



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Labdi manel

Zeroual samah

Le : 2020/2021

Thème

Isolement et caractérisation phénotypique des rhizobia nodulant des légumineuses spontanées et cultivées des sols arides

Jury :

Mme. Hassina Ghiti

MCB Université de Biskra

Président

Mlle. Souad BABA ARBI

MCB Université de Biskra

Rapporteur

Mr. Abdlhamid Moussi

MCA Université de Biskra

Examineur

Remerciements

Nous remercions tout d'abord mon **Dieu** qui m'a donné le courage et la patience dans ma vie et pour sa présence continue qui m'a aidé à surmonter toutes les difficultés et l'endurance qu'il m'a fournie pour terminer ce travail. Toujours en lui j'ai mis toute ma confiance et ne m'a jamais déçu.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur Madame **BABA ARBI Souad** pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail, et je ne peux pas jamais oublier ses encouragements et ses conseils.

Mes remerciements s'adressent aussi aux jurys, pour avoir accepté de juger mon travail. Je tiens à remercier également toutes les équipes de laboratoire du département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Mohamed Khider-Biskra.

Toutes les personnes ayant contribué à la réalisation et l'aboutissement de ce modeste travail trouvent ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A la lumière de mes jours, la flamme de mon coeur, ma vie et mon bonheur ; maman
HOURIA que j'adore.

A mon très cher père **LABDI MEKKI** pour lequel je souhaite une longue et heureuse
vie pleine de bonheur, pour leurs sacrifices sans limites, leur amour et leur encouragement, la
personne qu'il me pousse vers l'avant et qu'il me donne l'espoir

A ma chère sœur Aya.

A mes très cher frères **Mohammed Rida** et **Okba** la personne qui ma soutient et m'a
encouragé, **Yahia** et **Maamoun** je souhaite une longue et heureuses vie pleine de bonheur

Et la petite de ma famille surtout **Nour el djenna**

A toute ma grande famille **Labdi** et **Mahmoudi**.

Pour mon binôme: **Samah**

A tous mes amis et les personnes qui me cannaient.

MANEL

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde, qui sont la lumière de Mes yeux et les deux bougies de ma vie et qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études. Source de tendresse et de sacrifice et mon respectueux « **Mon père**»

La flamme qui éclaire ma vie « **Ma mère** ». Que je ne cesserai jamais de remercier. Leur soutien et leurs Encouragements durant mes années d'étude, et aussi pour leur sacrifice, Leur patience sans limite et l'éducation qu'il m'ont donnée, Je leur dit merci mille fois. Puisse Dieu me les garder.

Je ne pourrais jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

Mes frères Samir et **Nadhir**

Mes sœurs **Hanane, Fayza** et **Selma**

Leurs filles et fils

A mon bras droit, ma moitié et mon binôme **Manel** qui m'a apporté : Force, amitié, patience

A toutes mes amies et collègues

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, A tous que j'aime

Je dédie ce travail

SAMAH

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des Tableaux I

Liste des Figures II

Liste des abréviations III

Introduction 1

Première partie SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Généralité sur les Symbiose *Rhizobia*-Légumineuse Et la fixation d'azote

1.1. Généralités 3

1.1.1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique 3

1.1.2. Les microorganismes fixateurs d'azote 3

1.1.2.1. Les fixateurs libres 3

1.1.2.2 Les fixateurs symbiotiques 3

1.1.3. La fixation symbiotique d'azote atmosphérique 4

1.1.4. Importance de la fixation symbiotique d'azote 4

1.2. La macro symbionte : les légumineuses 4

1.2.1. Importance des légumineuses 5

1.2.2. Exemple des légumineuses 5

1.2.2.1. Le genre *Medicago* 5

1.2.2.2. Le genre *Melilotus* 7

1.3. Le micro symbionte: les *rhizobia* 8

1.3.1. Caractères généraux des *Rhizobia* 8

1.3.1.1. Caractères symbiotiques 8

1.3.1.2. Caractères culturels 8

1.3.1.3. Caractères biochimiques 8

1.3.2. Taxonomie des <i>Rhizobia</i>	9
1.3.3. Classification des <i>rhizobia</i>	9
1.4. Etablissement de la symbiose Rhizobium-légumineuse	10

Deuxième partie: PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

2.1. Collecte d'échantillons	11
2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules	11
2.2.1. Stérilisation de la surface des nodules	11
2.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boites	11
2.3. Examen microscopique des isolats.....	12
2.3.1. Coloration de Gram	12
2.3.2. Purification des isolats.....	12
2.4. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des rhizobia	12
2.4.1. Caractérisation phénotypique	12
2.4.1.1. Tolérance aux différentes concentrations de NaCl	12
2.4.1.2. Tolérance à la température.....	13
2.4.1.3. Test de tolérance aux différents pH	13
2.4.1.4. Test de tolérance au stress hydrique.....	13
2.4.1.5. Test du 3-Cétolactose.....	14
2.4.2. Caractérisation phylogénétique	14
2.4.2.1. Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S	14
2.4.2.2. Extraction de l'ADN bactérien	15
2.4.2.3. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S	15

Chapitre 3: Résultats et discussion

3.1. Isolement des bactéries à partir des nodules	16
3.2. Caractères morphologiques et culturels des isolats de rhizobia.....	17

3.2.1. Caractères cultureux des isolats de rhizobia.....	17
3.2.2. Caractéristique morphologique.....	18
3.2.2.1. Caractéristique macroscopiques.....	18
3.2.2.2. Caractéristique microscopique.....	18
3.3.Caractérisation phénotypique.....	19
3.3.1.Les tests physiologiques.....	19
3.3.1.1.Tolérance aux différentes concentrations de NaCl.....	19
3.3.1.2. La tolérance à la température.....	19
3.3.1.3.Test de tolérance aux différents pH.....	20
3.3.1.4.Test 3-cétolactose.....	21
3.3.1.5. La tolérance au stress hydrique.....	21
3.4.Caractérisation phylogénétique des isolats : Séquençage et analyse phylogénétique du gène de l'ARN r 16S.....	22
Conclusion.....	25
Références Bibliographies.....	27
Annexe	
Résumé	

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les promoteurs d'amplification et de séquençage.	15
Tableau 2: Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses dans région différent.	16
Tableau 3: Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARN r 16S des six isolats.	23

Liste des Figures

Figure 1: Diffrentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-léguimineuse	10
--	----

Liste des abréviations

SNF : Symbiotic nitrogen fixation

EPS: Exopolysacaride

PHB: Poly-hydroxybutyrat

LMR: Maximal résistant level

PSR: Phosphate solubilization ability of rhizobial

N₂: Azote moléculaire

NH₃: Azote ammoniacal, ou ammoniac

ETM: Éléments-Traces Métalliques

CaCl₂ : Chlorure de Calcium.

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol Broth.

GPA: Glucose Peptone Agar

BTB: Bleu de bromothymol

NaCl: Chlorure de sodium

RC: Rouge Congo

pH : potentiel hydrogène

BCP: Pourpre de bromocrésol

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

Fig : Figure

EPS : Exo polysaccharide

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ARN r: Acide ribonucléique ribosomique

PCR: Polymérase Chain Réaction (Réaction en chaîne de polymérisation)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

NCBI: National Center for Biotechnology Information

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Introduction

Introduction

L'azote constitue une réserve inépuisable dans l'atmosphère qui contient 78% de N₂, alors que dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitant les productions agricoles, comme tous les organismes eucaryotes, sont incapables d'utiliser l'azote moléculaire N₂. Seuls certains procaryotes, appelés fixateurs d'azote, sont capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniacque assimilable par les plantes. Ils existent des fixateurs libres et des fixateurs symbiotiques tels que des bactéries appelées communément Rhizobia ou BNL «Bactéries Nodulant les Légumineuses» (Moulin *et al.*, 2002), qui s'associent à la majorité des plantes de la famille des Légumineuses.

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des bactéries fixatrices d'azote. L'association symbiotique légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Elle est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Gage, 2004).

Ainsi ces plantes, par leurs intérêts agronomique, alimentaire et écologique, se trouvent actuellement au centre des préoccupations des instances internationales. Leur importance est due entre autres à leur contribution, chaque année, à la fixation d'environ 65 millions de tonnes d'azote atmosphérique intégrés dans la biosphère (Graham *et al.*, 2003).

Dans les régions arides, la faible fertilité du sol limite souvent la productivité des plantes (Toutain 1974). L'azote constitue un élément indispensable pour le développement et la productivité des plantes dans le sol généralement pauvre en matière organique de ces régions (Fitouri Dhane *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2013).

L'objectif de ce travail est l'isolement et la caractérisation phénotypique et phylogénétique des rhizobia associées aux légumineuses des genres *Melilotus* et *Medicago* issues des régions arides.

Ce travail est réalisé en deux parties, une première partie consiste à une synthèse bibliographique : Chapitre 1: Généralités sur les *rhizobia* et la fixation biologique de l'azote atmosphérique.

Et une deuxième partie (partie expérimental) consiste à analyser des articles et à rédiger un mémoire de littérature scientifique, construite à deux chapitres : un chapitre décrit les matériels et les méthodes utilisés pour la caractérisation des *rhizobia*.

Le quatrième chapitre concerne la synthèse des résultats obtenus à partir des articles étudiés et leur discussion.

Enfin, les conclusions tirées de ce travail et les perspectives pour les prochaines études.

Première partie
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1
Généralité sur les
Symbiose
Rhizobia-
Légumineuse
Et la fixation d'azote

1.1 . Généralités

1.1.1 . La fixation biologique de l'azote atmosphérique

Les *rhizobiums* sont des bactéries particulières qui peuvent vivre dans le sol ou dans les nodules formée sur les racines des légumineuses. Ces nodules racinaires, elles forment une association symbiotique avec la légumineuse obtenant des nutriments de la plante et la production d'azote, appelé fixation biologique d'azote (Hussain *et al.*, 2002).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains microorganismes transforment l'azote de l'air (N₂ ou diazote) en ammoniac (Huheevet *et al.*, 1996; Rose et Mueller, 2006).

1.1.2 . Les microorganismes fixateurs d'azote

Selon leur relation avec les plantes, on peut classer les fixateurs d'azote en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques (Bogusz et Franche, 1985).

1.1.2.1 . Les fixateurs libres

Sont représentés essentiellement par des *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhodospirillum* (Mouafek, 2010).

Ces sont caractérisées par la formation d'un nouvel organeau niveau des racines, le nodule ou nodosité, à l'intérieure duquel certaines cellules sont envahies par les microsymbiotes fixateurs d'azote qui se retrouvent séquestre dans des structures membranaires d'origine végétal formant un organite propre aux symbioses *rhizobia*-légumineuses et *Frankia-plant actinorhiziennes* : le nodule (Djouadi, 2018).

1.1.2.2 . Les fixateurs symbiotiques

la propriété symbiotique de fixation d'azote dans les nodules des plantes vasculaires est rencontrée chez deux groupes majeurs de bactéries phylogénétiquement différents ; les *rhizobia* (principalement Alpha-Proteobacteria) qui s'associent essentiellement avec des plantes légumineuses appartenant à la sous-famille des angiospermes (*Fabaceae*), et les *Frankia* (des *Actinobacteria*) qui s'associent avec un spectre plus large des plantes (Franche *et al.*, 2009) .

1.1.3. La fixation symbiotique d'azote atmosphérique

Est l'un des processus biologiques les plus importants qui influencent la production des plantes et la fertilité des sols (Serraj *et al.*, 2004 ; Franche *et al.*, 2009).

Ceci est dû aux grandes quantités d'azote atmosphérique apportées au sol par ce processus et dont la fixation symbiotique par les *rhizobia* qui vivent dans les nodules racinaires des plantes légumineuses constitue le mécanisme le plus important (Abdel- Ghafar ,1989 ; Franche *et al.*, 2009).

L'association symbiotique entre *Rhizobia* ; bactérie fixatrice d'azote atmosphérique, et les légumineuses représente l'un des modèles les plus importants d'interactions entre bactéries et plantes (Madigan et Martinko, 2007).

1.1.4. Importance de la fixation symbiotique d'azote

la fixation biologique de l'azote, dont la symbiose rhizobia- légumineuses est l'exemple type, est donc d'importance majeure pour la productivité agricole et pour le cycle biogéochimique de l'azote, nécessaire au maintien de la vie sur la terre (Perry *et al.*, 2004).

Ce phénomène est très important pour la production végétale car il permet de minimiser les dépenses, de réduire les apports d'engrais azotés et donc éviter les problèmes écologiques liés à l'usage de ces engrais (Jeder *et al.*, 1996).

Le système agronomique qui tend vers un système à faible utilisation d'intrants doit se baser impérativement sur le fonctionnement des symbioses qui apportent les éléments fertilisants indispensables. Il s'agit en particulier de la symbiose rhizobia-légumineuses qui assure une des fixations les plus efficaces de l'azote atmosphérique (jusqu'à 200-300 kg d'azote par hectare pour des légumineuses fourragères ou des plantes à graines comme le soja) (Adolphe *et al.*, 2017).

Grâce à cette association symbiotique, les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique (Giraud, 2007).

1.2. La macro symbionte : les légumineuses

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des ayant un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un

fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (ou *Fabacées*)

Les fabacées avec 10000 espèces représentent d'ailleurs les plus grands partis des légumineuses. Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines qui sont riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servent à l'alimentation du bétail (Chabbi, 2008).

1.2.1. Importance des légumineuses

L'un des grands avantages des légumineuses réside dans leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via l'interaction avec les bactéries de type *rhizobia*. Nous estimons que la fixation de l'azote, grâce à cette symbiose, est au moins équivalente à la production d'azote par l'industrie chimique (Gough, 2009).

Les légumineuses alimentaires occupent une partie très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que la phytotechnie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie, la physiologie, la nutrition et la sélection variétale. Elles constituent un apport important et peu coûteux en protéines (18 à 30 % de la graine sèche) (Baudoin, 2001). Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...) (Giraud, 2007). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des souches bactériennes du genre *Rhizobium*, elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures (Baudoin, 2001).

Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car elles sont riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés (concept de « plante hôte ») (Vincent, 2019).

1.2.2. Le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionoideae*. Ce genre comprend un grand nombre d'espèces, la plus connue parmi ces espèces est la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) qui constitue un aliment pour le bétail

(Prosperi *et al.*, 1995). Il est proche des genres *Melilotus* et *Trifolium* (Quèzel et Santa 1962; Prosperi *et al.*, 1995; Maureira-Butler *et al.*, 2008).

Le genre *Medicago* est composé de 83 espèces (Lesins et Lesins , 1979 ; Small et Jomphe, 1988). La phylogénie des espèces de *Medicago* (Béna *et al.*, 1998 ; Béna *et al.*, 2005) . La plus connue de ces espèces par le grand public est peut-être *Medicago sativa*, car elle est cultivée comme fourrage, sous le nom commun de luzerne (alfalfa en anglais), dans de nombreux pays dans le monde.

1.2.2.1 . L'espèce *Medicago sativa* L

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une des plantes fourragères les plus répandues sur tous les continents. Sa culture remonterait à plus de 9000 ans, dans les hauts plateaux du Caucase, L'Iran et Turquie d'où elle se serait répandue dans le monde entier (Mauriès, 2003; Bentvelsen, 1980 ; Soltner, 1999) signalent l'origine de *Medicago sativa* comme étant méditerranéenne.

Medicago sativa L est une plante vivace à systèmes racinaires vipotantes, les racines ont des nodosités, et les bactéries qu'elles contiennent (*Sinorhizobium meliloti*) fixent l'azote de l'atmosphère (Munro et Small, 1997). Le développement des tiges suit un ordre précis, on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaire. Les feuilles sont en général de types trifoliés. Les fleurs sont regroupées en inflorescences, la couleur des fleurs chez *Medicago sativa* est le mauve- violet (Mauriès, 2003).

1.2.2.2 . Intérêt

La *Medicago sativa* L est considérée dans tous les pays comme une plante fourragère de Première importance et dont la culture est la plus ancienne (La pevronie, 1982; Brumont, 2008).

L'intérêt de la *Medicago sativa* L réside également dans le rôle important qu'elle joue dans l'amélioration de la structure des sols liée à son important système racinaire et qui laisse aussi un tonnage important de matière organique humifiable (Adam, 1974; Pousset, 2002).

La composition chimique, la régularité du rendement font de la luzerne une espèce industrialisable (luzerne déshydratée et concentré protéique foliaire destinés à l'alimentation animale; protéine blanche Rubisco, bien- tôt utilisées par les industries pharmaceutique et (ou)

agro- alimentaires humaines; source envisageable de fibre cellulosiques) (Génier et *al.*, 1992). Et de nitrates

1.2.2.3 . Le genre *Melilotus*

Le *Melilotus* est un genre des légumineuses qui appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionoideae*; il inclut 25 espèces, caractérisées par des rendements importants en graines, une tolérance aux températures extrêmes et un taux de fixation d'azote supérieur aux autres légumineuses.

Le *Mélilot* jaune est une plante d'origine méditerranéenne, de la famille des Fabacées, annuelle rarement vivace, éphémère à feuilles trifoliolées dentées; foliole médiane pétiolée, les latérales su sessiles. Deux stipules adnées au pétiole. Les fleurs sont petites en grappes axillaires, les gousses sont généralement à une ou deux graines (Quèzel et Santa 1962 ; Arbeille et *al.*, 2000; Al Sherif 2009).

1.2.2.4 . L'espèce *Melilotus indicus*

Plante herbacée, annuelle, grêle de 10 à 40 cm de haut, à tiges dressées ou ascendantes, à nombreuses petites fleurs jaunes pâles de 2 à 3 mm de long disposées en grappes allongées, les feuilles ont trois folioles denticulées, les fruits sont des gousses sphériques de 1,5 à 3 mm, pendantes, nervurées vert noirâtres à maturité (Quèzel et Santa, 1962 ; Arbeille et *al.*, 2000).

Dans certains pays, les espèces de *Melilotus* poussent dans les régions à salinité modérée où les légumineuses fourragères traditionnelles ne peuvent pas être cultivées. *Melilotus indicus* est considérée comme une espèce avec une forte tolérance à la salinité, les températures extrêmes et la sécheresse, elle est caractérisée aussi par un taux de fixation d'azote plus important que les autres légumineuses (Rogers et *al.*, 2008 ; Al Sherif , 2009).

1.2.2.5 . Intérêt

Melilotus indicus est considérée comme une espèce avec une forte tolérance à la salinité, les températures extrêmes et la sécheresse, aussi par un taux de fixation d' azote supérieurs à ceux des autres légumineuses (Rogers et *al.*, 2008 ; Al Sherif, 2009).

Dans les oasis du Sahara septentrionale, *Melilotus indicus* fait partie des cultures fourragères, qu' elle n' est pas éliminée mais elle est fauchée et donnée avec les autres espèces au bétail (Chaabena et Abdelguerfi, 2007).

1.3. Le micro symbionte: les *rhizobia*

Les *rhizobiums* sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, gramme Négatives, aérobies et présent soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association Avec des légumineuses. Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la Grande classe des eubactéries (Chabbi ,2008).

Les bactéries genre *rhizobium*, bâtonnet, mobiles, Aérobie, chimioorganohétérotrophe, leur source de carbone incluent les sucres, se trouve dans le sol et le nodule des racines, %GC (59_ 64), espèce de type : *R. leguminosarum* (Murray, 2004).

1.3.1. Caractères généraux des *Rhizobia*

Plusieurs études ont été réalisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des *rhizobiums*. Ces études ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce (Cheriet ,2016).

1.3.1.1 . Caractères symbiotiques

Le principal caractère distinctif des *rhizobia* est l'infectivité ou la capacité d'établir une relation symbiotique avec une ou plusieurs espèces des plantes légumineuses et qui s'exprime par la formation des nodules (Prin *et al.*, 1993).

Le caractère d'effectivité ou d'efficience est défini par la capacité de ces rhizobia à réduire l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, à l'intérieur des nodules, qui se traduit par la couleur rouge ou rose de ces dernières (présence de l'enzyme de fixation d'azote) (Sadowsky *et al.*, 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Prin *et al.*,1993).

1.3.1.2 . Caractères cultureux

Deux groupes sont généralement assignés aux cultures des *rhizobia*: Le premier groupe comporte les *rhizobia* à croissance rapide, qui produisent une turbidité en bouillon et présentent une bonne croissance sur la surface des milieux solides dans 3 à 5 jours. Le deuxième groupe implique les *rhizobia* à croissance lente, qui exigent de 7 à 9 jours ou plus pour obtenir approximativement le même développement (Allen et Allen, 1950).

1.3.1.3 . Caractères biochimiques

Les *rhizobia* sont des bactéries aérobies avec un système respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons.

Les *rhizobia* produisent de grandes quantités d'éléments extracellulaires (EPS) et également les lipopolysaccharides constitutives de la membrane externe et qui interviennent aussi aux différentes étapes de l'infection (Baba Arbi, 2016).

Généralement, les cellules des *rhizobia* contiennent des granules de poly-hydroxybutyrate (PHB) non colorés.

1.3.2. Taxonomie des *Rhizobia*

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « *rhizobium* » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIX^{ème} siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Frank, 1989). Les *rhizobia* étaient initialement caractérisés par leur vitesse de croissance: on distinguait ainsi le genre *Rhizobium* contenant des souches à croissance rapide, et qui devait plus tard se subdiviser en plusieurs genres (*Rhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*), et le genre *Bradyrhizobium* contenant des souches à croissance lente (Jordan, 1984). Actuellement, le groupe fonctionnel des *rhizobiums* comprend plus de 100 espèces réparties au sein de 9 familles et 15 genres d'alpha (ou α -) protéobactéries et betaprotéobactéries. Ce nombre augmente régulièrement depuis une quinzaine d'années, notamment grâce à l'apparition de nouveaux outils de taxonomie moléculaire et une exploration plus large de la diversité dans des zones à forte biodiversité.

Une plus grande diversité a été découverte parmi les *rhizobia* et leurs relations avec d'autres groupes de bactéries avec l'introduction de plus de caractéristiques génétiques (hybridation ADN-ADN et ADN-ARN r 16S, catalogues d'ARN r, analyse des protéines, séquençage de l'ADN r) (Willems, 2006 ; de Lajudie et *al.*, 2017).

La plupart des bactéries nodulant les légumineuses appartiennent à la classe des α -protéobactéries et se répartissent au sein de 12 genres bactériens. Les β -protéobactéries, contiennent 2 genres bactériens qui nodulent les légumineuses. Il s'agit des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus*. (Graneshwar et *al.*, 2011).

1.3.3. Classification des *rhizobia*

Actuellement, les *rhizobia* comportent 13 genres et 117 espèces (Weir, 2016). Elles appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries dans les genres de: *Rhizobium*,

Mesorhizobium et *Bradyrhizobium* (Zakhia et al., 2004). Au cours des dernières années des rhizobia ont été aussi découverts dans les bêta protéobactéries dans les genres *Shinella*, *Cupriavidu*, *Herbaspirillum*. Les différentes espèces reconnues des rhizobia sont fondues dans les genres décrits ci- dessous: *Rhizobium* (Frank, 1889), qui contient 49 espèces. – *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), qui contient 21 espèces. - *Ensifer* autrefois *Sinorhizobium* (Young, 2003), contient 17 espèces. – *Bradyrhizobium* (Jordan et al., 1984), qui contient 9 espèces. - *Burkholderia*, (Chen et al., 2013) contient 7 espèces. – *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), qui contient 2 espèces. - *Microvirga*, (Arley et al., 2011), qui contient 3 espèces. - *Phyllobacterium*, (valverd et al., 2005), qui contient 3 espèces. - *Ochrobactrum*, (Zurdo-Piñeiro et al., 2007), qui contient 2 espèces. - *Methylobactérieum* qui contient 1 espèce. - *Cupriavidus* qui contient 1 espèce. - *Devosia* qui contient 1 espèce. – *Shinella* (Lin et al., 2008), qui contient 1 espèce

1.4. Etablissement de la symbiose Rhizobium-légumineuse

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

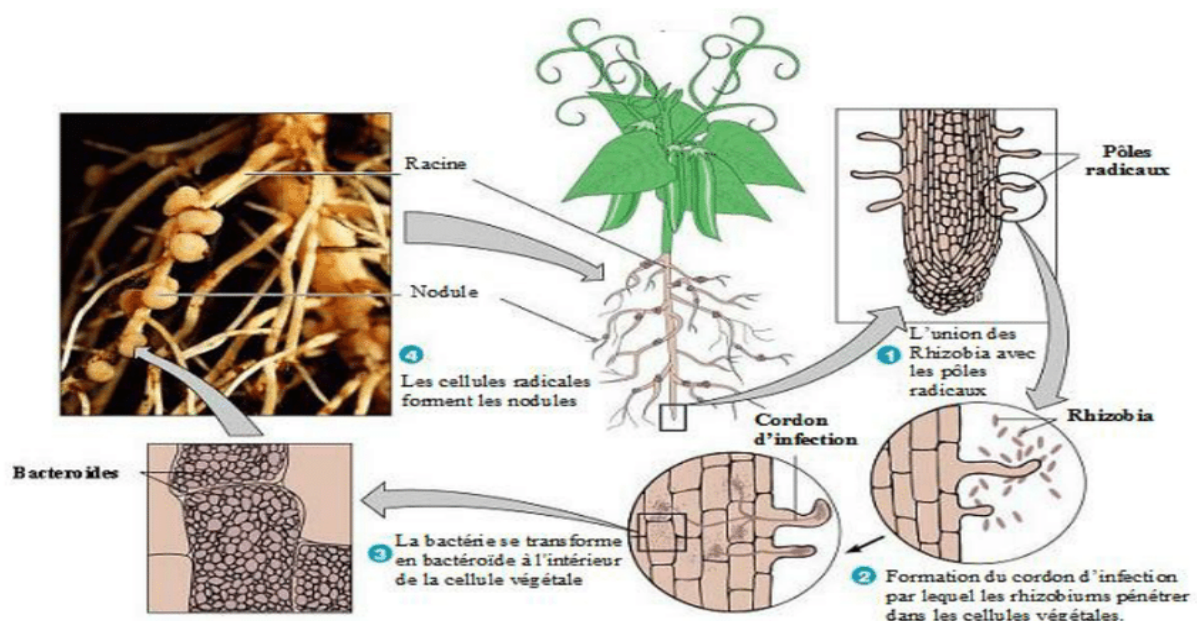


Figure 1: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse

(Faghir,2012)

Deuxième partie
PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1. Collecte d'échantillons

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, ou la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de mars et avril quand la terre est sèche

A cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la légghémoglobine et la fixation active de l'azote (Rejili, 2007)

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck *et al.* (1993). Une creusée d'environ 15cm au tour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains, les nodules sont ensuite placés dans des sacs plastique et les transporter immédiatement au laboratoire. Au, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés à 2mm du site d'attache, et séchés avec du papier filtre avant leur conservation (Benselama, 2015).

2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Somasegaran et Hoben, (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau distillée stérile pendant 24 heures dans le réfrigérateur à 4°C, puis sont utilisés directement après une heure à température ambiante.

2.2.1. Stérilisation de la surface des nodules

Les nodules sont immergés dans une solution d'hypochlorite à 2 % pendant 4 min, ensuite, ils sont rincés abondamment (5 fois) avec de l'eau distillée stérile (V). (El Idrissi *et al.*, 2020).

2.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boîtes

- Les nodules stérilisés sont mis dans des tubes stériles (à hémolyse ou à essai), avec un volume de 0.5 ml d'eau distillée stérile (1 nodule par tube). (Loubna *et al.*, 2017 ; Ouslim *et al.*, 2019).

- A l'aide d'une barre en verre stérilisée, on écrase les nodules pour obtenir une suspension de bactéroïdes (Somasegaran et Hoben, 1994).

- A l'aide d'une anse de platine, on prend une goutte de la suspension, et on l'étale sur une boîte de Pétri contenant le milieu YEMA au rouge Congo (Annexe2) dont la composition est celle donnée par (Somasegaran et Hoben ,1994).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des cadrans pour avoir des colonies bien isolées.

2.3. Examen microscopique des isolats

2.3.1. Coloration de Gram

Pour différencier les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif et de déterminer la forme des cellules bactériennes, un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (*les rhizobia*) et les autres bactéries à Gram positif (Ouslim ,2015)

2.3.2. Purification des isolats

Après l'isolement à partir des nodules, différents aspects de colonies peuvent être rencontrés sur les boîtes, ainsi différentes formes microscopiques peuvent être détectées, dans ce cas, une série de repiquage sur le même milieu (YEMA +0,0025% RC) est nécessaire pour avoir des souches pures (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les isolats sont ensuite conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3g/l) en tube incliné sous forme de stries. Après incubation à 28°C pendant 48 h, les souches sont stockées à 4°C à une utilisation ultérieure (Kanouni, 2019).

2.4. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des rhizobia

2.4.1. Caractérisation phénotypique

2.4.1.1. Tolérance aux différentes concentrations de NaCl

L'objectif de ce test est d'étudier la capacité des bactéries à résister aux conditions de salinité et des températures élevées et déterminer les valeurs inhibitrices. Ce test permet aussi d'évaluer les effets de la combinaison des deux stress sur ces bactéries.

- La tolérance des souches à la salinité est évaluée par détermination de la croissance sur milieu YEMA additionné de NaCl à des concentrations : (W/V) 2.5, 3.5, 4.5, et 6.0 % .Les plaques ont été incubées pendant 7 jours (Maâtallah et *al.*, 2002; Djedidi et *al.*, 2011).

La tolérance des bactéries a été évaluée selon la densité de la croissance (forte croissance : forte tolérance ; faible croissance : tolérance faible ; pas de croissance : intolérance).

2.4.1.2. Tolérance à la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YEMA à différentes températures : 28 ; 37 ; 40 ; 42 et 45°C (Ballard et *al.*, 2003 ; Baba Arbi et *al.*, 2015; Cheriet et *al.*, 2015)

Les plaques ont été incubées pendant 7 jours.

Les lectures sont effectuées après 24, 48 à 72 h d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

2.4.1.3. Test de tolérance aux différents pH

* Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des isolats à tolérer des pH extrêmes.

- Le test a été réalisé selon la même procédure des tests précédents, sur YEMA ajusté avec les solutions de NaOH et HCl aux valeurs de pH suivantes : 4.5, 5.5, 6.8 (contrôle), 8 e 9.

- Les boîtes ont été incubées pendant trois jours à 28°C (Thami-Alami et *al.*, 2010 ; Ballard et *al.*, 2003).

Les résultats de ce test ont été évalués de la même façon que le test précédent.

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des isolats à tolérer des pH extrêmes.

2.4.1.4. Test de tolérance au stress hydrique

Ce test consiste à étudier la croissance des isolats sous conditions de déficit hydrique, ce dernier a été créé en utilisant le polyéthylène glycol PEG4000 à différentes concentrations.

- Des solutions de polyéthylène glycol PEG4000 ont été préparées à différentes concentrations finales (p/v): 10 %, 15 %, 20 % et 25 %.

- Un ml de chaque concentration a étéensemencé par une masse cellulaire de l'un des isolats testés.

- Dix µl de chaque suspension bactérienne ont été inoculé par la technique des spots sur une boîte de milieu YEMA divisée en 4 secteurs et incubé à 28°C pendant trois jours. (Baba arbi et *al.*, 2015; Cheriet et *al.*, 2015).

2.4.1.5. Test du 3-Cétolactose

La détermination de l'activité de l'enzyme 3-cétolactase permet la distinction entre *Agrobacterium* et les autres *rhizobiens* (Murugesan et *al.*., 2010 ; Cheriet et *al.*., 2015).

-Les isolats ont été cultivés sur milieu nutritif au glucose (NGA) (Annexe1) pendant 48 à 72 h (Bouzar et *al.*, 1995).

-puis des suspensions ont été préparées avec des colonies cultivées sur NGA. Des gouttes de 10 µl ont été placées sur de l'agar au lactose milieu (LAM) avec lactose (1 %), extrait de levure (0,1 %), et agar (2 %). Trois isolats par plaque ont été testés.

- Après incubation à 28 °C pendant 48 à 72 h, les plaques ont été inondées d'une fine couche de réactif de Benedict (Annexe1) (; Baba Arbi et *al.*, 2015; Cheriet et *al.*, 2015).

La présence de l'enzyme 3-cétolactose dans le milieu (résultat positif) est indiquée par l'apparition d'un halo jaune autour de la croissance bactérienne après 15 à 20 minutes.

L'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif.

2.4.2. Caractérisation phylogénétique

2.4.2.1. Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARN r 16S

Le séquençage de l'ADN r 16S est devenu le critère le plus précieux dans la classification bactérienne. Les séquences codant pour l'ARNr16S sont constituées de zones très conservé est departies des équences très variables (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994).

L'analyse de l'ADN r 16S est reconnue comme la méthode la plus puissante et la plus rapide pour déterminer les relations et la position phylogénétique des bactéries symbiotiques des légumineuses.

2.4.2.2. Extraction de l'ADN bactérien

- L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant le mini kit QIAAmp (QIAGEN, Düsseldorf, Germany) selon le protocole développé par le constructeur. (Amrani et *al.*, 2010 ; Baba Arbi et *al.*, 2015).

2.4.2.3. Amplification du gène codant pour l'ARN r 16S

- Les fragments des gènes de l'ARN r 16S des isolats ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques pour *rhizobia* (tableau 1) (Gnat et *al.*, 2014 ; Shamseldin et *al.*, 2014 ; Baba Arbi et *al.*, 2015).

Tableau 1: Les promoteurs d'amplification et de séquençage.

Amorces	Séquences 5' → 3'	Référence
fD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Weisburg et <i>al.</i> , 1991
rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	Weisburg et <i>al.</i> , 1991

La PCR du gène de l'ARN 16S (ADNr 16S) a été réalisée selon le même protocole que celui utilisé par Romdhane et *al.* (2006) ; Baba Arbi et *al.* (2015).

- Le programme de PCR consiste à une étape initiale d'activation d'enzyme à 95°C pendant 15 min, suivi par une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes ; 30 cycles de dénaturation pendant une minute à 95°C, une étape de fixation d'une minute à 55°C et élongation de 1.5 minute à 72°C, suivi d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 minutes.

- les amplifiants ont été purifiés sur gel en utilisant le kit de gel d'extraction QIAquick (Qiagen, Hilden, Germany) selon les instructions du fabricant puis séquencés en bidirection en utilisant les amorces rD1 et fD1. Pour la souche ML08 la séquence d'un simple brin est obtenue (Rejii et *al.*, 2014; Baba Arbi et *al.*, 2015)

- Les séquences obtenues ont été soumis à la base de NCBI et une recherche de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) est réalisée pour identifier les séquences de plus forte similarité (Rome et *al.*, 1996; Baba Arbi et *al.*, 2015)

Chapitre 3

Résultats et discussion

L'objectif de ce travail est l'étude la diversité des rhizobia présents dans les nodules racinaires des légumineuses, spontanées et/ou cultivées des régions arides

Les rhizobia sont isolés, purifiés et une sélection des souches a fait l'objet de caractérisations phénotypiques et génotypiques approfondies.

Les espèces de légumineuses spontanées étudiées sont *Melilotus*. Pour les espèces cultivées, nous avons étudiées *Medicago* (luzerne) et les espèces spontanées étudiées *Melilotus*.

3.1. Isolement des bactéries à partir des nodules

Tableau 2: Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses dans région déférant.

L'auteur	Région d'étude	Nombre d'isolat
Baba arbi et al. (2015)	Algérie Touggourt	40
Thami-Alami et al. (2010)	sud du Maroc	157
Cheriet et al. (2015)	Zerizer Wilaya d'El Tarf Algérie	37
Hatimi et al. (2001)	Maroc (la région de Souss-Massa) (deux site)	6
Ballard et al. (2003)	Sud-est de l'Australie-Méridionale	4
Zribi et al. (2014)	Tunisie5 (4 site)	111
El Hilali et al. (2016)	Maroc (22 site)	6

A travers les articles que nous avons étudiés :

Trois cent soixante et un(361) isolats ont été étudiés et obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses d'un quatre Région déférant.

Le travaille de Baba arbi et al. (2015), Sur 40 souches de rhizobium ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Medicago littoralis Rhode* et *Melilotus indicus* (L.) récolté sur les sols sableux des oasis de Touggourt dans le Vallée de l'Oued Righ, Sahara algérien. Et Le

travaille de cheriet et *al.* (2015), isolés de 37 souches à partir des *Medicago ciliaris* L récolté du site d'échantillonnage (Zerizer Wilaya d'El Tarf).

Thami-Alami et *al.* (2010), El Hilali et *al.* (2016), Hatimi et *al.* (2001), cent soixante-neuf souches rhizobiennes de *sinorhizobium*, *meliloti*, et des souches ont été isolées à partir de nodules racinaires récoltés sur six Espèces *Lupinus*, Echantillonnés dans des sols marginaux arides et semi-arides dans plus de vingt-quatre sites de différentes zones géographiques régions de Maroc.

Zribi et *al.* (2014), ont été isolées 111 souches de *Sinorhizobium meliloti* nodulant à partir de *Medicago truncatula* cultivés sur des sols de 4 sites dans les sols arides tunisiens. Et aussi Ballard et *al.* (2003), ont été isolées 4 souche de *sinorhizobium*, *meliloti*, naturalisées dans 50 sols, a été évaluée .des espèces du sol ont été collectées dans 42 parcours de luzerne des régions aride et 8 plantes de luzerne (*Medicago sativa* L) irriguées à usage multiples dans le sud-est de Australie-Méridionale.

Toutes les souches rhizobia les isolés ont été identifiées sur la base de caractéristiques phénotypiques suivantes :

3.2. Caractères morphologiques et cultureux des isolats de *rhizobia*

La caractérisation a été réalisée en déterminant la morphologie des colonies, la morphologie cellulaire (au microscope optique), le taux de croissance dans les milieux de croissance, et la réaction de coloration de Gram. Les isolats avaient des caractéristiques morphologiques et culturelles typiques du genre *Rhizobium* à croissance rapide. (El Hilali et *al.*, 2016).

L'isolement des bactéries, symbiotes ou endophytes, présentes dans les nodules racinaires de *Medicago sativa* L et *Melilotus indicus* de la région arides est réalisé sur le milieu de culture sélectif YEMA (Somasegaran et Hoben 1985) additionné du colorant rouge Congo (RC) (Annexe 1).

3.2.1. Caractères cultureux des isolats de *rhizobia*

Les *rhizobia*, présente deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...). (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les travaux de Thami-Alami et *al.* (2010) et Baba arbi et *al.* (2015) ; Cheriet et *al.* (2015); El Hilali et *al.* (2016) présentent en général une croissance rapide, en obtenue au bout de 48 - 72h, Les isolats avaient des caractéristiques morphologiques et culturelles typiques du genre *Rhizobium* à croissance rapide décrits par (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.2.2. Caractéristique morphologique

3.2.2.1. Caractéristique macroscopiques

Le résultat de Baba arbi et *al.* (2015), présentant les caractéristiques morphologiques des *rhizobia*. Elles forment sur milieu YMA gélose des colonies une surface lisse, semi-translucide colonies circulaires et produit une quantité abondante de polysaccharide. Le diamètre des colonies variait entre 3 et 4 mm après 3 jours d'incubation. Les colonies de deux isolats de *M. indicus* étaient jaunes, lisses avec 1 à 2 mm de diamètre après 3 jours d'incubation et n'a pas produit polysaccharide.

Aussi Le résultat de Cheriet et *al.* (2015), montre que La majorité des souches purifiées présentaient une couleur blanchâtre, transparente, légèrement rose, un aspect muqueux. Ont rapporté que des colonies blanches et crémeuses également prédominé 1 à 3 mm de diamètre. Les colonies isolées avaient un contour régulier, et étaient plus au moins bombées.

Ansai Le résultat d'El Hilali et *al.* (2016), montre que Isolats formés colonies visibles circulaires, gommeuses et translucides ou crémeuses de 1 à 3 mm de diamètre dans les 2 à 3 jours d'incubation sur gélose YEM à 28°C.

La croissance sur YMA+RC montre que les souches présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo. Certaines souches absorbent peu le rouge Congo, mais la plupart des souches de *rhizobia* n'ont pas la capacité d'absorber le colorant. Cependant, il existe des exceptions à ce comportement généralisé.

Quatre-vingt-dix-sept des isolats n'ont absorbé le colorant rouge Congo. (Baba arbi et *al.*, 2015)

La croissance des isolats sur le milieu YMA+RC est considéré parmi les principaux critères phénotypiques dans la caractérisation des *rhizobia* (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Ausmees et *al.*, 1999 ; Torche et *al.*, 2010).

3.2.2.2. Caractéristique microscopique

L'aspect microscopique pour vérifier la pureté et le type de Gram des cultures bactériennes. La technique de coloration de Gram révèle des coccobacilles Gram négatif. Il est connu que les rhizobia sont des bactéries à Gram négatif (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Hameed et *al.*, 2004).

3.3. Caractérisation phénotypique

3.3.1. Les tests physiologiques

3.3.1.1. Tolérance aux différentes concentrations de NaCl

Ce test est réalisé pour différencier les isolats selon la tolérance aux concentrations de NaCl (0, 0.01, 2.5, 3.5, 4.5 et 6 % de NaCl).

Selon Graham et Parker (1994) ; Ballard et *al.* (2003) ; Thami-Alami et *al.* (2010) ; Baba Arbi et *al.* (2015); Cheriet et *al.* (2015) les rhizobia à croissance rapide possèdent la capacité de tolérer des concentrations en NaCl qui dépassent les 2%.

Le niveau de la tolérance à la salinité dépend du milieu écologique des souches (Hatimi et *al.*, 2001).

Pour les tests de salinité, les résultats de Thami-Alami et *al.* (2010) ont montré que les rhizobia à croissance rapide ; sont plus tolérantes à la salinité que celles à croissance lente, indiquant que les rhizobiums nodulants de la luzerne sont plus tolérants que les autres espèces de rhizobiums

3.3.1.2. La tolérance à la température

La température optimale de croissance de la plus part des rhizobia est comprise entre 28 et 31° C et de nombreuses rhizobia sont incapables de croître à 38° C (Somasegaran et Hoben, 1994).

Selon Thami-Alami et *al.* (2010) ; Baba Arbi et *al.* (2015); Cheriet et *al.* (2015), les souches de rhizobia sont bien développées à 40 et 44° C respectivement.

Les résultats de Baba Arbi et *al.* (2015), ont montré que 98 % des isolats sont capables de se développer à une température de 45°C, ces souches sont isolées de plantes autochtones d'une région aride avec une moyenne des températures maximales de 45°C.

Aussi les résultats de Thami-Alami et al. (2010) ont montré que 87,26 % des isolats se sont bien développés à une température de 36 °C, Cependant, 57,96 % des isolats se sont développés à 40°C et ces isolats hautement tolérants ont été échantillonnés à partir de régions aride du sud marocain.

Comme toutes les bactéries du sol les rhizobia sont des organismes qui peuvent être inhibés par l'élévation ou la diminution de la température d'incubation (Jordan, 1984). Robert, (1976) a estimé que les rhizobia à croissance lente étaient beaucoup plus tolérants aux températures élevées que les rhizobia à croissance rapide.

Une adaptation à des températures élevées des souches de rhizobia pourrait être observée et serait liée au climat d'origine (étage bioclimatique d'origine) (Thami-Alami et al., 2010).

Les souches qui résistent à températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räsänen, 2002).

3.3.1.3. Test de tolérance aux différents pH

En ce qui concerne la tolérance à l'acidité et à l'alcalinité, les isolats de *Melilotus indicus* et *Medicago sativa* L ne montrent pas un comportement particulier. Comme pour les autres rhizobia leur croissance est fortement inhibée en milieu acide (pH 5) et dans une moindre mesure en milieu alcalin (pH 9) (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Ballard et al., 2003 ; Baba Arbi et al., 2015)

Les résultats de Thami-Alami et al. (2010) de l'effet du pH révèlent la croissance des souches de *Medicago sativa* L à des valeurs comprises entre pH 9 et pH 9.5 avec un optimum de croissance entre pH 3.5, elle confirme que les rhizobiums de la luzerne sont sensibles aux acides.

Selon Somasegaran et Hoben (1994), la croissance optimale de rhizobia est entre le pH 6 et 7.

Baba Arbi et al., (2015) rapportent que les rhizobia isolées à partir des légumineuses *Melilotus indicus* peuvent tolérer des pH allant de 4.5 jusqu' à 9.

Aussi les résultats d'El Hilali et *al.* (2016) montrent que les rhizobia à croissance rapide, et des réponses variables sous conditions acides. 80% de la tolérance a été obtenu à pH 4,0.

34 % des isolats pourraient même pousser à pH 3,0 sont capable de croître à un pH 4.

Les souches à croissance rapide tolèrent mieux l'acidité (Hatimi et *al.*, 2001).

3.3.1.4. Test 3-cétolactose

L'activité enzymatique du 3-cétolactose distingue les espèces d'*Agrobacterium* des autres souches rhizobiennes. *Agrobacterium* est commun dans le sol et dans les plantes de rhizosphère, mais elle a été décrite à l'intérieur des nodules racinaire. L'*Agrobacterium* produit un anneau jaune de précipité de CuO₂ autour des colonies de la bactérie lorsque les plaques sont inondées de Benedict réactif (Cheriet et *al.*, 2015).

La 3-cétolactose hydrolase est une enzyme produite par les souches d'*Agrobacterium* (biovar 1) durant leur croissance sur le lactose (Janssens et *al.*, 1983). La recherche de cette enzyme est un test spécifique pour la distinction entre les *Agrobacterium* et les autres rhizobia. Ce test est utile pour une présélection des souches d'*Agrobacterium* (Murugesan et *al.*, 2010).

L'activité enzymatique 3-cétolactose distingue les espèces d'*Agrobacterium* et autres souches rhizobiennes., Solen Baba Arbi et *al.*(2015) et Cheriet et *al.*(2015) les isolats étudiés de *Melilotus* et *Medicago* ne produisent pas le 3-cétoglucosidase montrant ainsi un résultat négatif avec le test du 3-cétolactose et confirme ainsi que ces souches n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*.

3.3.1.5. La tolérance au stress hydrique

Les résultats de Baba Arbi et *al.* (2015) et Cheriet et *al.* (2015), la tolérance au stress hydrique ou osmotolérance est estimée pour des isolats de *Melilotus* et *Medicago* sur milieu YEMA additionné de polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) à différentes concentrations.

En effet, il a été rapporté que les souches de *Rhizobium leguminosarum* (nodulant *Melilotus* et *Medicago*) varient dans leurs résistances au stress. Cette fluctuation est un avantage pour une souche pour survivre dans un environnement pédologique extrême. De plus, les souches tolérantes dans différents sols stressés peuvent améliorer la production et l'adaptation des légumineuses cultivées dans différentes zones.

3.4. Caractérisation phylogénétique des isolats : Séquençage et analyse phylogénétique du gène de l'ARN r 16S

L'analyse des séquences d'ADN r 16S est largement utilisée pour définir la position taxonomique et retracer l'histoire évolutive de bactéries nodulaires (Shamseldin et *al.*, 2013; Gnat et *al.*, 2014).

Dans le but de déterminer la position taxonomique des isolats symbiotes de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* par rapport aux autres rhizobia, les gènes de l'ARN ribosomal 16S (environ 1400 pb de taille) ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques fD1 et rD1, et les amplicons obtenus sont séquencés.

La recherche par le BLAST est une méthode utilisée en bio-informatique, elle permet de réaliser une comparaison entre les séquences des nucléotides des gènes de l'ARN r 16S.

Ce programme utilisé par baba arbi et *al.* (2015) permet de retrouver rapidement dans les bases de données (NCBI), les séquences ayant des similitudes avec les séquences de votre souche.

La recherche préliminaire BLAST en utilisant la base de NCBI a montré une grande similarité entre les gènes d'ARN r 16S de vos souches et ceux des souches d'*Ensifer meliloti* avec 99 % d'identité (tableau 2). (Baba arbi et *al.*, 2015) .

Tableau 3: Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARN r 16S des six isolats (Baba arbi et al ., 2015).

Souches	BLAST (dans n.r. data base)	Identité (%)	Codes d'accès (Genbank)	BLAST (dans 16SrRNA database)	Identité (%)	Codes d'accès (Genbank)
ML08	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2	<i>Ensifer meliloti</i> 1021	99	NR_074279.1
ML17	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
ML22	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
MD05	<i>Ensifer</i> sp. XJ22DR2	99	AB773226.1			
MD09	<i>Ensifer meliloti</i> W44	99	JF730142.1			
MD12	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			

Les résultats du tableau 2 indiquent que les quatre souches (ML08, ML17, ML22 et MD12) sont identiques à 99 % à la souche *Ensifer* sp. LILMH41 (Mnasri *et al.*, 2007). Il est à noter que cette dernière a été isolée des nodules de *Phaseolus vulgaris* cultivées dans les oasis de Rjim Maatoug en Tunisie.

D'après l'analyse phylogénétique des séquences de l'ADN ribosomal 16S, remarquer que les souches isolé a partir de *Medicago littoralis Rhode* et *Melilotus indicus* (L.) sont classées près des souches d'*Ensifer* isolées à partir des régions arides (Baba arbi *et al.*, 2015) , *Ensifer numidicus* ORS 1407 et *Ensifer garamanticus* ORS 1400 ont été isolées du sol des régions arides du sud tunisien (Zakhia *et al.*, 2004 ; Merabet *et al.*, 2010).

Selon Merabet *et al.* (2010), les espèces voisines d'*Ensifer numidicus* sont *Ensifer medicae* et *Ensifer meliloti*. Ils rapportent que l'*Ensifer numidicus* se distingue d'*Ensifer medicae* par l'aptitude d'assimilation de différents substrats carbonés dont cette dernière utilise seulement 13 substrats, alors que Rome *et al.*, (1996) a rapporté qu'*Ensifer medicae* assimile 25 substrats sur 49.

Selon Rome *et al.* (1996); Yan *et al.* (2000); Zahran (2001); Zribi *et al.* (2014); Badri *et al.* (2007) ; Thami-Alami *et al.* (2010) ; Rejii *et al.* (2014) Il semble que la majorité des légumineuses sauvages sont nodulées par des souches appartenant à *Ensifer* et *Rhizobium*. Les

légumineuses sauvages en particulier *Medicago* et *Melilotus*, montrent une grande variation de nodulation et de capacité de fixation l'azote par rapport à l'emplacement (Zahran 2001)

Cette étude fournit la base pour de nouvelles recherches sur la phylogénie de souches rhizobiennes nodulant des légumineuses sauvages dans les régions aride de l'Algérie et nous suggérons que ces souches pourraient être utilisées comme inoculants pour améliorer la croissance des plantes et la fixation de l'azote dans terres arides. Ces souches peuvent représenter de nouvelles génoespèces qui ont besoin d'une caractérisation plus poussée pour évaluer leur statut taxonomique. (Baba arbi et *al.*, 2015).

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayées d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de l'espèce *Melilotus indicus* et *Medicago sativa* (L) les caractérisées selon les critères morphologiques (aspect des colonies, absorption de rouge Congo, aspect des cellules bactériens sous le microscope...). Ainsi la réalisation d'analyse des séquences de l'ADN ribosomal 16S qui est une technique largement utilisée pour définir la position taxonomique et tracer l'historique de l'évolution des rhizobia

Cette recherche a permis la caractérisation phénotypique et phylogénétique des différents isolats de *Melilotus* et *Medicago* en différents région.

Nous sommes procédés à un isolement et une caractérisation des souches prévenant des nodules de *Medicago* et *Melilotus* . Selon les techniques usuelles propres aux rhizobia décrites par Vincent., (1970); Somasegaran et Hoben., (1994).

L'aspect morphologique des isolats sur le milieu de culture YMA montre qu'ils ont une croissance rapide avec un aspect visqueux, la croissance sur YMA+ rouge Congo montre que les isolats présentent une différence dans l'absorption du rouge Congo.

L'examen microscopique des cellules bactériennes des isolats donne des bactéries de forme cocobacille Gram négatif.

Certains isolats étaient tolérants à l'acidité, l'alcalinité, la salinité et les températures extrêmes. Plusieurs travaux ont montré l'importance d'étudier la capacité des isolats à tolérer aux contraintes environnementales.

Dans notre étude, vu que les souches ont été isolées à partir de deux espèces de légumineuses différentes (*Melilotus indicus* et *Medicago sativa* L), nous pouvons conclure que les rhizobia à croissance rapide "*Ensifer*" sont présentes dans les sols oasiens de la région aride et leurs caractères présentés sont d'une grande importance pratique pour la production des inoculum.

Enfin, comme perspective de notre recherche, il serait souhaitable :

Etudier les caractères symbiotiques des souches.

La précision de la position taxonomique des symbiotes par le séquençage complet du gène de l'ARN r 16S des bactéries isolées à partir de *Medicago* et *Melilotus*

Références Bibliographiques

Références Bibliographies

Abdel-Ghafar A S. (1989). Aspect of Microbial Activities and Dinitrogen Fixation in Egyptian Desert Soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation* , 3 (2), 281-294.

Abdelguerfi, A., & Abdelguerfi-Laouar, M. (2004). Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral: Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Cahiers Options Méditerranéennes* , 62, 29-41.

Adem, L. (1974). *Etude du comportement de Medicago annuelles (écotypes locaux et populations étrangères) dans les régions de Sétif-Médéa-Tiaret et Alger* (Doctoral dissertation, Thèse Ing., INA Alger).

Adolphe A., Saïd B.-M. L., Gustave D., de Recherche M., Aliou S., & Fatiou T. 2017. Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole, 76.

Al Sherif, E. A., Zahran, H. H., & Atteya, A. M. (2004). Nitrogen fixation and chemical composition of wild annula legumes at Beni-Seuf governorate, Egypt. *Egyptian Journal of Biology* , 6.

Al Sherif, E. A. (2009). *Melilotus indicus* (L.) All., a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as a forage crop in salt-affected soils. *Flora-morphology, distribution, functional ecology of plants*, 204(10), 737-746.

Allen O. N., Allen E.K. (1950). Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia.

Amrani, S., Noureddine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., & Vargas, C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and applied microbiology* , 33 (1), 44-51.

Arley, R. C. (2011). Mercado de datos: conceptos y metodologías de desarrollo. *Tecnología en marcha* , 24 (3), 55-66.

Ausmees N., Jonsson H., Höglund S., Ljunggren H., & Lindberg M. (1999). Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* , 145 (5), 1253-1262.

Baba Arbi S. (2016). *Étude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées Medicago littoralis Rhode et Melilotus indicus (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla).* université badji mokhtar –Annaba.

BabaArbi S, Chekireb D, QuatriniP,Catania V, Cheriet D, Ouarts A. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis Rhode* and growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis* (66), 75–87.

Badri, Y., Zribi, K., Badri, M., Huguet, T., Van Berkum, P., & Aouani, M. E. (2007). Comparison of rhizobia that nodulate *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* present in a single Tunisian arid soil. *Canadian journal of microbiology* , 53 (2), 277-283.

Ballard, R. A., Shepherd, B. R., Charman, N. (2003). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 3. Lucerne (*Medicago sativa* L.). *ustralian Journal of Experimental Agriculture* , 43 (2), 135-140.

Baudoin, J. P. (2001). Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *BASE*.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. (1993). Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. *ICARDA, Syria* .

Bena, G., Jubier, M. F., Olivieri, I., & Lejeune, B. (1998). Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal of Molecular Evolution*, 46(3), 299-306

Bena, G., Lyet, A., Huguet, T., & Olivieri, I. (2005). *Medicago–Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6), 1547-1558.

Bentvelsen C.L.M. (1980). Réponse des rendements à l'eau. Eds. Food & Agriculture Org. 235.

Benselama, K., El Meiche, N., Bedia, E. A. A., & Tounsi, A. (2015). Buckling analysis in hybrid cross-ply composite laminates on elastic foundation using the two variable refined plate theory. *Structural engineering and mechanics: An international journal*, 55(1), 47-64.

- Brumont F., 2008.** Prés et pâturages en Europe occidentale. Ed. Presses. Univ. Du Mirail. 292.
- Bogusz D, F. C. (1985).** La Fixation Biologique de L'azote. L'Orstom et Les Recherches Fondamentales Microbiologie. *Dakar L'OSTRON*, N°23059 .
- Bouzar, H., Jones, J. B., & Bishop, A. L. (1995).** Simple cultural tests for identification of *Agrobacterium* biovars. In *Agrobacterium protocols* (pp. 9-13). Springer, Totowa, NJ.
- Chaabena A, Abdelguerfi A. (2007).** Aperçu sur les cultures fourragères au Sahara septentrional est. *Annales de la Faculté des Sciences et des Sciences de l'Ingénieur* ,1(2), 18.
- Chabbi R. (2008).** *Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystème de l'est algérien. Biotechnologie végétale.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie.
- Chen W, Sun L, Lu J, Bi L, Wang E, Wei G. (2013).** Diverse nodule bacteria were associated with *Astragalus* species in arid region of northwestern China. *J Basic Microbiol* , 55, 121–128.
- Cheriet D. (2016).** *Étude des bactéries symbiotiques de la luzerne (Medicago ciliaris L.) fixatrices d'azote.* Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat, microbiologie appliquée ,université badji mokhtar –Annaba.
- Cheriet D., Ouarts A., Chekireb D., Baba Arbi S. (2015).** Phenotypic and symbiotic characterisation of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. from Algeria. *Biology and Environment : Proceedings of the Royal Irish Academy* , 115 (1), 29-43.
- DE LAJUDIE, P. H. I. L. I. P. P. E., Willems, A., Pot, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., ... & Gillis, M. (1994).** Polyphasic Taxonomy of *Rhizobia*: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 44 (4), 715-733.
- de Lajudie, P. M., & Young, J. P. W. (2017).** International committee on systematics of prokaryotes subcommittee for the taxonomy of rhizobium and agrobacterium minutes of the meeting, budapest, 25 august 2016. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(7), 2485-2494.

- Djedidi S, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N, Chandra-Prasad-Risal C, Abdelly C. (2011).** Stress Tolerance and Symbiotic and Phylogenic Features of Root Nodule Bacteria Associated with Medicago Species in Different Bioclimatic Regions of Tunisia. *Microbes and environments* , 26 (1), 36–45.
- Djouadi S. (2018).** Prévalence de la symbiose des rhizobia associés aux légumineuses d'Algérie. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur en sciences biologiques, écobiologie et amélioration végétale, université de la science et de la technologie Houari Boumediène. P 18.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988).** Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 38 (1), 89-98.
- El Hilali I., El Jamali J., Alami I. T., & Maltouf A. F. (2016).** Characterisation and Biodiversity of a Fast-Growing Rhizobacterial Population Nodulating Lupine in Morocco. *International Journal of New Technology and Research* , 2 (12), 27-37.
- El Idrissi, M. M., Lamin, H., Bouhnik, O., Lamrabet, M., Alami, S., Jabrone, Y., ... & Abdelmoumen, H. (2020).** Characterization of Pisum sativum and Vicia faba microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar viciae in Rhizobium acidisoli. *Systematic and Applied Microbiology* , 43 (3), 126084.
- Fitouri Dhane S, Ben Jeddi F, Zribi K, Rezgui S, Mhamdi R. (2012).** Effet de l'inoculation par un souche osmotolérante de Rhizobium sulae sur la croissance et la production en protéine du. *J Appl Biosci* , 3642-3651.
- Franché C, Lindström K. and Elmerich C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* , 321 (1), 35–59.
- Frank B. 1989.** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7, 332- 346.
- Frédéric Z., Philippe de Lajudie. (2001).** Taxonomy of rhizobia. 569–570.
- Gage D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol. Rev* , 68 (2), 280-300.
- Génier G. Guy P. et Prosperi J.M. (1992).** Les luzernes. In: Gallais A et Bannerot H (Eds): amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. 768.

- Giraud, E., & Fleischman, D. (2004).** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research* , 82 (2), 115-130.
- Gnat, S., Wójcik, M., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Ptaszyńska, A., & Malek, W. (2014).** Phenotypic characterization of Astragalus glycyphyllos symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. *Antonie Van Leeuwenhoek* , 105 (6), 1033-1048.
- Gough, C. (2009).** Medicago truncatula, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires Clare Cough. *Biofutur* , 294, 30-33.
- Graham P. H., Parker C. A. (1964).** Diagnostic features in the characterization of root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* , 20, 383-396.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. Plant physiology. *Plant physiology* , 131 (3), 872-877.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bon los Santos, P.E., Gross, E., dos Reis, F.B.J., Sprent, J.I., Young, J.P.W., James, E.K., temps, C., de. (2011).** Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *The American Phytopathological Society* , 24 (11), 1276-1288.
- Hameed S., Yasmin S., Malik K. A., Zafar Y., & Hafeez F. Y. (2004).** Rhizobium, Bradyrhizobium and Agrobacterium strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils* , 39 (3), 179-185.
- Hatimi, A., Bani-Aameur, F., & Oihabi, A. (2001).** Caractérisation de souches de Rhizobiums autochtones des dunes: effet sur la croissance et la nutrition azotée d'Acacia cyanophylla Lindl. *Acta botanica gallica* , 148 (3), 191-199.
- Herault, S., Fomina, G., Alferova, I., Kotovskaya, A., Poliakov, V., & Arbeille, P. (2000).** Cardiac, arterial and venous adaptation to weightlessness during 6-month MIR spaceflights with and without thigh cuffs (bracelets). *European journal of applied physiology* , 81 (5), 384-390.
- Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R. (1996).** Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. 1072.
- Hussain M., Ashraf M., Saleem M., Hafeez FY. (2002).** Isolation and characterization of rhizobial strains from alfalfa (Medicago sp.). *Pak. J. Agri. Sci* , 39, 32-34.

- Janssens, D., Kersters, K., & De Ley, J. (1983).** The catabolism of 3-ketolactose in *Agrobacterium*. *Systematic and applied microbiology* , 4 (2), 155-168.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997).** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895-898.
- Jeder, H., De Lajudie, P., Dreyfus, B., LE Floch, E., & Behaeghe, T. (1996).** Etude de la nodulation des légumineuses pastorales autochtones des régions arides de Tunisie. *Revue des régions arides (Tunis)*, (9), 3-10.
- Jordan D C. (1984).** Rhizobiaceae. In: Krieg N R, Holt J G (Eds) Bergey's Manual of systematic bacteriology. *The Williams and Wilkins Baltimore* , 234-242.
- Kanouni, L. (2019).** *Inhibition des champignons phytopathogènes par Rhizobium* (Doctoral dissertation).
- Lapeyronie, A. (1982).** *Les productions fourragères méditerranéennes*. G.-P. Maisonneuve et Larose.
- Lesins, K. A., & Lesins, I. (1979).** Isolating mechanisms, speciation, evolution in *Medicago*, and relationship to other genera. In *Genus Medicago (Leguminosae)*. Springer, Dordrecht .
- Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 58 (6), 1409-1413.
- Loubna B., Majida La., Khalid D., Zain el Abidine F., Ricardo G .C., Michael G., KhalidO. (2017).** Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *41* (1), 2-3.
- Maâtallah J, Berraho E B, Muñoz S, Sanjuan J, Lluch C. (2002).** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of applied microbiology* , 93 (4), 531-540.
- Madigan M et Martinko. (2007).** *Biologie des micro-organismes*. Ed. Pearson. 1047. Paris.

- Maureira-Butler I J, Pfeil B E, Muangprom A, Osborn T C, Doyle J J. (2008).** The Reticulate History of Medicago (Fabaceae). *Systematic Biology* , 57 (3), 466.
- Mauriès, M. (2003).** La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. *France Agricole Editions* .
- Merabet C, Martens M, Mahdhi M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P. (2010).** Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* , 60, 664–674
- Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki M. A, Domergue O, Cleyet-Marel J. C, Avarre J. C, Béna G, Bailly X. and de Lajudie P. (2006).** Distribution of Medicago Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria, Arid Land. *Research and Management* , 20 (3), 219-231.
- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007).** Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 187(1), 79-85.
- Mouafek A. (2010).** La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. *Mémoire de magister ,Sciences Agronomiques ,Université de Mohamed khider Biskra* , p 6 et 37.
- Moulin, L. (2002).** Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène nod A à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries. *Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I* p , 289.
- Munro, D. B., & Small, E. (1997).** Vegetables of Canada. *NRC Research Press* .
- Murray N. (2004).** *Biologie végétale* , 6^e édition, p520.
- Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A. (2010).** Isolation and Characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the Root Nodules of Some Leguminous Plants. *Int J Microbiol Res* , 1 (3), 92-96.

- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Beck, D., Effosse, A., & Fernandez, M. P. (1994).** Genotypic and phenotypic diversity of Rhizobium isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian journal of microbiology*, 40(5), 345-354.
- Ouslim S. (2016).** *BNL associées aux légumineuses alimentaires (Vicia faba L) dans l'ouest Algérien (caractérisation et importance)*. Thèse. Exploitation des interaction plantes microorganismes.
- Ouslim S., M. C. (2019).** Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating Rhizobia Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria. *Inter J Technol Enhance Emerg Engen Res*, 3 (9), 2347-4289.
- Palma F, Tejera N A, Lluch C. (2013).** Nodule Carbohydrate Metabolism and Polyols Involvement in the. *Environ Exp Bot*, 85 (43-49.).
- Perry J. J., Staley J.T., lory S. 2004. Microbiologie : cours et questions de révision. Edition Dunod , France, P.891.
- Prin Y, Galiana A, Ducousso M, Dupuy N, De Lajudie P, Neyra M. (1993).** Les rhizobiums d'Acaciabiodiversité et taxonomie. Bois et Forêts des Tropiques. 05-16 (238).
- Prosperi J M, Guy P, Genier G, Angevain M. (1995).** Les luzernes ou le genre Medicago, In : Ressources. *Editer par BRG et INRA*, 131-137.
- Prosperi, J. M., Guy, P., & Balfourier, F. (1995).** *Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon*, 219.
- Pousset, J. (2002).** *Engrais verts et fertilité des sols*. France Agricole Editions.
- Quèzel P, S. S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editer par. 498, 501.
- Rai, R., Dash, P. K., Mohapatra, T., & Singh, A. (2012).** Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian J. Exp. Biol*, 50, 340-350.
- Rasanen, L. (2002).** *Biotic and abiotic factors infl uencing the development of N2-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd. 220p).

- Rejii, M., Mahdhi, M., Domínguez-Núñez, J. A., & Mars, M. (2014).** The phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating Lotus sp. in Tunisian arid soils. *Annals of microbiology* , 64 (1), 355-362.
- Rejili M, Ferchichi A, Mahdhi M, Mars M. (2007).** Natural Nodulation of Some Wild Legumes in the. *Agricultural Journal* , 2 (3), 405-411.
- Robert, F. M. (1976).** Characterization of Rhizobia Associated with Horsebean (Vicia Faba L. Var. Major) in Morocco (Doctoral dissertation, University of Minnesota).
- Rogers M E, Colmer T D, Frost K, Henry D, Cornwall D, Hulm E, Deretic J, Hughes S R, Craig A D. (2008).** Diversity in the genus Melilotus for tolerance to salinity and waterlogging. *Plant Soil* , 304 (1), 89-90.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1996).** Sinorhizobium medicae sp. nov., isolated from annual Medicago spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 46 (4), 972-980.
- Romdhane, M. B., Brahim, N., Ouali, J., & Mercier, É. (2006).** Tectonique quaternaire et plis de rampe dans le golfe d'Hammamet (offshore tunisien). *Comptes Rendus Geoscience*, 338(5), 341-348.
- Rose M.R. et Mueller L.D. (2006).** Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693.
- Sadowsky M J, Keyser H H, Ben Bohlool B. (1983).** Biochemical Characterization of fastand. *Int J Syst Bacteriol* , 716-722.
- Schleifer, K. H., and Ludwig, W. (1989).** relationships among bacteria. *The hierarchy of life* , 103-117.
- Serraj R, Adu-Gyamfi J, Rupela O P, Drevon J J. (2004).** Symbiotic Nitrogen Fixation:Prospects for Enhanced Application in TropicalAgriculture. In: Serraj R (ed) International. *Oxford and IBH Publishing* , pp 67–97.
- Shamseldin, A., Moawad, H., Abd El-Rahim, W. M., & Sadowsky, M. J. (2014).** Near-full length sequencing of 16S rDNA and RFLP indicates that Rhizobium etli is the dominant species nodulating Egyptian winter Berseem clover (Trifolium alexandrinum L.). *Systematic and applied microbiology* , 37 (2), 121-128.

Small, E. J. (1988). Reduction of *Medicago makranica* (Leguminosae tribe Trifolieae) to *Indigofera nephrocarpa* (tribe Indigoferae). *Taxon* , 964-966.

Soltner D. (1999). Les grandes productions végétales. *Science et techniques agricoles* , 464.

Soltner D., 1. (s.d.).

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Quantifying the growth of rhizobia. *In Handbook for rhizobia* , pp. 47-57.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., ... & Whitman, W. B. (1994). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* , 52 (3), 1043– 1047.

Thami-Alami I, Elboutahiri N, Udupa SM. (2010). Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *he contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Zaragoza, CIHEAM/CIBIO/FAO/SEEP* , 92, 265-269.

Torche, A., Benhizia, Y., Benguedouar, A., Gharzouli, R., Benhizia, H., Khelifi, D., & Squartini, A. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* , 43-50.

Toutain G. (1974). Conservation des sols en palmeraies sahariennes et bordières au Sahara. *Options Méditerranéennes Séries A Mediterr Semin* , 25, 65-69.

Valverde, J. M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., & Serrano, M. (2005). Novel edible coating based on *Aloe vera* gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7807-7813.

Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria* .

- Vincent, B. (2019).** Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés: le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie. *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, 341, 87-88.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Willems, A. (2006).** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287(1), 3-14.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological reviews* , 51 (2), 221.
- Yan, A. M., Wang, E. T., Kan, F. L., Tan, Z. Y., Sui, X. H., Reinhold-Hurek, B., & Chen, W. X. (2000).** *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* , 50 (5), 1887-1891.
- Young, R., de Azevedo, C. S., & Cipreste, C. F. (2003).** Environmental enrichment. *Zoo Animal Learning and Training* , 101.
- Zahran, H. (2001).** Rhizobia from Wild Legumes: Diversity, Taxonomy, Ecology, Nitrogen Fixation and Biotechnology. *Journal of Biotechnology* , 91 (2-3), 143-153.
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel J C, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. (2004).** Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* , 27, 380–395.
- Zribi, K., Jeidi, N., Mhamdi, R., Huguet, T., & Aouani, M. E. (2014).** Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides. *Options Méditerran Sér A Mediterr Semin* , 62, 149-152.
- Zurdo-Pineiro, J. L., Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaino, N., Carrasco, J. A., Chamber, M., ... & Velazquez, E. (2007).** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 784-788.

Annexe

Annexes 1 : Composition des milieux de culture.**Composition du milieu : Yeast-mannitol-agar (YMA) (Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0.2 g
Na Cl.....	0.1 g
Extrait de levure.....	0.5 g
L'eau distillé.....	1000ml
pH.....	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

Composition du milieu : Yeast-mannitol-broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,35g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2g
Na Cl.....	0,1g
H ₂ O.....	1000ml

Ajuster le pH à 6,8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Composition de la solution du Rouge Congo (RC) (Somasegaran et Hoben, 1995).

Rouge Congo.....	0,25 g
- Eau distillée.....	100 ml

Composition du milieu Glucose nutritif Agar (GNA)

Extrait de levure.....	3 g
Glucose.....	2, 5 g
Peptone.....	5 g
Agar.....	15 g

Eau distillée.....1 L

pH7

Composition du milieu gélose au lactose

Lactose.....10 g

Extrait de levure.....1 g

Agar.....15 g

Eau distillée.....1 L

pH7

Composition du réactif de Benedict

Citrate de sodium.....17,3 g

Carbonate de sodium anhydre.....10 g

CuSO₄ 5H₂O.....1,73 g

Eau distillée.....100 ml

Annexe 2:

Coloration de Gram (Camille, 2006).

- Préparer un frotti bactérien.
- Recouvrir le frotti par le violet de gentiane et laisser agir 1 minute.
- Ajouter la solution de Lugol et laisser agir 30 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Recouvrir avec l'alcool pour la décoloration.
- Rincer à l'eau.
- Recolorer avec la Fuschine et laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau.
- Sécher le frotti par un papier absorbant.
- Déposer une goutte d'huile d'immersion et observer au microscope

Annexe 3 : les articles utilisent.

Amrani, S., Nouredine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., & Vargas, C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and applied microbiology* , 33 (1), 44-51.

BabaArbi S, Chekireb D, QuatriniP, Catania V, Cheriet D, Ouarts A. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis* (66), 75–87.

Ballard, R. A., Shepherd, B. R., Charman, N. (2003). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 3. Lucerne (*Medicago sativa* L.). *australian Journal of Experimental Agriculture* , 43 (2), 135-140.

Cheriet D., Ouarts A., Chekireb D., Baba Arbi S. (2015). Phenotypic and symbiotic characterisation of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. from Algeria. *Biology and Environment : Proceedings of the Royal Irish Academy* , 115 (1), 29-43.

Djedidi S, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N, Chandra-Prasad-Risal C, Abdelly C. (2011). Stress Tolerance and Symbiotic and Phylogenetic Features of Root Nodule Bacteria Associated with *Medicago* Species in Different Bioclimatic Regions of Tunisia. *Microbes and environments* , 26 (1), 36–45.

El Hilali I., El Jamali J., Alami I. T., & Maltouf A. F. (2016). Characterisation and Biodiversity of a Fast-Growing Rhizobacterial Population Nodulating Lupine in Morocco. *International Journal of New Technology and Research* , 2 (12), 27-37.

Gnat, S., Wójcik, M., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Ptaszyńska, A., & Malek, W. (2014). Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. *Antonie Van Leeuwenhoek* , 105 (6), 1033-1048.

Hatimi, A., Bani-Aameur, F., & Oihabi, A. (2001). Caractérisation de souches de *Rhizobium* autochtones des dunes: effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta botanica gallica* , 148 (3), 191-199.

- Loubna B., Majida La., Khalid D., Zain el Abidine F., Ricardo G .C., Michael G., Khalid O. (2017).** Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *41* (1), 2-3.
- Maâtallah J, Berraho E B, Muñoz S, Sanjuan J, Lluch C. (2002).** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of applied microbiology* , 93 (4), 531-540.
- Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki M. A, Domergue O, Cleyet-Marel J. C, Avarre J. C, Béna G, Bailly X. and de Lajudie P. (2006).** Distribution of Medicago Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria, Arid Land. *Research and Management* , 20 (3), 219-231.
- Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A. (2010).** Isolation and Characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the Root Nodules of Some Leguminous Plants. *Int J Microbiol Res* , 1 (3), 92-96.
- Ouslim S., M. C. (2019).** Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating Rhizobia Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria. *Inter J Technol Enhance Emerg Engen Res* , 3 (9), 2347-4289.
- Rejii, M., Mahdhi, M., Domínguez-Núñez, J. A., & Mars, M. (2014).** The phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating *Lotus* sp. in Tunisian arid soils. *Annals of microbiology* , 64 (1), 355-362.
- Rejili M, Ferchichi A, Mahdhi M, Mars M. (2007).** Natural Nodulation of Some Wild Legumes in the. *Agricultural Journal* , 2 (3), 405-411.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1996).** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 46 (4), 972-980.
- Shamseldin, A., Moawad, H., Abd El-Rahim, W. M., & Sadowsky, M. J. (2014).** Near-full length sequencing of 16S rDNA and RFLP indicates that *Rhizobium etli* is the dominant species nodulating Egyptian winter Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Systematic and applied microbiology* , 37 (2), 121-128.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994).** Quantifying the growth of rhizobia. *In Handbook for rhizobia* , pp. 47-57.

Thami-Alami I, Elboutahiri N, Udupa SM. (2010). Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *he contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Zaragoza, CIHEAM/CIBIO/FAO/SEEP* , 92, 265-269.

Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., & Squartini A. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. *Sciences & Technologie* (32), 43-50.

Zahran, H. (2001). Rhizobia from Wild Legumes: Diversity, Taxonomy, Ecology, Nitrogen Fixation and Biotechnology. *Journal of Biotechnology* , 91 (2-3), 143-153.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel J C, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. (2004). Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* , 27, 380–395.

Zakhia, F., & de Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* , 21 (6-7), 569-576.

ملخص

تم تنفيذ هذا العمل بهدف دراسة التنوع المظهرى والوراثي للجذريات التكافلية للبقوليات العفوية المدروسة *Melilotus* والمزروعة *Medicago* ، وتتعلق الدراسة بالخصائص المورفولوجية والثقافية لهذه السلالات ؛ تحمل الملوحة ، درجات الحرارة المرتفعة ، الأس الهيدروجيني الحمضي والقلوي ، الجفاف وكذلك الخصائص الثقافية. أظهرت الدراسة أن العزلات تنمو بشكل جذري سريع مع درجات حرارة تصل إلى 45 درجة مئوية ، وتركيزات عالية من كلوريد الصوديوم (أكثر من 3%) وتركيزات PEG تصل إلى 25%. أتاحت هذه الدراسة وصف تنوع فسيولوجي كبير في العزلات المختبرة. ومع ذلك ، أظهر التحليل الوراثي لسلالات مختارة بناءً على التسلسل الجيني ARN r16 S انتماء هذه السلالات إلى المليلوتي (*Sinorhizobium*).

الكلمات الأساسية: التكافل ، Rhizobia ، *Melilotus* ، *Medicago* ، النمط الظاهري ، النمط الجيني

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but d'étudier la diversité phénotypiques et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées étudiés *Melilotus* et cultivées *Medicago* , L'étude porte sur les caractères morphologiques et culturels de ces souches ; tolérance à la salinité, températures élevées, pH acides et alcalines, la sécheresse ainsi que des caractéristiques culturels. L'étude montre que les isolats sont des rhizobia à croissance rapide à des températures jusqu'à 45°C, des fortes concentrations de Na Cl (plus de 3 %) et des concentrations de PEG jusqu'à 25 %. Cette étude a permis de décrire une grande diversité physiologique chez les isolats testés. Cependant, tous l'analyse phylogénétique des souches sélectionnées basée sur le séquençage des gènes de l'ARN r 16S a montré l'affiliation de ces souches à *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti*.

Mots clés: Symbiose, Rhizobia, *Melilotus*, *Medicago*, phénotype, génotype.

Summary

This work was carried out with the aim of studying the phenotypic and genotypic diversity of the symbiotic rhizobia of the spontaneous legumes studied *Melilotus* and cultivated *Medicago*, The study concerns the morphological and cultural characteristics of these strains ; tolerance to salinity, high temperatures, acidic and alkaline pH, drought as well as cultural characteristics. The study shows that the isolates are fast growing rhizobia with temperatures up to 45 ° C, high concentrations of NaCl (over 3%) and PEG concentrations up to 25%. This study made it possible to describe a great physiological diversity in the isolates tested. However, phylogenetic analysis of selected strains based on 16S rRNA gene sequencing showed the affiliation of these strains to *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti*.

Keywords: Symbiosis, Rhizobia, *Melilotus*, *Medicago*, phenotype, genotype.