCCAGGCAGCTTAGATTTCTTGGTTTCTCGCTGCACA
CGCTCGTGAACGTCTTTCTATTACTTCCGGTGAAGGCTTATGCGCTCTGTACGTTGTCC

Séquences du gène *nifH* des isolats

>RSRh01 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091475)

TTTTCGATCCCAAGGCGGACTCGACGCGATTGATCTTGAACCTCAAAGCGCAGGGCACTG
TTCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTCAGTCGAAGATCTGGAACCTCGGCGACGTGCTCA
AAACTGGCTACGGTGGCATCAAATGTGTGGAGTCGGGCGGCCCTGAACCTGGCGTCGGCT
GCGCCGACGGGGCGTCATCACATCGATCAACTTCCCTGGAAGAAAACGGCGCCTATGACG
ACGTCGACTACGTCTCCTATGACGTGCTCGGAGACGTGGTGTGCGGGGGCTTTGCTATGC
CCATTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTACATCGTCATGTCCGGCGAANTGATGGCCA

>RSRh03 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091476)

ATCGGTAAGTCCACCACCTCCCAGAATACGCTCGCTGCCCTTGTGCAACTTGGGCAGAAA
ATCTCATCGTCGGCTGCGACCCAAAGGCTGATTTCGACGCGATTGATCTTGAACCTCCAAA
GCGCAGGGCACTGTTCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTCAGTCGAAGATCTGGAACCTC
GGCAGCTGCTCAAAACTGGCTACGGTGGCATCAAATGTGTGGAGTCGGGCGGCCCTGAA
CCTGGCGTCGGCTGCGCCGACGGGGCGTCATCACATCGATCAACTTCCCTGGAAGAAAAC
GGCGCCTATGACGACGTCGACTACGTCCTATGACGTGCTCGGAGACGTGGTGTGCGGG

GGCTTTGCTATGCCATTTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTACATCGTCATGTCTGGA
GAGATGATGGCCATGTACGCNNCCAACAAA

>RSRh04 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091477)

GAAAGGCGGTATCGGCAAGTCCACCACATCCCAAAATACGCTCGCTGCCCTTGTCGAACT
TGGGCAGAAAATCCTCATCGTCCGGCTGCGACCCAAAGGCTGATTGACGCGATTGATCTT
GAACTCCAAAGCGCAGGGCACTGTTCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTTCAGTCGAAGA
TCTGGAACCTCGGCGACGTGCTCAAAACTGGCTACGGTGGCATCAAATGTGTGGAGTCGGG
CGGCCCTGAACCTGGCGTCCGGCTGCGCCGGACGGGGCGTCATCACATCGATCAACTTCCT
GGAAGAAAACGGCGCCTATGACGACGTCGACTACGTCTCCTATGACGTGCTCGGAGACGT
GGTGTGCGGGGGCTTTGCTATGCCATTTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTACATCGT
CATGTCTGGTGAGATGATGGCCATGTACGCCGCAACAAA

>RSRh06 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091478)

TTGCGATCCGAAGGCGGACTCGACGCGATTGATCTTGAACCTCAAAGCGCAGGGCACTGT
TCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTTCAGTCGAAGATCTGGAACCTCGGCGACGTGCTCAA
AACTGGCTACGGTGGCATCAAATGTGTGGAGTCGGGCGGCCCTGAACCTGGCGTCCGGCTG
CGCCGGACGGGGCGTCATCACATCGATCAACTTCCTGGAAGAAAACGGCGCCTATGACGA
CGTCGACTACGTCTCCTATGACGTGCTCGGAAACGTGGTGTGCGGGGGCTTTGCTATGCC
CATTTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTACATCGTCATGTCCGGCGAAATGATGGCCAT

>RSRh07 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091479)

ATTGCGATCCCAAGGCGGACTCGACGCGATTGATCCTCAACTCAAAGCGCAGGGCACTG
TTCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTTCAGTCGAAGATCTGGAACCTGGCGACGTGCTCA
AAACTGGCTACGGCGGCATCAAATGTGTGGAGTCAGGCGGCCCTGAACCTGGCGTCCGGCT
GCGCCGGACGGGGCGTCATCACATCAATCAACTTCCTGGAAGAAAACGGCGCCTACGACG
ACGTGACTACGTCTCCTATGACGTGCTCGGAAACGTGGTGTGCGGGGGCTTTGCTATGC
CCATTTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTACATCGTCATGTCCGGCGAAATGATGGCCA
TAA

>RSRh08 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (MW091480)

ACTCGAGCCCCAGCCCTGGCGGTGATCCGGCGGGAGGTTTCCAGGCAGTTGGAAATCGA
TCCGGATCTGGGCAGCGTAAGGTGGGGAGTATGCTATCTGCCTCTTGTCGTTCTCGCGTC
CGAGGTAGGGTACAGATAACAAGGGACCTTTGCGACCNNAAGGCGGACTCGACGCGATTG
ATCCTCAACTCAAAGCGCAGGGCACTGTTCTGGATCTAGCCGCAACGAAGGGTTTCAGTC
GAAGATCTGGAACCTGGCGACGTGCTCAAAACTGGCTACGGCGGCATCAAATGTGTGGAG
TCAGGCGGCCCTGAACCTGGCGTCCGGCTGCGCCGGACGGGGCGTCATCACATCAATCAAC
TTCCTGGAAGAAAACGGCGCCTACGACGACGTGACTACGTCTCCTATGACGTGCTCGGA
GACGTGGTGTGCGGGGGCTTTGCTATGCCATTTCGCGAGAACAAGGCTCAGGAAATTTAC
ATCGTCATGTCCGGCGAGATGATGGCCA

Séquences des deux gènes de résistance aux métaux lourds *czcD* et *nccA*

>RSCup01 *Cupriavidus pauculus* *czcD* gene (MZ382915)

CACGACCATCCCGGTGGCAACGAGCGATCGCTCAAGATCGCCCTTGCGCTGACCGGTACG
TTCCTGATTGCCGAAGTGGTCGGTGGTGTGTCATGACGAAGAGCCTGGCGTTGATCTCCGAC
GCCGCGACATGCTCACGGACACCGTCGCACTGGCCATCGCACTGGCTGCTATTGCGATC
GCCAAGCGACCCGCGGACAAGAAGCGGACATTTGGCTACTACCGTTTTGAGATTCTTGCC
GCGGCCTTTAACGCATTGCTGCTGTTCCGGTGTGGCTATCTACATCCTGTACGAAGCCTAC
CTGCGGCTGAAATCGCCACCTCAGATTGAGTCAACCGGCATGTTTCGTCGTGGCTGTGCTG
GGCCTGATCATCA

>RSCup01 *Cupriavidus pauculus* *nccA* gene (MZ382916)

CCCGTGGAGGTGAGAAGCGCGTGACGTATCCGATCGAAACCGCTATTTTCAGGGTTGAAC
GGCGTCGAGAACACGCGGTGATGTCCCGCAACGGGTTTCAGCCAGGTCACCGTCATCTTC
AAGGAGAGCGCCAACCTCTACTTCATGCGCCAGCAGGTATCGGAGCGACTCGTGCAGGCA
CGTCCCAGCCTGCCCGCAGGCGCCGAGCCGAGATGGGTCCGGTTTCCACTGGTCTGGGC
GAGGTATTCCACTACAGCGTGGAGTATCAATACCCTGATGGCAAGGGCGCACCGCTCAAG
GACGGGGCGCCGGGCTGGCAACGCGATGGAAGTTTCTTGACCGAGCGCGGGGAACGGCTT

GATGACCGTGTGTCGAAGCTTGCATACCTGCGAACCGTGCAGGACTGGATCATTGCCCCT
CAGTTGAGGACAACGGCTGGTGTGGCCGACGTGGATTCCCTGGGTGGCTATGTCAAGCAG
TTCGTGGTTCGAGCCTGATGCTGCAAAAATGGCCGCCTACGGCATCTCATATGGCGACCTC
GCACAGGCTCTGGAGGATGCCAATCTTTCGGTGGGTGCGAACTTCATGCGCCGTTTCGGGT
GAATCGTACCTGGTGCCTGCCGATGCGCGCATCAAGTCGGCGGACGAGATCTCGCGCGCC
GTGATCGCCATCGCCAGAACGTGCCGATCACGGTCGGCCAGGTGGCGTCCGTCAAGATT
GGCGGAGAACTTCGCTCCGGTGCGGCCAGCCGCAATGGCCAGGAAACGGTGATAGGCAGC
GCGCTGATGCTGGTTGGCGCGAACAGCCGTACCGTGGCGCAGGATGTTGGCGACAAGCTG
GAACAAATCTCGAAGACGCTGCCGCCGGGTGTAGTCATCGTTCCTACGCTTAACCGATCG
CAACTGGTGACCGCCACCATCGAGACAGTCGCCAAGAATCTGGTGGAAGGCGCCTTGCTG
GTGGTGGTAATCCTGTTCTGCTGCTGGGCAACTGGCGCGCTGCCGTCATTGCAGCGCTG
GTCATCCCATTGTCGATGCTGGTCAG

ARTICLE



Diversity of rhizobia and non-rhizobia endophytes isolated from root nodules of *Trifolium* sp. growing in lead and zinc mine site Guelma, Algeria

Sarah Rahal¹ · Djamel Chekireb¹

Received: 14 February 2021 / Revised: 2 May 2021 / Accepted: 7 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

High concentrations of heavy metals in mine soil disturb the interactions between legumes and microorganisms leading to select strains adapted to these specific conditions. In this work, we analyzed the diversity of fifty strains isolated from *Trifolium* sp. nodules growing on Pb–Zn mine soil, in the Northeastern of Algeria and highlighted their potential symbiotic traits. The phylogeny of the 16S rRNA gene sequences revealed a high bacterial diversity with a predominance of non-rhizobial endophytes. The identified isolates belong to the thirteen following genera *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Roseomonas*, *Paracoccus*, *Frondehabitans*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Providencia*, *Micrococcus* and *Staphylococcus*. Regarding rhizobial strains, only isolates affiliated to *Rhizobium* genus were obtained. The symbiotic gene *nodC* and the nitrogen fixation gene *nifH* present showed that *Rhizobium* isolates belonged to the symbiovar trifolii. In addition to bacterial, one yeast strain was isolated and identified as *Rhodotorula mucilaginosa* by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region.

Keywords *Trifolium* sp. · Diversity · Rhizobia · Non-rhizobia endophyte · Mine soil

Introduction

Mining and subsequent ore-processing activities are the major source of heavy metal contamination of ground area. The majority of the studies carried out on the ecological restoration of metalliferous mines have focused on Pb–Zn mines, which are generally among the most polluted in the world (Fan et al. 2018; Oleńska et al. 2020). The high level of heavy metals contamination in mine soils is a result of their persistence and non-biodegradability, leading to the disruption of their ecosystem dynamics and triggering a degradation of soil quality with nitrogen deficiency and

low organic matter content (Pajuelo et al. 2011). Damage to soil texture by heavy metal cause reduction of plant growth affecting their morphology by disturbing cell organelles, membranes and the physiological process (Amari et al. 2017).

Heavy metals, such as zinc (Zn), copper (Cu), nickel (Ni) and chromium (Cr), are essential micronutrients for plants and could be toxic at high concentrations (Rehman et al. 2017). Others such as cadmium (Cd), mercury (Hg) and lead (Pb) have no beneficial effect or function and are potentially toxic at relatively low concentrations (Xiong et al. 2014). These toxic elements reduce plant diversity and select the heavy metal tolerant plants (Wong et al. 2003). These adaptations appeared in a specific and unique hyperaccumulating plant species (Wong et al. 2003). Legumes are the most abundant plants growing in metalliferous environment and commonly used for restoration of contaminated sites (Hao et al. 2014). Legumes genera as *Genista*, *Ornithopus*, *Lotus*, *Anthyllis*, *Cytisus*, *Ononis* and several *Trifolium* species seemed to tolerate high levels of contaminants in soils (Prasad and Freitas 2003).

The genus *Trifolium* has the ability to grow in heavy metal contaminated soil and became a dominant species

Communicated by Erko Stackebrandt.

✉ Sarah Rahal
rhl_sara@yahoo.fr

✉ Djamel Chekireb
Djchekireb@gmail.com

¹ Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, University Badji Mokhtar Annaba, B.P. 12, Sidi Amar, 23200 Annaba, Algeria

(Wang et al. 2018). Many *Trifolium* species are present in the Mediterranean region; there are 37 species of *Trifolium* in Algeria, and the most frequently encountered species are *T. scabrum*, *T. angustifolium*, *T. campestre*, *T. tomentosum* and *T. lappaceum* (Abdelguerfi and Abdelguerfi-Laouar 2004). Like other legumes, *Trifolium* species establish symbiotic relations with rhizobia characterized by their ability to induce root nodules and to fix nitrogen during symbiotic interactions under severe conditions (Graham 2008). In addition to rhizobia, recent studies showed that other bacterial genera are present in *Trifolium* nodules commonly called non-rhizobial endophytes and are members of three classes of Alpha, Beta and Gamma-proteobacteria, Actinobacteria and Firmibacteria (De Meyer et al. 2015).

Legume root nodules constitute a specific environmental niche for accommodation and proliferation of soil bacteria, and are also considered as the main sites of metal accumulation in polluted soil (Gopalakrishnan et al. 2015). Environment stress, such as excessive metals, exert selection pressure on microorganisms and affect their growth, abundance and diversity resulting to the death of sensitive species and adaptation of surviving bacteria emerging a microbial populations with a lower diversity compared to that of unpolluted soils (Giller et al. 1998; Borymski et al. 2018). However, the microbial diversity doesn't depend only on metals concentrations, but also by other factors (Guo et al. 2019). New advance in plant–bacteria interactions research reveals that plants and soils conditions can influence the composition of root-associated microbial communities and select the bacteria they need for their growth in different ecosystems under stress conditions (Leff et al. 2018).

The objectives of this study were aimed to identify and characterize of rhizobia and non-rhizobia endophytes strains isolated from nodules of *Trifolium* sp. grown in soil of Pb–Zn Djedada's mining site, and to show their potential symbiotic traits. Our characterizations are based on a molecular analysis of 16S rRNA and internal transcribed spacer (ITS) sequences as well as those of the *nodC* and *nifH* symbiotic genes when present in the isolates. This analysis allowed us to determine the specific diversity of the microorganisms present in nodules. To our knowledge, this is the first study on the genetic diversity of the microbial community associated with root nodules of *Trifolium* sp. in polluted soil in Algeria.

Materials and methods

Site description

The Mine site of Djedada (36° 22' 48", 4 N 7° 42' 33", 2 E) is located in the extreme Northeast of Algeria in the region of Hammam N'Bail, about 30 km from the city of Guelma (Fig.

S1). This medium-sized mine is one of the richest natural Pb and Zn reservoirs in Algeria. Exploited from 1900 to 1939, the mine disseminated high levels of heavy metal into the environment. The average content of Zn and Pb detected in the Djedada's mine varied from 0.6 to 11.3% and 0.05 to 0.4%, respectively (Merda 2006). The mine area is located in subtropical climate which characterizes the Algerian Mediterranean littoral (Merda 2006).

Plant material

Four *Trifolium* sp. plants were harvested in May 2016, at the entrance of Djedada's mine with a distance of approximately 1 m between each one. The samples were placed in individual plastic bags, transported to the laboratory and stored at 4 °C until processing.

Strain isolation and culture conditions

The nodules were surface-disinfected by immersion in 95% ethanol for 30 s, then in 5% sodium hypochlorite for 3 min, and finally in 3% H₂O₂ for 20 s. Immediately after disinfection, nodules were rinsed seven times with sterile distilled water. To check the surface sterilization process, aliquots of the distilled water used for final rinse were spread on YEMA medium as control.

For isolation, nodules were cut with a sterile cutter, then the nodules contents were streaked on YEMA medium. After incubation at 28 °C for 5 days, individual colonies were repeatedly streaked on Tryptone Yeast Agar medium (TY) plates until single homogenous colonies were obtained. The purified isolates were conserved at 4 °C on TY medium for common use and at – 20 °C and – 80 °C in 30% glycerol (v/v) for long storage.

Morphological and cultural characterization of isolates

For the primary identification and characterization of isolates, morphological and cultural tests were used. The morphological characterization was carried out by recording colonies characters based on the shape, aspect, texture and color on TY medium, followed by Gram staining. The cultural tests viz., the absorption of the Congo Red dye (CR) and the acidification or alkalization of the YEMA medium by the isolates were estimated after 3 days of growth on YEMA supplemented with CR (0.0025%) and Bromothymol blue (BTB 0.0025%), respectively (Wdowiak-Wrobel and Malek 2000; Shetta et al. 2011). Catalase activity was determined according to Smibert and Krieg (1994).

Yeast-isolate culture on N-free medium

The Yeast-Isolate RSRod01 was streaked on YEMA medium without nitrogen source (Mannitol 10 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, $(NH_4)_2MoO_4$ 0.025 g, Agarose 15 g) and incubated for 4 days at 30 °C.

Nitrogen fixation by acetylene reduction assay (ARA)

The nitrogen-fixing ability of the yeast-isolate RSRod01 was tested using the acetylene reduction assay (ARA) as described by Hardy et al. (1968). The isolate was inoculated in 70 mL tube containing 30 mL semi solid YEMA medium without nitrogen source and incubated at 28 °C for 3 days. Then, 1 mL of air from the tube was replaced by acetylene gas with a syringe. After incubation for 12 h, 0.4 mL gas was withdrawn from the tube, and ethylene formation was analyzed by a gas chromatograph GC7820 equipped with flame ionization detector.

Template DNA preparation

The colonies of each isolate were picked from pure TY cultures, and were diluted in 20 μ L of sterile distilled water. To release genomic DNA, cell lysis was performed by heat shock using subsequent thermal cycling (13 cycles of 20 s at 95 °C–20 s at 4 °C). The resulting lysate served as a template for the amplification.

PCR amplification

The 16S rRNA gene was amplified using the universal primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rP2 (5'-ACG GCT AAC TTG TTA CGA CT-3') (Weisburg et al. 1991). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified using the universal primers ITS1 (5'-TCC GTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). The *nodC* gene was amplified with the primers *nodCF* (5'-AYGTH-GTYGAYGACGGTT-3') and *nodCI* (5'-CGYGACAGC-CANTCKCTATTG-3') (Laguerre et al. 2001). The *nifH* was amplified using the primers *nifHF* (5'-AAAGGYGGW ATCGGYAARTCCACCAC-3') and *nifHR* (5'-TTGTTSGC-SGCRTACATSGCC ATCAT-3') (Rösch et al. 2002). The mixtures used for PCR contained 4 μ L Taq buffer ($\times 5$), 2 μ L DNA template, 0.4 μ L dNTPs (2.5 mM each), 0.4 μ L of each primers, 0.4 μ L Taq polymerase (GoTaq, Promega) and highly purified water was added up to 20 μ L. PCR parameters of all genes are described in the Supplementary material Table S1. PCR products were checked by horizontal electrophoresis on 1% agarose gels then purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according

to the manufacturer's instructions, and analyzed by Sanger sequencing (Eurofine, Germany) using the primers used to generate the PCR products.

Sequence analysis

All reference sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and similarities between sequences were performed using the BLASTN tool in the NCBI database. Sequences were aligned using the multiple sequence alignment programs, ClustalW (Thompson et al. 1994) in MEGA version 7.0 (Kumar et al. 2016). Then phylogenetic trees were generated using the Neighbour-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) based on two-parameter model. The stability of relationships was assessed by performing bootstrap analysis of the NJ data based on 1000 replications (Felsenstein 1985).

Nucleotide sequences accession numbers

The sequences obtained in this study were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database under accession numbers MW049066–MW049114 for 16S rRNA, MW049115 for ITS, MW080953–MW080958 for *nodC* and MW091475–MW091480 for *nifH*.

Results

Isolation, morphological and cultural characterization of the isolates

In this study, fifty strains were isolated from the legume nodules of *Trifolium* sp. Morphological and biochemical characterization of all isolates are presented in Supplementary material Table S2.

The results showed that the type of colonies of all isolates on TY medium varied from rough to smooth, opaque to translucent, regular to irregular shape and have different colors, such as white, white-off, beige, yellow, orange and pink. Thirty-four isolates were Gram positive and fifteen were Gram negative (Supplementary material Table S2).

The Congo red dye test showed that 74% of the isolates did not absorb the red dye. Almost all isolates have acidified the YMA-BTB medium, except the isolates (RSCup01–RSCup08) that have alkalized the medium. For isolates RSKoc01 and RSRod01 the pH of the medium remained neutral. All the bacterial isolates in the present study were catalase positive (Supplementary material Table 2).

Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene

The phylogenetic analyses of bacterial isolates were assessed by the alignment of 16S rRNA sequences using BLAST search facilities on the GenBank database. The results of Fig. 1 showed that all the isolates were affiliated to three major phyla; Proteobacteria (68%), followed by Actinobacteria (22%) and Firmibacteria (8%).

Gamma-Proteobacteria Class included bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, *Providencia*, *Enterobacter* and *Acinetobacter*. Four isolates RSPs06, RSPs07, RSPs08 and RSPs09 were close to *Pseudomonas thivervalensis*, three isolates RSPs03, RSPs04 and RSPs05 were grouped with *Pseudomonas frederiksbergensis*. RSPs01 was grouped with *Pseudomonas putida* and RSPs02 formed a separate cluster. The isolate RSEnt01 was grouped with *Enterobacter xiangfangensis*. RSPPro01 was close to *Providencia rettgeri*. The isolate RSAci01 has formed a branch with *Acinetobacter beijerinckii*, but RSAci02 formed a separate cluster.

Beta-Proteobacteria Class contained bacteria belonging to the genus *Cupriavidus*. The following eight isolates RSCup01, RSCup02, RSCup03, RSCup04, RSCup05, RSCup06, RSCup07 and RSCup08 formed a single cluster with *Cupriavidus paucula*.

Alpha-Proteobacteria Class included bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, *Roseomonas* and *Paracoccus*. Eleven isolates RSRh01, RSRh02, RSRh03, RSRh04, RSRh05, RSRh06, RSRh07, RSRh08, RSRh09, RSRh10 and RSRh11 affiliated to *Rhizobium* genus shared sequence similarity with *Rhizobium* sp. The isolate RSRos01 was clustered with *Roseomonas vinaceus*, and the isolate RSPar01 was grouped with *Paracoccus marcusii*.

Firmibacterial phylum comprised bacteria belonging to the genus *Bacillus* and *Staphylococcus*. Three isolates belonged to the *Bacillus* genus; isolates RSBac02 and RSBac03 were grouped with *Bacillus niacini*, whereas isolate RSBac01 formed a branch with *Bacillus licheniformis*. RSTa01 isolate clustered with *Staphylococcus xylosum*.

Actinobacteria phylum contained bacteria belonging to the genus *Microbacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus* and *Fron-dihabitans*. All of isolates belonged to the genus *Microbacterium* RSMic01, RSMic02, RSMic03, RSMic04, RSMic05, RSMic06, RSMic07 and RSMic08 were grouped with *Microbacterium foliorum*. The isolate RSKoc01 was close to *Kocuria dechangensis*, the strain RSMicc01 was grouped with *Micrococcus yunnanensis* and the isolate RSFr01 was close to *Fron-dihabitans* genus but formed a separate branch from the reference bacteria.

Phylogenetic analysis of nodC gene

To evaluate the symbiotic diversity of *Rhizobium* sp. isolates, the common *nodC* gene was sequenced and NJ

phylogenetic tree was constructed (Fig. 2). The phylogenetic tree showed that the isolates RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 and RSRh08 were clustered in two distinct groups corresponding to the symbiobars trifolii. In the first clade, two isolates RSRh03 and RSRh06 were similar to *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM 1689 with 95% bootstrap support, whereas RSRh07 and RSRh08 isolates were close to *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T-1. In the second clade, the *nodC* of the isolates RSRh01 and RSRh04 showed a close affinity to the *nodC* of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* V-7A and TT-7A, with 100% of sequence identity. Moreover, it was also noteworthy that no *nodC* gene sequences were amplified from isolates RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 and RSRh011 assigned as *Rhizobium* sp. despite of the different attempts allowed of amplification.

Phylogenetic analysis of nifH gene

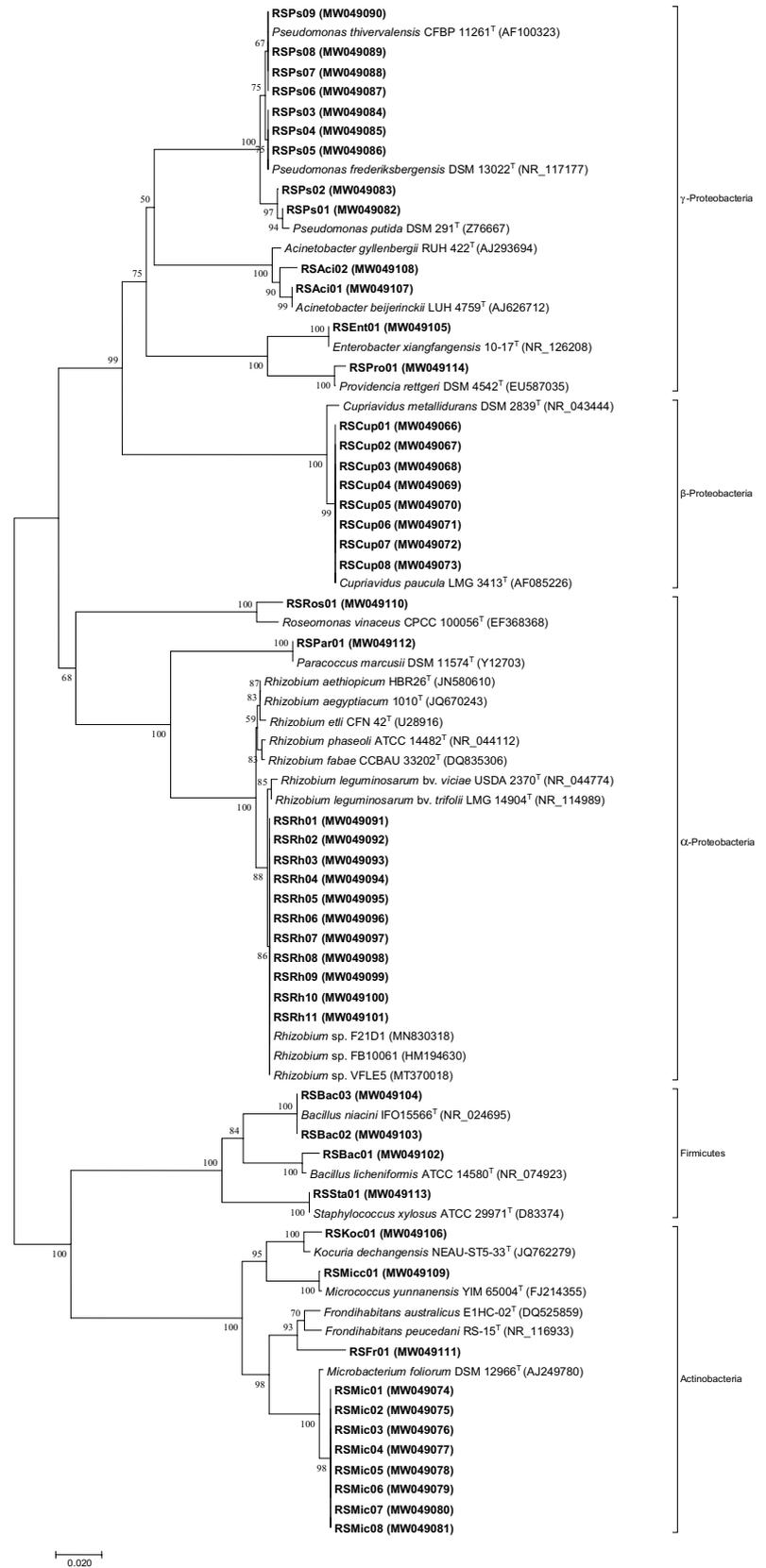
To verify the potential nitrogen fixation capacity of our isolates the *nifH* gene was analyzed. The sequences of the isolates RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 and RSRh08 formed an independent branch and were clustered together with *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, with 95% bootstrap value (Fig. 3). The phylogenetic analysis of nitrogen fixation gene *nifH* confirmed the *nodC* phylogeny and the classification of the isolates within symbiobar trifolii. No amplification of the *nifH* gene was obtained for isolates RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 and RSRh011 even using different types of primers and different amplification conditions.

Characterization and identification of yeast isolate

Examining cultures performed in TY medium, pink colonies were found (Fig. S2-A) grown in 24 h at 28 °C. The microscopic examination showed round blastoconidia without the rudimentary formation of hyphae, suggesting that it may be a yeast strain (Fig. S2-B). In fact, a sequence with a length of 547 bp was obtained when specific primers of the eukaryotic Internal Transcript Sequences (ITS) regions (ITS1 and ITS4) were used. The NJ phylogenetic tree showed that the ITS sequences of the isolate RSRod01 and *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T were grouped in the same cluster and had 99% homology (Fig. S2-C).

It's known that the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* could survive despite low nitrogen content. As shown in Fig. S2-D, the isolate RSRod01 was able to grow on the YEMA medium without nitrogen source, but this result is not sufficient to demonstrate that the strain could fix nitrogen. For this purpose, the nitrogen-fixing efficiency of the isolate RSRod01 was evaluated by the acetylene reduction assay (ARA) under laboratory conditions, and the results show that there are no acetylene reductions.

Fig. 1 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (~1400 bp) showing the relationships of isolated bacteria and reference strains (GenBank database). Bootstrap values (1000 replicates) are indicated above the branches. Accession numbers of reference strains of the studied bacteria are shown in parentheses



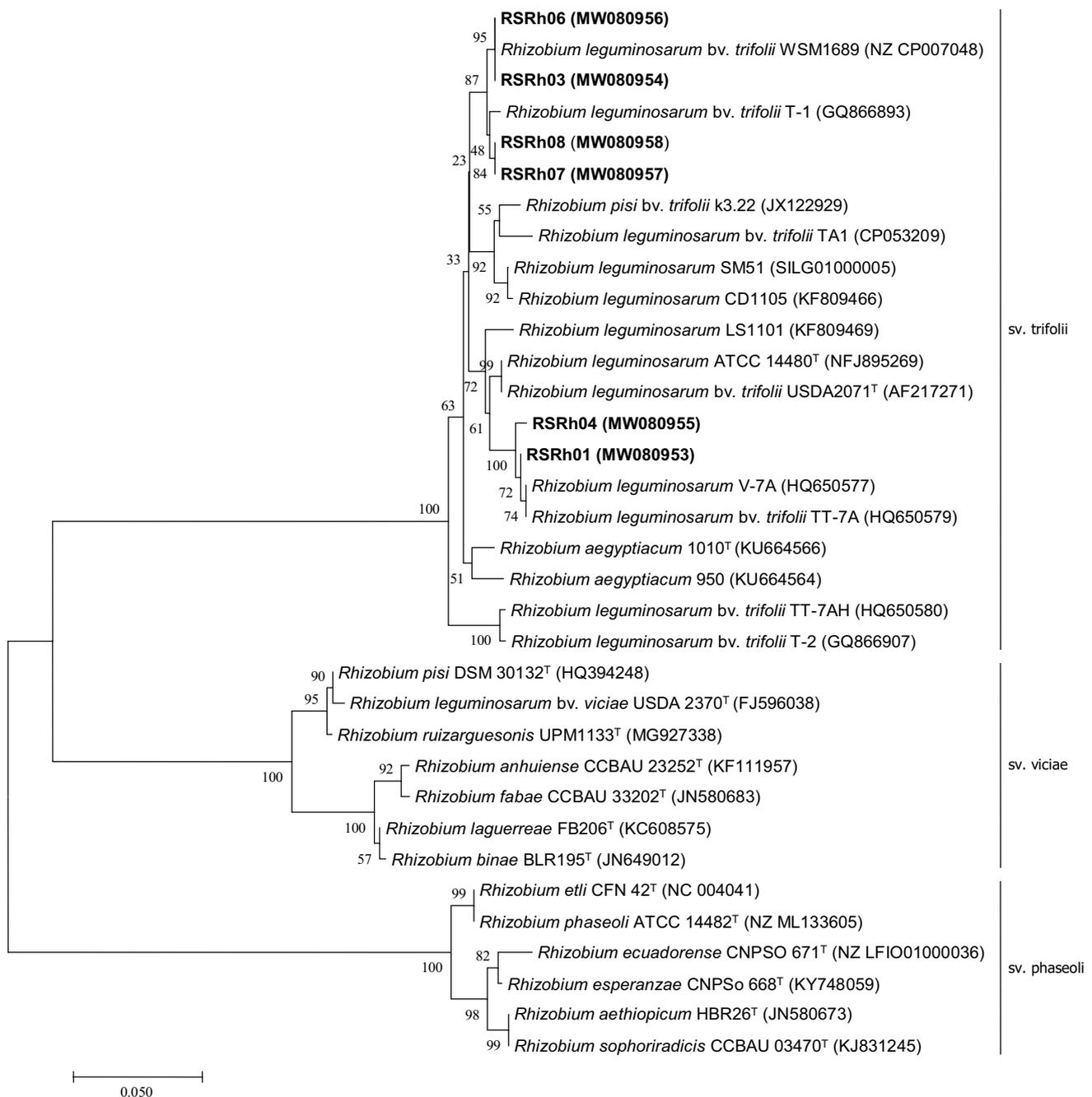


Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on *nodC* gene sequences (~900 bp) showing the relationships of isolated bacteria and reference strains (GenBank database). Bootstrap values (1000

replicates) are indicated above the branches. Accession numbers of reference strains of the studied strains used as representatives are shown in parentheses

Discussion

Plants roots interact with a large number of different microorganisms and the functioning of associative plant–bacterial symbioses in heavy-metal-polluted soil can be affected from the side of both bacteria and the host plant. The diversity of microorganisms change depending

on the ecosystem and their genetic evolution allow them to adapt to environmental changes and survive (Borowik et al. 2017). In the present study, we aimed to explore the diversity of microorganisms communities associated to *Trifolium* sp. nodules in mining soil. Multiple microorganisms were isolated with 76% being non-rhizobia endophytes, 22% rhizobia and 2% yeast.

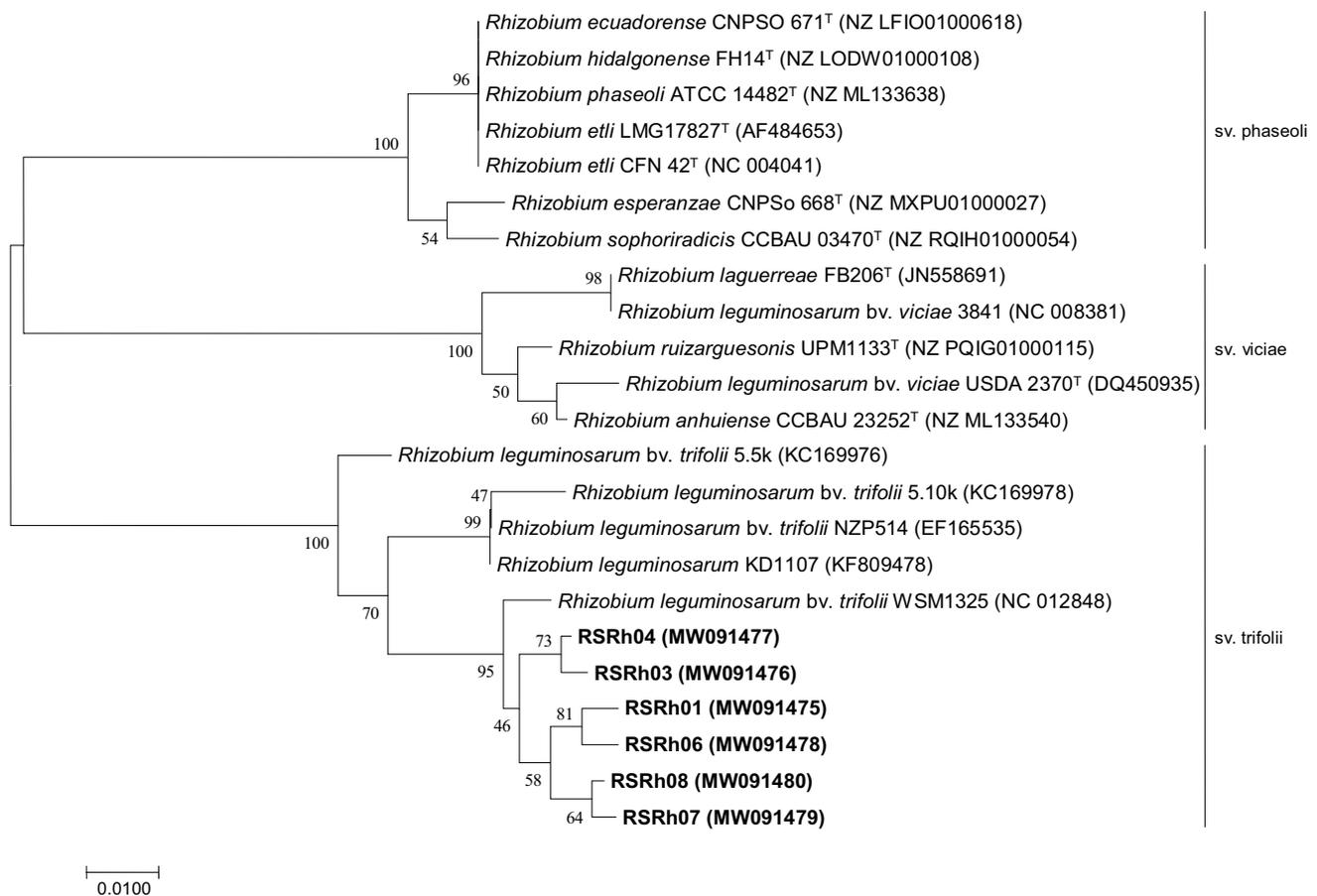


Fig. 3 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on *nifH* gene sequences (~500 bp) showing the relationships of isolated bacteria and reference strains (GenBank database). Bootstrap values (1000

replicates) are indicated above the branches. Accession numbers of reference strains of the studied strains used as representatives are shown in parentheses

Comparative analysis of 16S rRNA sequences showed that rhizobial isolates were most similar to species *Rhizobium* sp. isolated from nodules of *Vicia faba* L. plants growing in different regions in the world (Efstathiadou et al. 2020). Efstathiadou et al. (2020) reported that these new isolates with similar chromosomal backgrounds may be found in different countries and ecosystems. According to this conclusion, here we reported that *Rhizobium* sp. isolates were dominant microsymbiote in *Trifolium* sp. nodules grown on mine soil in Algeria. However, further investigations, such as sequencing whole genome or housekeeping genes, are required to precisely identify these isolates, which could be new species. It is known that several species of *Trifolium* have been nodulated with different rhizobial species (Efrose et al. 2018). Zhang et al. (2016) demonstrated that *Rhizobium anhuiense*, originally isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum*, has been defined as a dominant microsymbiote of *Trifolium repens* in China. In addition, *Rhizobium aethiopicum* is a rhizobial species identified as microsymbiote of *Trifolium alexandrinum* in Egypt although

it was originally isolated from *Phaseolus vulgaris* (Youseif et al. 2020).

The species *Rhizobium aegyptiacum*, *Rhizobium aethiopicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. and *Agrobacterium fabacearum* are known as microsymbiotes of clover (Efrose et al. 2018; Youseif et al. 2020). The identification of *Rhizobium* sp. as the only main rhizobia in our study implied that the rhizobial species associated with clover had been affected by heavy metal stress influencing their diversity. Similar to our results Oleńska and Małek (2015) showed that high concentrations of heavy metals can strongly affect the symbiotic rhizobial diversity of *Trifolium repens* isolated from mining soils. Heavy metal soil contamination is a limiting factor of *Rhizobium*–legume symbiosis, it inhibits the infection process and affects directly nodule formation by decreasing nodule numbers not rhizobial population (Hao et al. 2014).

Moreover, our study showed that nodules are also inhabited by many other non-rhizobial endophytes as *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Cupriavidus*, *Bacillus*,

Acinetobacter, *Enterobacter*, *Providencia*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Frontridians*, *Paracoccus* and *Roseomonas*. These bacteria are considered as opportunists, since they can infect nodules when rhizobia induce nodule formation (Leite et al. 2017). This result is consistent with Oleńska et al. (2020) studies who found more than one species of non-rhizobia in the nodules of *Trifolium repens*. In addition, various species were isolated from nodules of *Robinia pseudoacacia* and *Hedysarum spinosissimum* L, in polluted soil (Sbabou et al. 2016; Fan et al. 2018). Some of non-rhizobia endophytes reported in this study were already isolated from root nodules of legumes collected in mining soil, such as *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Micrococcus* (Oleńska et al. 2020), *Cupriavidus* and *Enterobacter* (Fan et al. 2018). However, the remaining genera identified in this work including *Paracoccus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Frontridians*, *Providencia* and *Roseomonas* genera are reported in *Trifolium* nodules for the first time in our study. Therefore, the present study shows that a large diversity of non-rhizobia endophyte bacterial genera was simultaneously isolated from the same root nodules of *Trifolium* plants as rhizobia, offering the possibility to reveal the correlation between rhizobia and non-rhizobia endophytes and their habitats.

The predominance of non-rhizobia isolates was attributed to the genus *Pseudomonas*, this result confirms the work done by Cardoso et al. (2018) who reported that the genus *Pseudomonas* was one of the most dominant genera in the root nodules of several legume species. In addition, *Pseudomonas* is commonly classified as a plant bacterial endophyte, and is commonly found in a polluted environment and could tolerate high concentrations of heavy metals (Fan et al. 2018). A recent study by Oleńska et al. (2020) reported abundant *Pseudomonas* isolates in the *Trifolium repens* nodules growing in Pb–Zn contaminated areas. The second most predominant genera in our study were *Cupriavidus* and *Microbacterium*; these genera have been reported as common soil bacteria and endophytes of many plants growing in metal-contaminated soils. Román-Ponce et al. (2016) reported that the genus *Microbacterium* was the most dominant endophytic bacteria found in *Brassica nigra* plant isolated from Pb–Zn–Ag mine. Regarding to the genus *Cupriavidus* is known for their abundance in heavy metal-contaminated environments (Shi et al. 2020). Recent studies reported that plant species and soil conditions, have a substantial effect on the specific structure of microbial populations (Borymski et al. 2018; Yang et al. 2018). The influence of plant species has been clearly shown in several studies including *Triarrhena sacchariflora*, *Cynodon dactylon*, *Silene vulgaris*, *Poa annua* L., *Artemisia annua* L., *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis halleri* and *Trifolium repens* L. (Borymski et al. 2018; Yang et al. 2018). Each plant act as true filters of microorganisms, and structure

their rhizosphere microorganisms by selecting certain bacteria in their root nodules that support them in environmental stresses including heavy metals (Etesami and Beattie 2017). Plants can create specific environment for microbes that could be adapted to survive in high metal concentrations and get benefitted from plants by the augmented availability of nutrients (Etesami and Beattie 2017).

In addition to bacteria, in this study, we isolated one yeast strain and identified as *Rhodotorula mucilaginosa*. *Rhodotorula* genus is common in contaminated sites and very used in bioremediation due to its ability to survive to stress caused by the presence of heavy metals (Garza-Gonzalez et al. 2016). *Rhodotorula mucilaginosa* was already isolated from root nodules of lupine (Nemeth 1959); however, to our knowledge, the present study is the first to show the presence of *Rhodotorula mucilaginosa* in the root nodules of *Trifolium* sp. This non-rhizobial endophytic yeast has been the subject of particular attention for its ability to grow in the absence of nitrogen source. The N₂-fixation property is absent in eukaryotes; however, according to Sen et al. (2019) *Rhodotorula* strains could not convert nitrate and nitrite to ammonium but can improve nitrogen fixation by associating with N₂-fixing microbes. Paul et al. (2019) suggests that the environment within the yeast facilitates the N₂-fixation of diazotrophic endobacteria reminiscent of the N₂-fixation of *Rhizobium* within the root nodule.

Symbiotic genes are usually used to analyze the evolutionary symbiotic relationships. Our bacterial strains were tested, with detection of the *nodC* and *nifH* genes to reveal the presence of these genes as an indicator for their symbiotic potential. The analysis of the nodulation gene *nodC* and nitrogen fixation gene *nifH* showed that strains RSRh01, RSRh03, RSRh04, RSRh06, RSRh07 and RSRh08 belong to the symbiovar *trifolii* and shared sequences similarities of the *nodC* and *nifH* genes with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. A comparison of the *nodC* genes of our isolates with those of other strains nodulating different legumes species in different continents from both metalliferous and non-metalliferous areas showed that they formed two separate clusters. Haplotype A (Clade 1) was identical to *R. leguminosarum* found in *Trifolium uniflorum* and *Trifolium subterraneum* previously isolated from Greece and Spain, respectively. Haplotype B (Clade 2) was close to *Rhizobium leguminosarum* V-7A and TT-7A found in *Vicia sativa* and *Trifolium tomentosum*, respectively, growing in high Hg-contaminated soils in Spain. Young et al. (2021), reported that the sequences of nodulation genes of the three symbiovars, *viciae*, *trifolii* and *phaseoli* are very distinct, but there is also polymorphism within each symbiovar. For the remaining rhizobia, symbiotic genes could not be amplified although different sets of primers were used. Similar to our results, Aserse et al. (2013) have isolate *Rhizobium* species but failed

to amplify *nodC* and *nifH*. This failure may result from nucleotide mismatches between the genes of these strains and the primers used for the amplification, or the absence of *nodC* and *nifH* genes in the isolates RSRh02, RSRh05, RSRh09, RSRh010 and RSRh011.

Conclusion

This study was carried out to analyze the microbial population of nodules of *Trifolium* sp. grown in Pb–Zn Djedada mine soil. *Trifolium* sp. of great interest harbored a high diversity of microorganisms in their root nodules. The interactions between plants and microbes can play an important role in the survival and growth of plants in contaminated soils by selecting several species. The representative rhizobial strains analyzed were close to *Rhizobium* sp. and the nodulation and nitrogen fixation genes phylogenies showed that all the strains belong to the symbiovar trifolii. Our results showed that other bacteria besides rhizobia can be found in *Trifolium* sp. nodules, particularly *Pseudomonas*, *Cupriavidus* and *Microbacterium*. This study revealed also the presence of non-rhizobial endophytic yeast identified as *Rhodotorula mucilaginosa*. All these isolates might influence the growth of *Trifolium* sp. under metal stress and it would be interesting to sequence their whole genome or some housekeeping genes to improve their taxonomic position.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02362-y>.

Acknowledgements We are grateful to Benjamin Gourion for hosting Sarah Rahal in Laboratory of Plant-Microbe Interactions (LIPM), for the help in the experiments and his extremely useful advice throughout this research. The authors would like to thank also Laurent Sauviac, Claire Benezech and Bryan Ruiz for their help and advice.

Author contributions SR performed the experiments. SR and DC wrote the paper.

Funding This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria. The funding bodies had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data, or in writing the manuscript.

Availability of data and materials The data sets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author (Sarah Rahal) on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors state no competing interest.

References

- Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Laouar M (2004) Genetic resources of forage and/or pastoral interest: diversity, collection and valorization at the Mediterranean level. *Cah Options Mediterr* 62:29–41. <http://om.ciheam.org/om/pdf/c62/04600124>
- Amari T, Ghnaya T, Abdely C (2017) Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South Afric J Bot* 111:99–110. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.011>
- Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, Hailemariam A, Lindström K (2013) Diversity of sporadic symbionts and non-symbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:10117–10134. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5248-4>
- Borowik A, Wyszowska J, Kucharski J, Baćmaga M, Tomkiel M (2017) Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbutylazine, mesotrione, and S-metolachlor. *Environ Sci Pollut Res* 24:1910–1925. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7919-z>
- Borymski S, Cycon M, Beckmann M, Mur LAJ, Piotrowska-Seget Z (2018) Plant species and heavy metals affect biodiversity of microbial communities associated with metal-tolerant plants in metalliferous soils. *Front Microbiol* 9:1425. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01425>
- Cardoso P, Alves A, Silveira P, Sá C, Fidalgo C, Freitas R, Figueira E (2018) Bacteria from nodules of wild legume species: phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. *Sci Total Environ* 645:1094–1102. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.399>
- De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.002>
- Efrose RC, Rosu CM, Stedel C, Stefan A, Sirbu C, Gorgan LD, Labrou NE, Flegmetakis E (2018) Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:135–153. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0934-3>
- Efstathiadou E, Savvas D, Tampakaki AP (2020) Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. *Syst Appl Microbiol* 43:126149. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126149>
- Etesami H, Beattie GA (2017) Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions. *Probiotics and Plant Health*, Springer, Singapore, p 163–200
- Fan M, Liu Z, Nan L, Wang E, Chen W, Lin Y, Wei G (2018) Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area. *Microbiol Res* 217:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.002>
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Garza-Gonzalez MT, Perez DB, Rodriguez AV, Garcia-Gutierrez DI, Zarate X, Cardenas MEC, Medina-Ruiz P (2016) Correction: Metal-induced production of a novel bioadsorbent exopolysaccharide in a native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican northeastern region. *PLoS ONE* 11:e0150522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150522>
- Giller KE, Witter E, McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* 30:1389–1414. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)

- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L (2015) Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech* 5:355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
- Graham PH (2008) Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds) *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer, Dordrecht, pp 23–43
- Guo D, Fan Z, Lu S, Ma Y, Nie X, Tong F, Peng X (2019) Changes in rhizosphere bacterial communities during remediation of heavy metal-accumulating plants around the Xikuangshan mine in southern China. *Nature* 9:1947. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38360-2>
- Hao X, Taghavi S, Xie P, Orbach MJ, Alwathnani HA, Rensing C, Wei G (2014) Phytoremediation of heavy and transition metals aided by Legume-Rhizobia Symbiosis. *Int J Phytorem* 16:179–202. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.773273>
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43:1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Mol. evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laguette G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147:981–993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
- Leff JW, Bardgett RD, Wilkinson A, Jackson BG, Pritchard WJ, de Long JR, Oakley S, Mason KE, Ostle NJ, Johnson D, Baggs EM, Fierer N (2018) Predicting the structure of soil communities from plant community taxonomy, phylogeny, and traits. *ISME J* 12:1794–1805. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0089-x>
- Leite J, Fischer D, Rouws LFM, Fernandes-Júnior PI, Hofmann A, Kublik S, Schlöter M, Xavier GR, Radl V (2017) Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Front Plant Sci* 7:2064. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02064>
- Merdas B (2006) Contribution to the geological study of the mineralizations of the Hammam N°bail region (North East Algeria). Dissertation, USTHB, Alger
- Nemeth G (1959) *Nature* 183:1460–1461
- Oleńska E, Małek W (2015) Genetic differentiation of *Trifolium repens* microsymbionts deriving from Zn–Pb waste-heap and control area in Poland. *J Basic Microbiol* 55:462–470. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400604>
- Oleńska E, Imperato V, Małek W, Włostowski T, Wójcik M, Swiecicka I, Vangronsveld J, Thijs S (2020) *Trifolium repens*-associated bacteria as a potential tool to facilitate phytostabilization of zinc and lead polluted waste heaps. *Plants* 9:1002. <https://doi.org/10.3390/plants9081002>
- Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A, Caviedes MÁ (2011) Legume–Rhizobium Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. In: Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J (eds) *Biomangement of metal-contaminated soils. Environmental pollution*, vol 20. Springer, Dordrecht, pp 95–123. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9_4
- Paul K, Chinmay S, Nag M, Mandal D, Naiya H, Sen D, Mitra S, Kumar M, Bose D, Mukherjee G, Naskar N, Lahiri S, Ghosh U, Tripathi S, Sarkar MP, Banerjee M, Kleinert A, Valentine AJ, Tripathy S, Sinharoy S, Seal A (2019) Tripartite interaction among the basidiomycete *Rhodotorula mucilaginosa*, N₂-fixing endobacteria, and rice improves nitrogen nutrition in plants. *Plant Cell* 32:486–507. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00385>
- Prasad MNV, Freitas HMD (2003) Metal hyperaccumulation in plants—biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol* 93:285–321. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-6>
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH (2017) Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem* 119:157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Román-Ponce B, Ramos-Garza J, Vásquez-Murrieta MS, RiveraOrduña FN, Chen WF, Yan J, Wang ET (2016) Cultivable endophytic bacteria from heavy metal(loid)-tolerant plants. *Arch Microbiol* 198:941–956. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1252-2>
- Rösch C, Mergel A, Bothe H (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol* 68:3818–3829. <https://doi.org/10.1128/aem.68.8.3818-3829.2002>
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sbabou L, Idir Y, Bruneel O, Le Quéré A, Aurag J (2016) Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Hedysarum spinosissimum* L., growing in mining sites of northeastern region of Morocco. *SOJ Microbiol Infect Dis* 4:1–8
- Sen D, Paul K, Saha C, Mukherjee G, Nag M, Ghosh S, Das A, Seal A, Tripathy S (2019) A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint. *DNA Res* 26:131–146. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy044>
- Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M (2011) Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am J Agric Environ Sci* 10:410–418
- Shi Z, Zhang Z, Yuan M, Wang S, Yang M, Yao Q et al (2020) Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2. *Chemosphere* 247:125834. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125834>
- Smibert RM, Krieg NR (1994) Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, pp 611–651
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Wang L, Lin H, Dong Y, He Y, Liu C (2018) Isolation of vanadium resistance endophytic bacterium PRE01 from *Pteris vittata* in stone coal smelting district and characterization for potential use in phytoremediation. *J Hazard Mater* 341:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.036>
- Wdowiak-Wrobel S, Małek W (2000) Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. *Curr Microbiol* 41:142–148. <https://doi.org/10.1007/s002840010108>
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). Academic Press, San Diego
- Wong MH (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50:775–780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)
- Xiong T, Leveque T, Shahid M, Foucault Y, Mombo S, Dumat C (2014) Lead and cadmium phytoavailability and human bioaccessibility for vegetables exposed to soil or atmospheric pollution by

- process ultrafine particles. *J Environ Qual* 43:1593–1600. <https://doi.org/10.2134/jeq2013.11.0469>
- Yang F, Wu J, Zhang D, Chen Q, Zhang Q, Cheng XL (2018) Soil bacterial community composition and diversity in relation to edaphic properties and plant traits in grasslands of southern China. *Appl Soil Ecol* 128:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.04.001>
- Young JPW, Moeskjær S, Afonin A, Rahi P, Maluk M, James EK, Cavassim MIA, Rashid MH, Aserse AA, Perry BJ, Wang ET, Velázquez E, Andronov EE, Tampakaki A, Félix JDF, González RR, Youseif SH, Lepetit M, Boivin S, Jorin B, Kenicer GJ, Peix A, Hynes MF, Ramírez-Bahena MH, Gulati A, Tian C (2021) Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes* 12:111. <https://doi.org/10.3390/genes12010111>
- Youseif SH, El-Megeed FHA, Mohamed AH, Ageez A, Veliz E, Martínez-Romero E (2020) Diverse *Rhizobium* strains isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum* in Egypt and symbiovars. *Syst Appl Microbiol* 44:126156. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126156>
- Zhang JJ, Jing XY, de Lajudie P, Ma C, He PX, Singh RP, Chen WF, Wang ET (2016) Association of white clover (*Trifolium repens* L.) with rhizobia of sv. trifolii belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China. *Plant Soil* 407:417–427. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2899-9.13>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.