



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ KASDI MERBAH-OUARGLA



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département des Sciences Biologiques

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

MASTER Académique

Option: Microbiologie Appliquée

Par : BELHANI Ayet Errahmen
SALEM Hana

THEME :

**Utilisation d'eau d'élevage de poisson comme milieu de culture
pour la production d'inoculant à base de rhizobium**

Soutenu publiquement le : 14/ 09 / 2023

Devant le jury:

Président	Mr. GUEZI R.	Maitre de Conférences B	(U.K.M.O)
Encadreur	Mme. ATTAB S.	Maitre Assistant A	(U.K.M.O)
Co-encadreur	Mr. AZIB S.	Maitre de Conférences A	(U.K.M.O)
Examineur	Mme. BOUDERHEM A.	Maitre de Conférences A	(U.K.M.O)

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciement



*Nos remerciements s'adressent tout d'abord À notre encadrante, Madame **ATTAB S**, Maitre assistant A, à l'université Kasdi Merbah Ouargla, pour la pertinence de votre encadrement, et vos conseils tout au long de ce travail. Nous tenons aussi à vous remercier pour votre gentillesse et vos indéniables qualités humaines.*

*Nos gratitudes vont également aux honorables membres du jury, Monsieur **GUEZI R**, Maitre assistant B, à l'université Kasdi Merbah Ouargla, et Madame **BOUDERHEM A**, Maitre assistant A, à l'université Kasdi Merbah Ouargla pour leurs généreuse disponibilité et pour l'intérêt qu'ils accordent au présent travail. Nous vous remercions pour le temps que vous aviez accordé à la lecture de cette mémoire et l'élaboration de vos rapports.*

*Nos vifs remerciements vont également à Monsieur **AZIB S**, Maitre assistant A, à l'université Kasdi Merbah Ouargla, pour nos avoir apporté une précieuse aide lors de la phase expérimentation de ce travail. Vos conseils avisés, vos qualités humaines et professionnelles, ont contribué au bon déroulement et à la réussite de ce travail.*

Il est important de souligner que ce travail n'aurait été possible sans la collaboration efficace des personelles de laboratoire recherche sur les Bio-Ressources Sahariennes (BRS) et celles de microbiologie au niveau de l'Université Kasdi Merbah Ouargla

Dédicace

بسم الله الرحمن الرحيم "وَيَنَالُوكَ عَنِ الرُّوحِ قُلُوبُ الرُّوحِ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا"

Tout d'abord, merci à Dieu de nous avoir accordé le succès.

Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie ce modeste travail :

À l'être le plus cher de ma vie, ma mère

À mon amie et bien -aimer de mon cœur, mon père

À ma petite fille, ma sœur Rihab

À ma voisine et amie widad

Merci beaucoup à mon soutien éternel et Abd elmoumen

A mes amie wiam, Amel ET Nada

آية النجمان

Dédicace

A mes chers parents, Ce mémoire est bien plus qu'un simple travail de recherche. Il est le fruit de votre amour, de votre soutien inconditionnel et de vos encouragements constants. Votre présence dans ma vie a été la fondation sur laquelle j'ai pu bâtir mon parcours académique avec confiance et détermination.

À mes frères et sœurs, qui ont partagé les hauts et les bas de ce voyage académique avec moi, je dédie ce mémoire. Votre soutien constant et vos encouragements chaleureux m'ont donné la force nécessaire pour aller de l'avant, même lorsque les défis semblaient insurmontables.

À mes amis chacun en son nom, qui m'ont apporté des moments de détente, de rire et de réconfort, je dédie ce mémoire.

Que ce mémoire témoigne de l'amour et de la gratitude profonds que j'éprouve envers chacun d'entre vous. Vos encouragements ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, et je vous en suis éternellement reconnaissante.

Avec tout mon amour,

Hana

SOMMAIRE

Titres	Pages
Remerciement	
Dédicace	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introductions	I
Chapitre I Synthèse Bibliographique	
1. Les milieux de culture	3
1.1. Historique	3
1.2. Définition d'un milieu de culture	3
1.3. Classification des milieux de culture	4
1.3.1. Selon la consistance	4
1.3.2. Selon la composition	4
1.3.3. Selon l'utilisation	5
2.1. Généralités sur les rhizobia	5
2.2. Importance du rhizobium	6
2.3. Physiologie et Biochimie	7
2.4. Biogéographie	8
2.5. Cycle de vie	8
3. Production d'inoculant	8
3.1. Introduction	8
3.2. Les types d'inoculant	9
3.2.1. Inoculant d'agar	9
3.2.2 Inoculant à base de sol	9
3.2.3. Inoculant liquide	9
3.2.4. Inoculant de polymères	10
3.2.5. Inoculant lyophilisé	10
3.3. Les techniques d'inoculation	11
3.3.1. Inoculation des semences	11
3.3.2 L'inoculation de sol	11

3.4. Production d'inoculant	12
Chapitre II Matériel et Méthodes	
1. Collecte des nodules	14
2. Conservation des nodules	14
3. Isolement des bactéries à partir des nodules	15
4. Culture sur YMA + Rouge Congo	15
5. Culture sur YMA+ bleu de bromothymol	15
6. Culture sur YMB	16
7. La densité optique (D.O)	16
8. Conservation des souches	16
9. Echantillonnage d'eau d'élevage	17
10. Caractérisation d'eau d'élevage	17
11. Le prétraitement d'eau d'élevage	18
12. Production d'inoculant	18
12.1. Eau d'élevage pure	18
12.2. Eau d'élevage dilué	19
12.3. Eau d'élevage dilué avec les additifs	19
13. Test de viabilité des souches	20
Chapitre III Résultats et Discussion	
1. Caractérisation physico-chimique	22
2. Caractéristiques morphologiques de croissance des isolats	22
2. 1. Culture sur YMA	22
2.2. Culture sur YMA-RC	23
2.3. Culture sur YMA-BBT	23
3. La densité optique de cultures sur YMB	23
4. Production d'inoculant	24
5. La viabilité des souches	28
Conclusion	32
Références Bibliographiques	34
Annexe	37
Résumé	39

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	Les dilutions et les additifs.	20
2	Les valeurs des paramètres d'eau d'élevage de poissons.	22
3	La densité optique des souches du rhizobium.	24
4	La D.O des cultures sur eau d'élevage pure.	24
5	La D.O des cultures sur eau d'élevage dilué et/ou modifié.	27

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Conservation des nodules dans des tubes (Somasegaran et Hoben,1994)	14
2	Mesure de la D.O des cultures sur YMB (Photo originale)	16
3	Conservation des isolats du rhizobium (Photo originale)	17
4	La serre piscicole et le bassin d'élevage (04) (Photo originale)	17
5	Les différentes dilutions d'eau d'élevage (Photo originale)	18
6	Les différentes dilutions d'eau d'élevage (Photo originale)	19
7	Les dilutions d'eau d'élevage avec des additifs (Photo originale)	20
8	Aspect des colonies sur milieu YMA (Photo originale)	22
9	Aspect des colonies sur YMA-RC (Photo originale)	23
10	Aspect des colonies sur YMA-BBT (Photo originale)	23
11	Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson (aucun additif).	24
12	Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec mannitol.	25
13	Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec extrais de levure	25
14	Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec extrais de levure et mannitol.	26

15	: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec tryptone.	26
16	Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec Extraits de levure et Tryptone.	27
17	Viabilités des souches sur YMA (Photo originale)	28

Liste des abréviations

CE	Conductivité électrique
DO	Densité optique
PH	Potentiel hydrogène
°C	Degré Celsius
YMA	Yeast Mannitol Agar
YMB	Yeast Mannitol Broth
YMA-RC	Yeast Mannitol Agar +Rouge Congo
YMA-BBT	Yeast Mannitol Agar +Bleu de Bromothymol
C	Carbone
N	Azote
N₂	Diazote atmosphérique
NH₃	Ammoniaque
BNF	Biological Nitrogen Fixation
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
S3. S1	Sesbania acuelata 3 et 1
M3.M1	Mililotus indica 3 et 1

Introduction

INTRODUCTIONS

Face à la demande mondiale croissante en protéines végétales, il est devenu nécessaire de fournir aux végétaux des quantités d'azotes suffisantes. Fréquemment, les engrais azotés de synthèse nitriques et ammoniacaux sont largement utilisés en agriculture. Cependant, la technologie associée à ces industries s'avère très coûteuse, ce qui pose des défis en termes d'accessibilité, en particulier pour les pays en voie de développement. Encore, chez les pays avancées, l'usage excessif pose un souci environnemental.

En effet, l'inoculation des cultures de légumineuses avec des rhizobia est essentielle vu les avantages offerts. Cependant, l'approvisionnement en inoculum de qualité et à moindre coût peut être un défi, en particulier dans les pays en voie de développement. En outre, le prix et la disponibilité de la source de carbone affectent la production d'inoculum. À cet égard, divers milieux de culture ont été testés dans le but de produire de manière efficace et à grande échelle cet inoculum. Le milieu de culture YMB (yeast extract mannitol) est couramment utilisé pour la production du rhizobium au niveau de laboratoire. L'utilisation de ce milieu de culture en milieu industriel est limitée surtout par le coût élevé.

Dans cette perspective, plusieurs études ont été menées dans le but de développer des milieux de culture économiques et capables de favoriser la croissance des rhizobia. Les chercheurs ont donc expérimenté des déchets industriels, comme les sous-produits de l'industrie des boissons alcooliques (**Burton, 1979**), les débris des enveloppes de pois protéolysés (**Gulati et al., 1979**), l'extrait de germes de malt (**Bioardi et Ertola., 1985**), les sous-produits de l'industrie de levure (**Meade et al., 1985**) et les résidus de fabrication du fromage comme le lactosérum (**Bissonnette et al, 1986**). Les sous-produits examinés forment un milieu abondant en sources de carbone et d'azote, ainsi qu'en facteurs de croissance essentiels pour le développement des rhizobia.

Des efforts sont déployés pour résoudre les problèmes de pollution et promouvoir un environnement sain en utilisant la valorisation des déchets, comme les eaux usées en particulier les eaux d'élevage des poissons. La valorisation d'eaux d'élevage des poissons en tant que source de substances nutritives (carbone, azote, phosphore, sels minéraux...etc.) est une initiative importante pour des fins économiques tout en contribuant à la production agricole. La présente étude vise donc à la valorisation d'eaux d'élevage des poissons en les utilisant comme milieu de culture pour la production d'inoculums commerciaux de rhizobium.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

I.1. Les milieux de culture

I.1.1. Historique

La microbiologie se définit non seulement par les organismes qu'elle étudie, mais aussi par les outils utilisés pour les étudier. Le microscope mis au point par le hollandais Anton van Leeuwenhoek en 1673 nous assure la première observation de bactéries. Cependant, la microscopie seule ne suffit pas pour répondre à toutes les questions sur les microorganismes étudiés. C'est la raison pour laquelle, la microbiologie a stagné pendant 200 ans jusqu'au développement des autres utiles il s'agit de techniques d'isolement microbien dans des cultures pures.

Le premier à avoir cultivé des bactéries dans un milieu de culture liquide est Louis Pasteur. En 1860, il met au point un milieu de culture contenant de la soupe de levure, cendres, sucre et sels d'ammonium. Son objectif était de créer un milieu de fermentation pour démontrer que chaque fermentation (alcoolique, acétique, lactique...) était associée au développement d'un microorganisme particulier.

En 1881, Robert Koch a démontré une croissance optimale des bactéries lorsqu'elles étaient incubées dans un bouillon composé de sérum de bœuf frais ou d'extrait de viande. Cependant, l'utilisation d'un milieu de culture liquide ne permettait pas d'obtenir des cultures bactériennes pures. Koch a donc cherché un moyen de solidifier le milieu. Il a d'abord testé de l'albumine d'œuf coagulée, de la pâte d'amidon ou une tranche de pomme de terre coupée aseptiquement. Cependant, toutes ces techniques ne lui permettaient pas d'isoler des colonies. Il a ensuite ajouté de la gélatine à son bouillon et l'a versé sur une assiette en verre plat. Cependant, la gélatine présentait des inconvénients car elle se liquéfiait à des températures supérieures à 25°C et pouvait être consommée par la gélatinase, une enzyme produite par certaines bactéries.

Enfin, grâce à l'épouse d'un de ses assistants, Fannie Hesse, qui utilisait l'agar pour solidifier ses confitures, il remplaça la gélatine par l'agar, ce qui lui permit d'obtenir des géloses fermes et d'isoler les bactéries (**Bonnet, 2019**).

I.1.2. Définition d'un milieu de culture

Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide utilisée pour faire croître, transporter ou stocker des micro-organismes. Le milieu doit contenir tous les nutriments dont le micro-organisme a besoin pour sa croissance (sources d'énergie, de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et de minéraux divers), la composition précise d'un milieu satisfaisant dépendra de l'espèce que l'on essaie de cultiver car les besoins nutritionnels sont très variables.

Les milieux spécialisés sont essentiels pour l'isolement et l'identification des micro-organismes, les tests de sensibilité aux antibiotiques, l'analyse de l'eau et des aliments, la microbiologie industrielle et d'autres activités (**willey et al ,2017**). Avant utilisation, un milieu est normalement stérile (**singleton, 2006**).

I.1.3. Classification des milieux de culture

I.1.3.1. Selon la consistance

I.1.3.1.2. Milieu liquide

Également appelés bouillons de culture, les nutriments sont dissous dans l'eau. La croissance bactérienne dans ce milieu peut être mise en évidence par l'apparition d'un trouble dans le milieu, même si ce n'est pas toujours le cas.

Il est difficile d'isoler spécifiquement une bactérie dans ce type de milieu. En effet, les bactéries obtenues à partir d'un échantillon inoculé dans le bouillon de culture sont toutes mélangées les unes aux autres. De plus, le milieu liquide ne permet pas d'identifier les caractéristiques morphologiques des espèces bactériennes. Cependant, les milieux de culture liquides facilitent l'accès aux nutriments pour les bactéries. Ces nutriments sont d'autant plus accessibles que les milieux de culture sont incubés sous agitation, permettant un renouvellement des nutriments pour les bactéries (**Bonnet, 2019**).

I.1.3.1.3. Milieu solide

Sont obtenus en ajoutant un agent gélifiant, tel que l'agar, au bouillon de culture. Il permet d'obtenir des colonies isolées de différentes espèces bactériennes, qui peuvent être identifiées. A partir de ces cultures, les différentes caractéristiques morphologiques de la bactérie peuvent être décrites. Cependant, dans les milieux de culture solides, l'accès aux nutriments pour les bactéries peut être limité (**Bonnet, 2019**).

I.1.3.2. Selon la composition

I.1.3.2.1. Milieu synthétique

Milieu dont la composition chimique et la quantité précises de tous les composants sont connues. Ce milieu est utilisé pour déterminer les besoins de croissance spécifiques d'un organisme (**Pommerville,2011**).

I.1.3.2.2. Milieu non synthétique ou complexe

C'est un milieu qui contient des nutriments dont les composants exacts et leur quantité ne sont pas complètement connus. Les milieux complexes contiennent généralement des digestions animales ou végétales (par exemple, extrait de bœuf, extrait de soja) ou des extraits de levure de nature indéfinie (**Pommerville,2011**).

Ils sont très utiles car un seul milieu complexe peut être capable de répondre à tous les besoins nutritionnels de nombreux micro-organismes différents. De plus, les milieux complexes sont souvent nécessaires pour les microorganismes dont les besoins nutritionnels sont inconnus et qu'un milieu défini ne peut donc pas être construit. Ils sont également utilisés pour cultiver des microbes exigeants, des microbes ayant des exigences nutritionnelles ou culturelles complexes (**willey et al, 2017**).

I.1.3.3. Selon l'utilisation

I.1.3.3.1. Milieu de base

Celui qui, sans supplément, peut soutenir la croissance de diverses espèces peu exigeantes sur le plan nutritionnel tel le bouillon nutritif (**singleton, 2006**).

I.1.3.3.2. Milieu enrichi

C'est un milieu de base auquel ont été ajoutés des éléments (nutriments ou de facteurs de croissance) afin de lui permettre de soutenir ou d'améliorer la croissance de types particuliers d'organismes (**singleton, 2006**).

I.1.3.3.3. Milieu sélective

Contient des ingrédients pour inhiber la croissance de certains microbes dans un mélange tout en permettant la croissance d'autres (**Pommerville, 2011**), parmi ces ingrédients c'est ; antibiotiques, produits chimiques, colorants, antiseptiques, sels de sodium (**Bonnet, 2019**).

I.1.3.3.4. Milieu différentielle

Il s'agit d'un milieu de base solide modifié par l'ajout d'un ou plusieurs composés permettant la différenciation entre des espèces très similaires en fonction de leurs propriétés biochimiques ou physiologiques ; ces composés chimiques spécifiques permettent d'indiquer quelles espèces possèdent et lesquelles manquent d'un processus biochimique particulier. De tels indicateurs permettent de distinguer facilement les colonies d'un organisme des colonies d'autres organismes similaires sur la même boîte de culture (**Pommerville, 2011**).

I.2.1. Généralités sur les rhizobia

Le terme « rhizobium », au sens le plus strict, désigne les membres du genre *Rhizobium*. Au fil des ans, cependant, le terme est venu à être utilisé pour désigner l'ensemble des bactéries qui induisent la formation de nodules et fixent l'azote atmosphérique sur les racines et les tiges des légumineuses (Fabaceae) (**Amaresan et al, 2022**).

Ce sont des assemblages hétérogènes de bactéries du sol à gram-négatives, aérobies, non sporulantes en forme de bâtonnet, de 0.5 à 0.9 µm de largeur et de 1.2 à 3 µm de longueur. Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2 à 6 flagelles

péritriches et ceux à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou subpolaire (Senthilkumar,2021) (Azib,2020).

Seulement environ 20% du total d'environ 20 000 espèces et 57% d'environ 750 genres de légumineuses ont été étudiés pour la nodulation. Au cours des deux dernières décennies, la taxonomie et la diversité des rhizobia ont énormément changé. Actuellement, grâce à les marqueurs moléculaires, les rhizobia sont constitués de 176 espèces réparties sur 15 genres (Senthilkumar,2021). La plupart des rhizobia connus appartiennent aux genres des α -Proteobacteria dans les familles suivantes: Rhizobiaceae (Rhizobium, Ensifer (syn. Sinorhizobium), Allorhizobium, Pararhizobium, Neorhizobium, Shinella), Phyllobacteriaceae (Mesorhizobium, Aminobacter, Phyllobacterium), Brucellaceae (Ochrobactrum), Methylobacteriaceae (Methylobacterium, Microvirga), Bradyrhizobiaceae (Bradyrhizobium), Xanthobacteraceae (Azorhizobium) et Hyphomicrobiaceae (Devosia), et certains appartiennent aux genres des β -Proteobacteria de la famille des Burkholderiaceae (Paraburkholderia, Cupriavidus, Trinickia) (Azib,2020).

Les rhizobia forment une symbiose avec les racines des légumineuses et sont responsables de la formation d'un nouvel organe de la plante, appelé nodules (Amaresan et al.,2022). À l'intérieur de ces derniers, les cellules de ces bactéries se différencient en bactéroïdes, qui sont des cellules polymorphes à parois cellulaires modifiées, enfermées dans une membrane cellulaire végétale pour former une structure appelée symbiosome (Wang et al ,2019). Ils fixent l'azote atmosphérique en ammoniac qui est directement consommable par la plante, à leur tour, les plantes fournissent des habitats et des nutriments. Cette symbiose joue également un rôle essentiel dans la suppression des maladies chez les plantes, la résistance au stress abiotique et la protection des plantes contre les agents pathogènes. Les nodules (notamment ceux collectés au champ) ne sont pas toujours occupés par un seul isolat de rhizobium ni même par un seul microorganisme. Les nodules de pois et de lupin contiennent à la fois le symbiote fixateur d'azote et des organismes associatifs tels que Micromonospora (Amaresan et al.,2022).

1.2.2. Importance du rhizobium

La fixation de l'azote est l'un des processus biologiques les plus importants sur Terre, se classant juste derrière la photosynthèse. Contrairement à cette dernière, la fonction de fixation biologique de l'azote (BNF) est limitée à un petit nombre de procaryotes. Bien que l'azote constitue environ 78 % de l'atmosphère, cet azote gazeux (N₂) est chimiquement inerte en raison de ses triples liaisons, et sa réduction est une procédure nécessite énormément

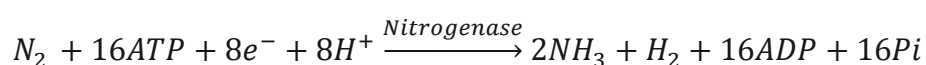
d'énergie. Par conséquent, l'azote est toujours le nutriment le plus limité dans le sol pour soutenir la croissance des plantes (**Wang et al.,2019**).

Parmi les trois processus naturels qui contribue à l'apport annuel d'azote sur la planète, la BNF a la grande proportion. Comme il fonctionne dans des conditions ne besoin pas d'haute température ni haute pression, il a attiré beaucoup d'attention au cours du dernier siècle. En général, la BNF peut être réalisée par des diazotrophes libres, par des bactéries diazotrophes symbiotiques et par des bactéries diazotrophes endophytes. La quantité globale de N fixé par les diazotrophes dans les systèmes agricoles et naturels est d'environ 122 Tg N par an, ce qui est comparable à l'échelle du cycle global du carbone (C). Le système de fixation de N₂ le plus efficace est l'association symbiotique entre légumineuses et rhizobiums : avec respectivement 2,95 Tg et 18,5 Tg de N fixé par an pour les légumineuses et les légumineuses oléagineuses. En raison de leur grande efficacité en BNF, les rhizobiums ont été largement étudiés pendant environ un siècle et demi.

Selon la littérature chinoise ancienne, l'augmentation de la fertilité des sols par la culture de légumineuses a été constatée il y a 2000 ans, et la rotation ou la culture intercalaire de légumineuses (soja, haricot vert, *Vigna angularis*) avec des cultures céréalières (blé, riz ou millet) était traditionnellement appliquée dans la pratique agricole pour améliorer la production céréalière, même si le mécanisme était inconnu. Plus récemment, il a été montré que les rhizobiums formaient non seulement une symbiose avec leurs légumineuses hôtes, mais pouvaient également être des endophytes pour améliorer la croissance et la productivité d'autres plantes par divers mécanismes, notamment la solubilisation de composés minéraux, la production de phytohormones, etc. Par conséquent, les rhizobiums sont l'une des bio-ressources les plus importantes et un bon modèle pour l'étude des interactions écologiques entre les bactéries, les plantes et les facteurs environnementaux (**Wang et al.,2019**).

I.2.3. Physiologie et Biochimie

Les rhizobia sont des bactéries aérobies mésophiles avec une température optimale autour de 28 °C, avec des gammes de pH, de salinité, de source de carbone et d'azote variait selon les espèces, voire les souches. Ils peuvent fixer l'azote au cours de la symbiose via l'activité du complexe nitrogénase. Ces enzymes effectuent la réduction de l'azote comme présenté dans la formule suivante :



D'après cette formule, on peut voir que la fixation biologique de l'azote consomme une grande quantité d'ATP et que l'hydrogène est un sous-produit caractéristique de cette

procédure. Chez certaines souches de rhizobium, l'hydrogène produit lors de la fixation de l'azote peut être recyclé par l'hydrogénase (**Wang et al.,2019**).

I.2.4. Biogéographie

Les Rhizobia ont été isolés de leurs hôtes légumineuses dans des environnements différents. Certains rhizobia provoquent des nodulations sur les racines des légumineuses cultivées dans des sols acides avec un pH de 4,5 ou dans des sols salins-alcalins avec un pH de 9,0. Certains d'entre eux forment des nodules racinaires/tiges avec des légumineuses aquatiques, comme *Sesbania*), *Neptunia natans* et *Aeschynomene*. Ils sont aussi associés aux légumineuses cultivées dans des sols fortement contaminés par des métaux lourds. Correspondant à leur large répartition géographique, les souches de rhizobia présentent des résistances variées aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux autres produits chimiques toxiques, aussi, ils peuvent utiliser des différentes sources de carbone et d'azote. Certains d'entre eux peuvent se développer par respiration nitrrique dans des conditions anoxiques, comme *Neorhizobium huautlense* (**Wang et al.,2019**).

I.2.5. Cycle de vie

Malgré les différences taxonomiques, le cycle de vie de toutes les espèces de rhizobium comprend ces 03 états : saprophyte (dans le sol), symbiotique (dans le nodule d'hôte légumineuse) et endophyte (dans les racines et les tiges de plantes autres que son hôte). De nombreuses données ont révélé que des bactéries symbiotiques peuvent également vivre à l'intérieur des tissus de plantes autres que leurs hôtes, par exemple *R. leguminosarum* dans le riz, *R. etli* dans le maïs, *R. endophyticum* dans le riz sauvage, et plusieurs espèces de rhizobia dans les tissus du tabac (**Wang et al.,2019**).

I.3. Production d'inoculant

I.3.1. Introduction

L'agriculture moderne fait face à de nombreux défis. La population mondiale en constante augmentation force les agriculteurs à rendre leurs terres de plus en plus productives. À l'heure actuelle, la productivité élevée de l'agriculture intensive est grandement dépendante des intrants chimiques, et ce dernier est souvent couteuse et a des effets secondaires .et cela incité à produire des inoculant à base des rhizobiums (**Jochems-Tanguay, 2014**).

Les inoculant de rhizobium sont la clé de la fixation biologique d'azote. Il transporte le rhizobium vers la légumineuse, Ce dernier doit être ajoute avec précision un nombre approprie de rhizobium pour assurer la formation d'un plus grand nombre des nodules et favoriser le rendement des légumineuses (**beedou ,2020**).

I.3.2. Les types d'inoculant

I.3.2.1. Inoculant d'agar

C'est la première forme d'inoculant commercial qui a été utilisée. Il s'applique directement sur la semence. Cette méthode a été facilement utilisée et à effectuer une inoculation complète. Cette méthode s'est avérée facile et réussie que, avec des modifications, elle a été utilisée pour toutes les inoculations de plantes légumineuses. Cependant, la phase de séchage qui suit immédiatement l'application sur les semences augmente le taux de mortalité (Beedou, 2020).

I.3.2.2 Inoculant à base de sol

Cette formule est très utilisée sur la marche mondiale .et le principal inoculant de base était la tourbe .il y a des autres sources d'inoculant a base du sol comme la bagasse, le composte de liège, la perlite...etc. (Beedou, 2020).

Les propriétés physiques et chimiques appropriées de la tourbe pour l'inoculant a une capacité de rétention d'eau élevée, non toxique pour le rhizobium, facile à stériliser par l'autoclavage ou l'irradiation gamma, disponibles volontairement et à moindre coût, offrent une bonne adhérence à la semence, capacité de tamponnage du pH et échange de cations et/ou d'anions capacité. À des fins rentables, un stockage sûr de 6 mois peut être protégé contre l'inoculant à base de tourbe. Cependant, la production d'inoculant à base de tourbe est complexe et nécessite de nombreuses étapes (Beedou, 2020).

I.3.2.3. Inoculant liquide

Généralement ils sont des cultures microbiennes ou suspensions modifiées avec des substances qui peuvent faire progresser la capacité d'adhérence, d'entretien et de surfactant et de dispersion. Les préparations liquides permettent au producteur d'inclure suffisamment de nutriments, protecteurs cellulaires et inducteurs responsables de la formation de cellules/spores/kystes pour progresser performance (Beedou, 2020).

Les inoculant liquides contiennent une concentration de 2×10^9 cellules/ml.

Des additifs peuvent être ajoutés comme le glucose, le glycérol, tréhalose, Fe EDTA et gomme arabique .et on peut aussi ajouter plus polymères aux bouillons de cultures, ces polymères protéger les cellules bactériennes au stress et les aider à distribution à hôte (Beedou, 2020).

Ces milieux sont faciles à manipuler et peut être utilisé directement sur les graines ou pour une distribution directement dans des semences.

Par ailleurs les fabricants ont surmonté le problème de détérioration en concentrant l'inoculant de bouillon par centrifugation, en le plaçant dans des récipients en plastique, en le

congelant et en le transportant jusqu'à l'utilisateur à l'état congelé emballé dans de la neige carbonique. De même la durée de conservation limitée dans certains cas, les conditions froides sont nécessaires pour un stockage à long terme, et les coûts et limites accrus pour les pays développés **(Beedou, 2020)**.

I.3.2.4. Inoculant de polymères

Les formulations synthétiques de polymères ont été continuellement évaluées depuis des décennies, ils offrent plus d'avantages que la tourbe. Ceux-ci incluent plus longtemps durée de conservation, bonne persistance au champ de destination, densité cellulaire nécessaire, facilité de travail et mieux adapté en général. Pour l'agriculture et l'environnement, ces polymères comprennent, jusqu'à présent, l'alginate, l'agar, la pectine, le chitosane et polymères exclusifs **(Beedou, 2020)**.

Les bactéries sont mélangées avec un composé gélifiant (adjuvant) dans une solution de polymère. La solution de polymère était composée d'additifs tels que le son, la tourbe, le charbon de bois, de l'argile et d'autres qui goutte à goutte dans une solution de sel de calcium pour solidifier et former le gel pellets. Dans le sol, il est lentement décomposé par les micro-organismes **(Beedou, 2020)**.

Ces polymères sont non toxiques et sans conservateurs nocifs affectant les bactéries. Fournissent une protection physique aux bactéries inoculées contre les concurrents du sol et de nombreux stress environnementaux, Ils contiennent l'eau nécessaire à la vie des bactéries, ce qui assure le transfert des bactéries du polymère vers le sol. Ils peuvent être conservés longtemps à température ambiante.

Cependant, le taux de perte augmenté après le séchage Le séchage du rhizobium emprisonné dans du polyacrylamide semblait nocif puisque la nodulation et l'azote total des parties aériennes étaient nettement diminués lorsqu'ils étaient séchés **(Beedou, 2020)**.

I.3.2.5. Inoculant lyophilisé

La lyophilisation a été utilisée pour capturer les bactéries à des fins agricoles et environnementales. Les cultures lyophilisées pourraient fournir une bonne nodulation sur le terrain. Le problème de ce type d'inoculant, est qu'il est limité à la disponibilité de conditions favorables, puisque la survie de rhizobium lyophilisé sur les graines est faible **(Beedou, 2020)**.

I.3.3. Les techniques d'inoculation

Il existe deux principales techniques d'inoculation des légumineuses avec des rhizobiums :

- Rhizobium inoculé à la surface de la graine.
- Inoculation du sol.

Chaque technique a un bon et un mauvais côté, et cela est dû aux besoins spécifiques d'inoculation, le type de semence, les pesticides dans la semence et la quantité d'inoculant.

En cas d'inoculation trouver dans des conditions défavorables que telles que le contact à haute température d'un air semoir, à séchage rapide lorsque l'inoculant est pulvérisé dans le semoir, lorsque les graines inoculées sont semées dans des environnements chauds et secs, ou lorsque les graines sont enrobées de fongicides et herbicides, les inoculations doivent être traitées (**Beedou, 2020**).

I.3.3.1. Inoculation des semences

L'inoculation des grains est l'inoculation universelle la plus appliquée grâce à sa facilité à utiliser sur les terrains et nécessite une quantité relativement faible d'inoculant. L'inoculum peut être mélangé directement à la semence après adjonction d'un adhésif et d'une faible quantité d'eau, ou en ajoutant de grandes quantités d'eau pour former une bouillie (**Beedou, 2020**).

I.3.3.2 L'inoculation de sol

Cette technique est largement utilisée pour appliquer une bactérie sur le sol du champ. Même bien que les normes pour les rhizobiums soient généralement utilisées avec les mêmes UFC·ha⁻¹ que pour l'inoculation aux graines. L'application de grandes quantités par inoculation du sol enlève plusieurs contraintes (**Beedou, 2020**).

Le traitement par voie sèche est la méthode la plus répandue en raison de sa simplicité, mais malheureusement, c'est également la moins satisfaisante en termes d'adhésion du produit à la semence. On utilise également des semences pré-inoculées pour introduire certaines espèces de rhizobia dans des cultures (**Ben Rebah, 2001**).

Ce type d'inoculation est recommandé dans les conditions suivantes :

- Lorsque les graines de légumineuses sont enrobées de produits chimiques toxiques pour la protection contre les champignons, les insectes ou d'autres ravageurs du sol et les rhizobiums appliqués sur les graines seraient tués.
- Lorsque la plantation dans des sols chauds et secs est inévitable. Placer les rhizobiums dans un sol humide sous les graines peut entraîner une bonne survie et une modulation efficace.

- Lorsque les sols sont fortement infestés par de grandes populations de souches infectieuses non fixatrices d'azote. Les inoculant du sol peuvent introduire un plus grand inoculum de rhizobium efficace que celui qui peut être appliqué directement sur la semence (NifTAL et *al.*, 1984).

I.3.4. Production d'inoculant

La production d'inoculant implique le choix et le traitement du support, le maintien et la croissance de la culture à des échelles de production croissantes, et un produit final de bonne qualité, avec un rapport bénéfice/coût rentable.

La haute qualité de la production d'inoculant comprenait trois facteurs principaux à libérer dans un bon produit. Il y a la qualité et le traitement du support, la pureté et l'efficacité de la nodulation et de la fixation de N₂ de la culture, et l'obtention d'une cellule adéquate nombres dans le bouillon de culture et le produit fini. Cependant, pour obtenir une bonne qualité d'inoculant, quatre étapes importantes de la production d'inoculant doivent être considérées (Beedou, 2020) :

- Sélection de la souche
- Production des cultures
- Transport
- Durée de conservation pour l'inoculation

Chapitre II

Materiel Et Methodes

II.1. Collecte des nodules

Les nodules utilisés dans ce travail sont isolés à partir de deux espèces de légumineuses ; la *Sesbania acuelata* au mois de janvier au niveau de agrosystèmes de Hassi Ben Abdellah et le *Melilotus indica* au mois de mars dans l'exploitation agricole du département d'agronomie de l'université d'Ouargla.

Au moment de choix de plantes sur le terrain, en vise des légumineuses saines au stade de floraison. En fait creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm en profondeur pour extraire la motte contenant la plante et son appareil racinaire (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**).

Les nodules sont rincés soigneusement avec l'eau du robinet pour éliminer le sol. Les nodules qui sont de couleur rosâtre (indiquant la présence de léghémoglobine) sont détachés des racines en coupant ces dernières à 0.5 cm des deux côtés du nodule (**Vincent, 1970 ; Amaresan et al., 2022**).

II.2. Conservation des nodules

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C jusqu'à 48 heures. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de Calcium (CaCl_2) (**Figure 1**) (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**).

Lors de l'isolement, les nodules conservés par dessiccation sont imbibés dans un tube à essai contenant l'eau distille stérile pendant une nuit à 4°C (**Senthilkumar et al.,2021**).

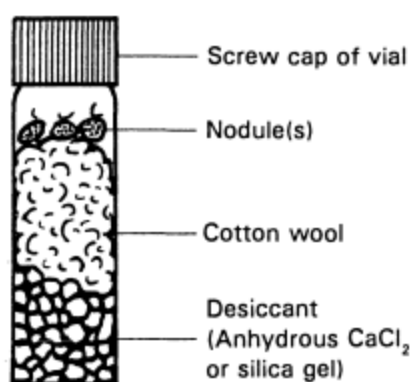


Figure 1: Conservation des nodules dans des tubes
(Somasegaran et Hoben, 1994)

II.3. Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est effectué dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire. Les nodules sont désinfectés superficiellement, en les immergeant pendant 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95%. Puis les transférer à 3% de solution d'hypochlorite de sodium et laisser tremper pendant 2 à 4 min. Les nodules sont ensuite rincés dans 5-10 changements d'eau distillé stérile (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

On Utilise des boîtes de Pétri stériles en plastique comme récipients pour l'alcool, l'hypochlorite de sodium et l'eau distillé stérile. À l'aide d'une pince stérile, Les nodules désinfectés superficiellement sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. Avec une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le broyat est étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) (**Vincent, 1970**) (voire composition en annexe). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans ou par épuisement de manière à avoir des colonies isolées et faciles à caractériser (**AZIB, 2020**).

Le lettre S est donné pour les souches de rhizobia isolé de la plante de *Sesbania acuelata*, tandis que celles isolés de *Melilotus indica* sont marqué par un M, en plus d'un chiffre qui représente le nombre de plante. Par exemple, le S3 désigne la souche de rhizobia isolée de la troisième plante de l'espèce *Sesbania acuelata*.

Les différentes boites ont été incubées trois jours à 28°C pour l'obtention de colonies isolées. Pour chaque échantillon, une seule colonie représentative a été prélevée parmi des colonies morphologiquement similaires et ensuite striée plusieurs fois sur le milieu YMA afin de les purifier (**AZIB, 2020**).

II.4. Culture sur YMA + Rouge Congo

Les colonies typiques de rhizobium sont repiquées sur des boites de Pétri contenant du YMA-RC (annexe). Ces derniers sont incubés à 28°C pendant 03 jours.

Ce test permet de différencier les rhizobia des contaminants (**Tak et al.,2020**), après une observation quotidienne, les colonies typiques aux rhizobia absorbent faiblement ou pas le rouge Congo lorsqu'elles sont incubées dans l'obscurité (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

II.5. Culture sur YMA+ bleu de bromothymol

En réalisant les mêmes étapes de dernier test, des colonies typiques de rhizobium sont ensemencées sur des boites de Pétri contenant du YMA- BBT (**annexe 1**). Les boites sont incubées trois jours à 28°C.

Une observation quotidienne est nécessaire pour marquer le virage de couleur de milieu. Une couleur bleue, indiquant une réaction alcaline sur BTB, doit être obtenue par les rhizobiums à croissance lente. Cependant, une couleur jaune (acide) généralement produite par celle à croissance rapide (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

II.6. Culture sur YMB

Chaque souche de rhizobium isolée préalablement est inoculée dans un tube contenant le YMB, ils sont incubés dans un incubateur agitateur pendant trois jours à 28°C. après le 72h, la densité optique a été mesurée dans chaque tube pour déterminer les souches à une meilleure croissance afin de l'utiliser à la production d'inoculant.

II.7. La densité optique (D.O)

Il s'agit d'une mesure de turbidité dans un milieu liquide en utilisant un spectrophotomètre. Un volume de 1000 µl de cultures d'YMB déjà préparées est rempli dans une cuve puis placée dans un spectrophotomètre réglé à 600 nm. Des lectures de 0 -1.0 sont affichées sur l'appareil correspondent au nombre de cellules (**Figure 2**) (**Amin et al.,2022**).



Figure 2: Mesure de la D.O des cultures sur YMB (Photo originale)

II.8. Conservation des souches

Les isolats obtenus sont ensemencés dans des tubes inclinés contenant le milieu YMA tamponné avec du CaCO_3 (3g/L) (**Vincent, 1970**), incubée à 28°C pendant 3 jours, transformée par la suite au réfrigérateur (**Menelih et al.,2022**). Cette technique nous assure une conservation de 6 à 12 mois à 4° C. Il est nécessaire de marquer les tubes avec le nom de plante, date et lieu de collecte, et la date de conservation (**Figure 3**).



Figure 3: conservation des isolats du rhizobium (Photo originale)

II.9. Echantillonnage d'eau d'élevage

Notre étude porte sur l'eau d'élevage des poissons des bassins. L'échantillon d'eau utilisé dans ce travail a été prélevé de bassin d'élevage (4) de la serre piscicole située à l'exploitation agricole de l'université KASDI Merbah Ouargla. (**Figure 4**).

Ce bassin a été occupé par le poisson Tilapia rouge lors de l'échantillonnage dans le mois de mars.



Figure 4: la serre piscicole et le bassin d'élevage (04) (Photo originale)

II.10. Caractérisation d'eau d'élevage

L'eau d'élevage est une eau usée qui renferment une grande variété de polluants en suspension, sous forme de colloïdes ou dissous. Les polluants organiques sont des protéines, des hydrates de carbone et des acides gras. Les polluants d'origine inorganique renferment les chlorures, les sels minéraux (calcium, magnésium et de potassium), le phosphore l'azote et le soufre. Les polluants d'origine biologique sont les micro-organismes. L'élimination de ces polluants est réalisée à l'aide de procédés physiques, chimiques et biologiques.

Donc, Avant d'utiliser l'eau délavage comme milieu de culture, il faut d'abord étudier leur caractéristique ainsi que le prétraité.

Les paramètres d'eau d'élevage testés étaient limités aux conductivités électriques et le pH. Ces derniers ont été mesurer au niveau de laboratoire par la méthode électrométrique (pH mètre) conductimètre.

II.11. Le prétraitement d'eau d'élevage

Pour utiliser l'eau d'élevage de poisson comme un milieu de culture, il doit subir un prétraitement thermique afin de la stériliser.

Notre échantillon d'eau a été répartie dans des flacons de 200 ml fermés hermétiquement, ces derniers ont été placée dans un autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°C. Cette étape a été répété trois fois afin de garantir leur stérilisation. Puis maintenus dans un réfrigérateur réglé à 4°C (**Figure 5**).

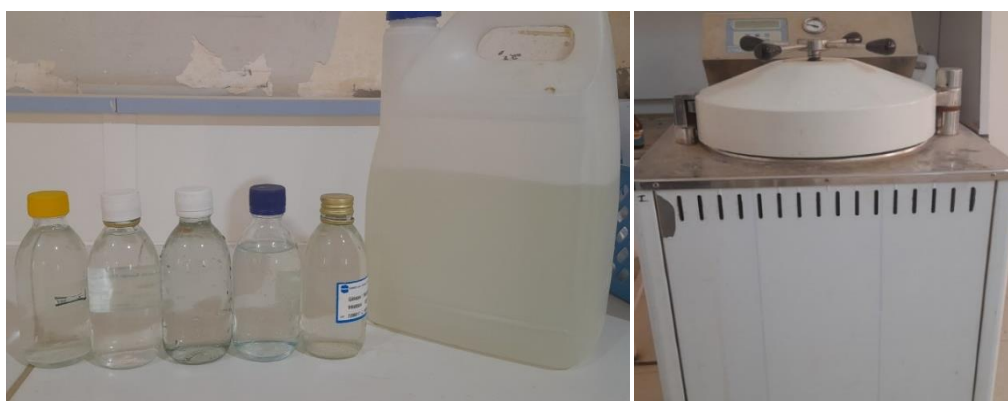


Figure 5: Les différents dilutions d'eau d'élevage (Photo originale)

II.12. Production d'inoculant

L'eau d'élevage de poisson prétraité est prête pour tester leur capacité à être utiliser comme un milieu de culture pour la production d'inoculant à base de rhizobium. Différents essais effectués sur l'eau d'élevage :

II.12.1. Eau d'élevage pure

Les 3 isolats qui en marqués la meilleure croissance dans le YMB après la mesure de la D.O, il s'agit de S3, M1 et M3. Ils sont inoculés dans des tubes contenant 10ml d'eau d'élevage stérile (chaque souche a été inoculé dans 3 tubes différents). Ces tubes sont placés dans un incubateur agitateur réglé à 28°C /150 rpm pendant 3 jours. Au bout de trois jours, la densité optique est mesurée.

II.12.2. Eau d'élevage dilué

Afin de réduire la salinité élevée d'eau d'élevage qui peut inhiber la croissance des souches de rhizobium, 04 types de dilution ont été effectués sur ce eau, Il s'agit de 25%, 50%, 75%, 100% (**Figure 6**). Le système de dilution il a été réalisé comme suit :

- Flacon à 25% = 25 ml d'eau d'élevage + 75 ml d'eau distillé.
- Flacon à 50% = 50 ml d'eau d'élevage + 50 ml d'eau distillé.
- Flacon à 75% = 75 ml d'eau d'élevage + 25ml d'eau distillé.
- Flacon à 100% = 100ml d'eau d'élevage.



Figure 6: Les différentes dilutions d'eau d'élevage (Photo originale)

II.12.3. Eau d'élevage dilué avec les additifs

La dilution peut réduire la salinité d'eau d'élevage à une valeur supportable par le rhizobium, ainsi que la réduction des autres éléments nutritifs. Dans les essais suivants, des quantités de quelques éléments nutritifs sont additionnées aux dilutions d'eau d'élevage afin de rattraper celles perdues. Ces additifs sont nécessaires à la croissance des souches de rhizobium, il s'agit du mannitol, extrait de levure et de tryptone.

Des dilutions de 25%, 50%, 75% et 100% comme les précédentes ont été préparées. Cette fois, des additifs à des quantités définies ont été ajoutés (voir le *Tableau 1*). Les différents flacons ont été transférés à l'autoclave afin de les stériliser avant d'être inoculés par les souches.

Après l'inoculation de flacons par le rhizobium, elles sont placées dans un incubateur agitateur (28°C/150rpm) pendant 3 jours, la D.O dans les flacons a été mesurée après la 72h. (**Figure 7**).



Figure 7: les dilutions d'eau d'élevage avec des additifs (Photo originale)

Tableau 1: les dilutions et les additifs.

	Les dilutions			
	25%	50%	75%	100%
Les additifs (g)	Aucune additifs			
	Mannitol (1g)			
	Extrais de levure (1g)			
	Extrais de levure (1g) + Mannitol (1g)			
	Tryptone (1g)			
	Extrais de levure (1g) + Tryptone (1g)			

II.13. Test de viabilité des souches

Après la mesure de la densité, on teste la viabilité de rhizobium S3 introduites, en ensemençant les cultures des flacons sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 jours.

Chapitre III

Resultat Et Discussion

III.1. Caractérisation physico-chimique

Les valeurs de pH et de conductivité (l'augmentation de la conductivité électrique indique une richesse en sels dissous dans l'eau d'élevage) ont été mesurées à une température de 24°C.

Tableau 2: les valeurs des paramètres d'eau d'élevage de poissons.

	pH	CE (mS)
Eau d'élevage de poisson	7,9	6,79

Selon les échelles de pH citées par USSL (1954) et Aubert (1978), les valeurs obtenues montrent que l'eau d'élevage de poisson présentait des valeurs indiquant une eau extrêmement salée et légèrement alcaline. Une étude de (Baouia et Guemmouli., 2019) qui traite la qualité physico-chimique des eaux d'élevage de mêmes bassins de la ferme aquacole expérimentale de l'université de Ouargla, ont montré des valeurs de pH alcalines comprises entre $7,13 \pm 0,10$ et $7,85 \pm 0,02$. Ces valeurs sont légèrement élevées par rapport à ceux présentés au milieu synthétique pour le rhizobium (YEM), mais tout en étant dans la gamme de résistance de souches de rhizobiums (AZIB, 2020).

III.2. Caractéristiques morphologiques de croissance des isolats

III.2. 1. Culture sur YMA

D'après les 06 isolats, 04 isolats forment après 72h d'incubation, des colonies bien visible sur le milieu YMA. Les colonies formées sont de couleur blanchâtre et translucide, d'un diamètre variable (1 à 3 mm), d'une forme circulaire, convexe d'un contour régulier et d'une surface lisse. Ces caractères sont en accord avec celles déjà faites pour les rhizobia dans la littérature (Vincent, 1970 ; Amin et al.,2022). Les isolats de *Sesbania acuelata* ont formé des colonies plus muqueuses que celles des *Melilotus indica* (Figure 8).

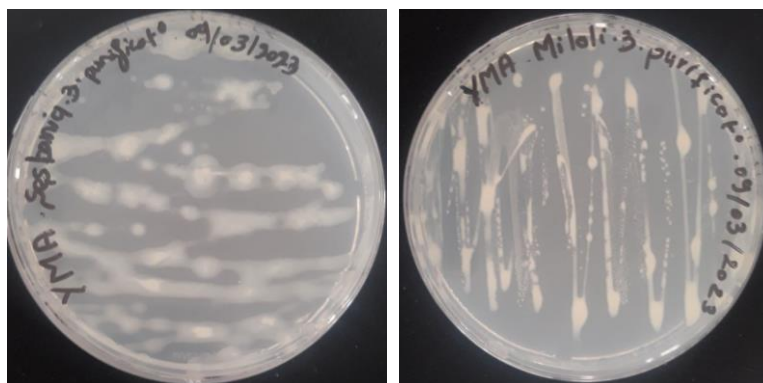


Figure 8: Aspect des colonies sur milieu YMA (Photo originale)

III.2.2. Culture sur YMA-RC

Après 24h d'incubation, les colonies de rhizobiums apparaissaient blanches à rose très pâle, convexe, brillant avec des marges régulières. Ce qui signifié leur non absorbance au le Rouge Congo (**Figure 9**). Ces résultats vont avec ceux de **Odori et al. (2020)**.

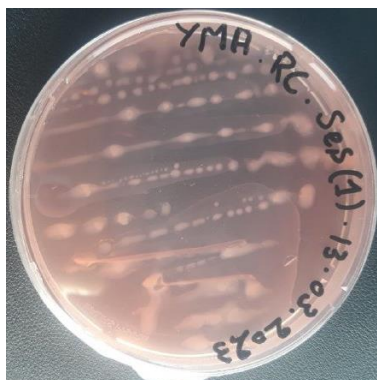


Figure 9: Aspect des colonies sur YMA-RC (Photo originale)

III.2.3. Culture sur YMA-BBT

Les colonies sur le YMA-BBT ont acidifié le milieu après 24h d'incubation pour les bactéries isolées à partir de la luzerne (**Figure 10**) et après 48h pour celle isolées à partir de la sesbania. Le virage de la couleur du milieu vers le jaune signifie leur capacité à produire des acides, ce qui signifie que ces des rhizobiums à croissance rapide (sinorhizobium) (**Menelih et al.,2022**)

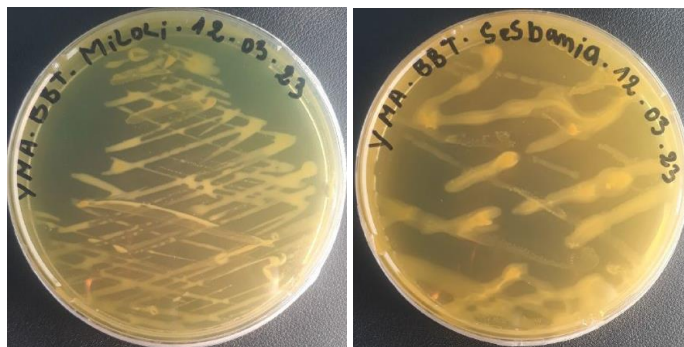


Figure 10: Aspect des colonies sur YMA-BBT (Photo originale)

III.3. La densité optique de cultures sur YMB

Après 72h d'incubation les souches de rhizobium ont montré des valeurs de D.O différentes. La souche S3 a marqué la meilleure valeur de D.O (0.965), ce qui peut la qualifiée pour la production d'inoculant.

Tableau 3: la densité optique des souches du rhizobium.

Souches	Tube (1)	Tube (2)	Tube (3)	la Moyenne
S3	0.208	0.222	0.229	0.222
M3	0.224	0.219	0.232	0.225
M1	0.208	0.213	0.203	0.208

III.4. Production d'inoculant

Pour les cultures S3, M1 et M3 en eau d'élevage sans dilution, sans additifs, elles sont présentées les valeurs présentées dans (**Tableau 4**), dont la meilleure valeur de D.O (0.232) a été marquée par la souche M3.

Tableau 4: la D.O des cultures sur eau d'élevage pure.

Souches	Tube (1)	Tube (2)	Tube (3)	la moyenne
S3	0.208	0.222	0.229	0.222
M3	0.224	0.219	0.232	0.225
M1	0.208	0.213	0.203	0.208

La croissance de rhizobium dans l'eau d'élevage soumis à différents niveaux de dilution, et avec ou sans amendement par des nutriments (mannitol, extraits de levure, tryptone), a été étudiée (par mesure de la densité optique à 600 nm après 72h d'incubation). Les résultats ont été résumés dans (**Tableau 5**) et les figures (**Figure 11**, **Figure 12**, **Figure 13**, **Figure 14**,

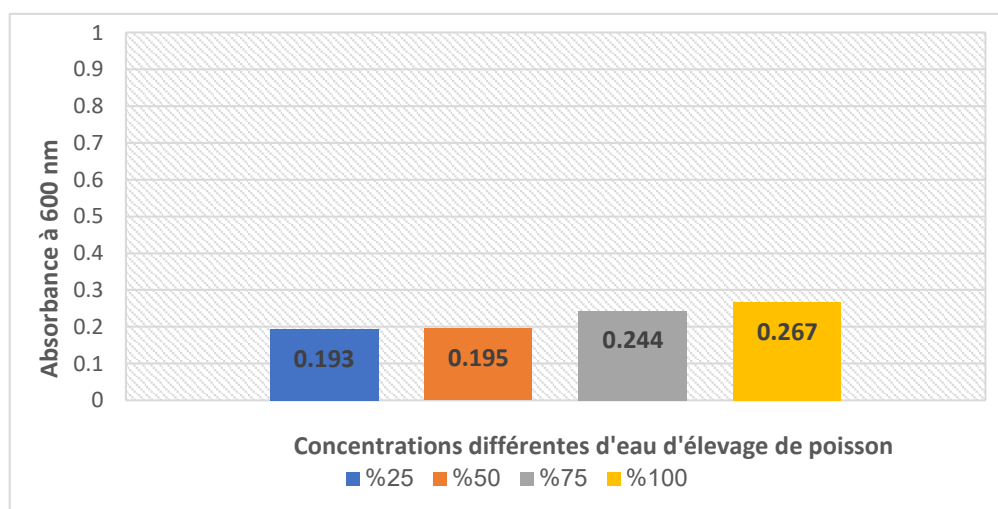
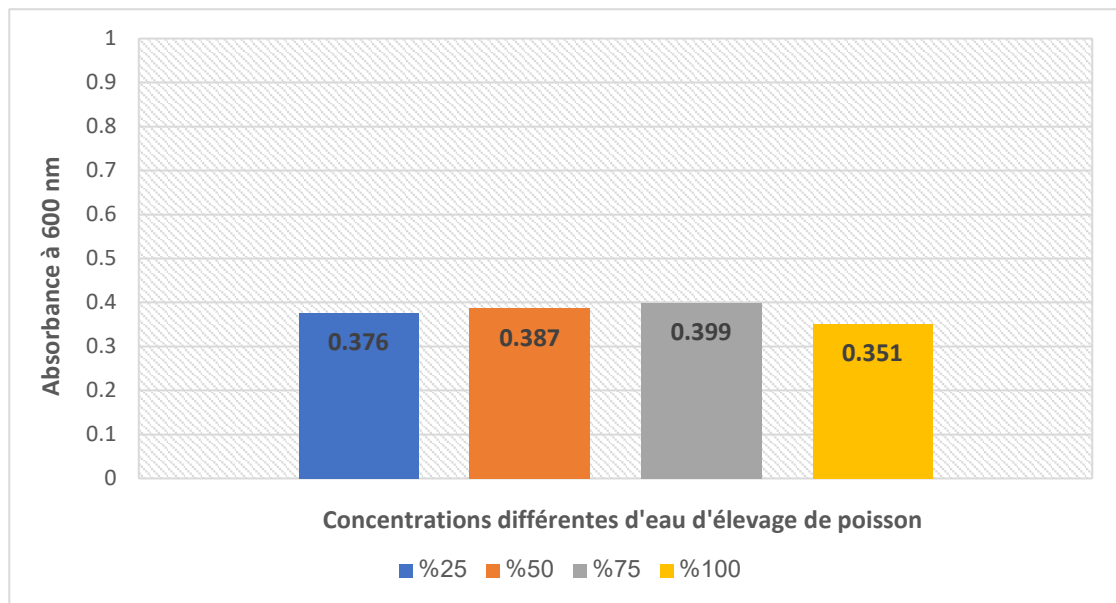


Figure 11: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson (aucun additif).

Figure 15 et Figure 16) :

Dans l'eau d'élevage de poisson (aucun additif), valeurs de la D.O maximales obtenues a



été à 100% (0.267) après 72h d'incubation (Figure 11).

Figure 12: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec mannitol.

Dans l'eau d'élevage de poisson (avec 1g de mannitol), valeurs de la D.O maximales obtenues a été à 75% (0.399) après 72h d'incubation (Figure 12).

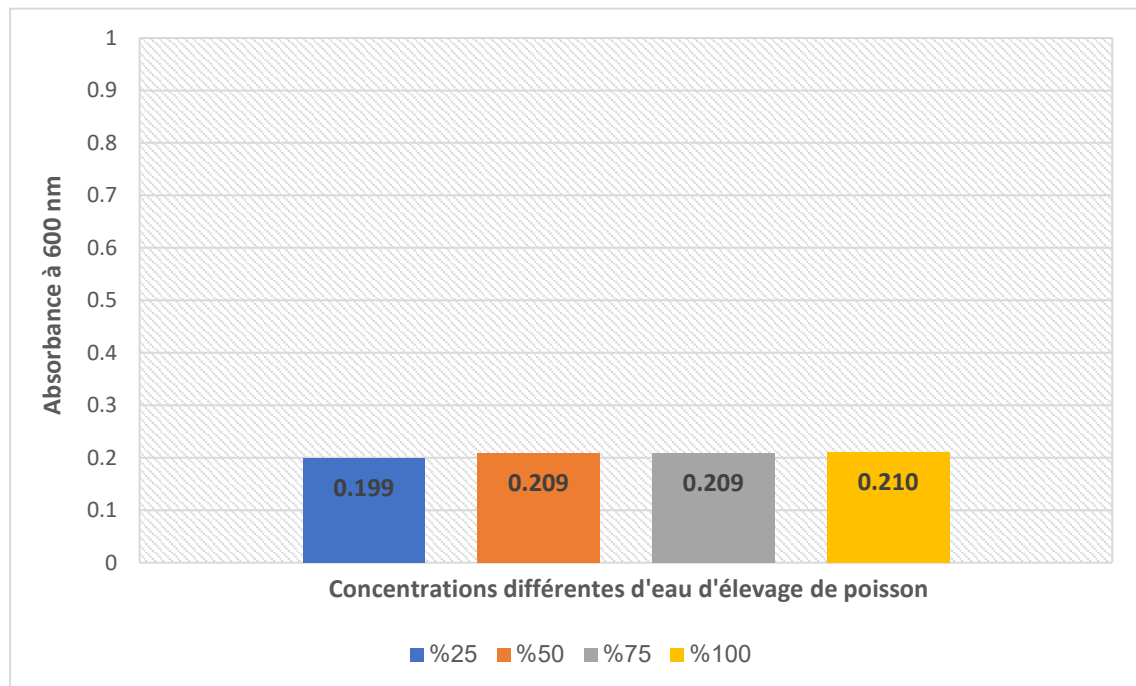


Figure 13: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec extraits de levure

Dans l'eau d'élevage de poisson (avec 1g de extrais de levure), valeurs de la D.O maximales obtenues a été à 100% (0.210) après 72h d'incubation (**Figure 13**).

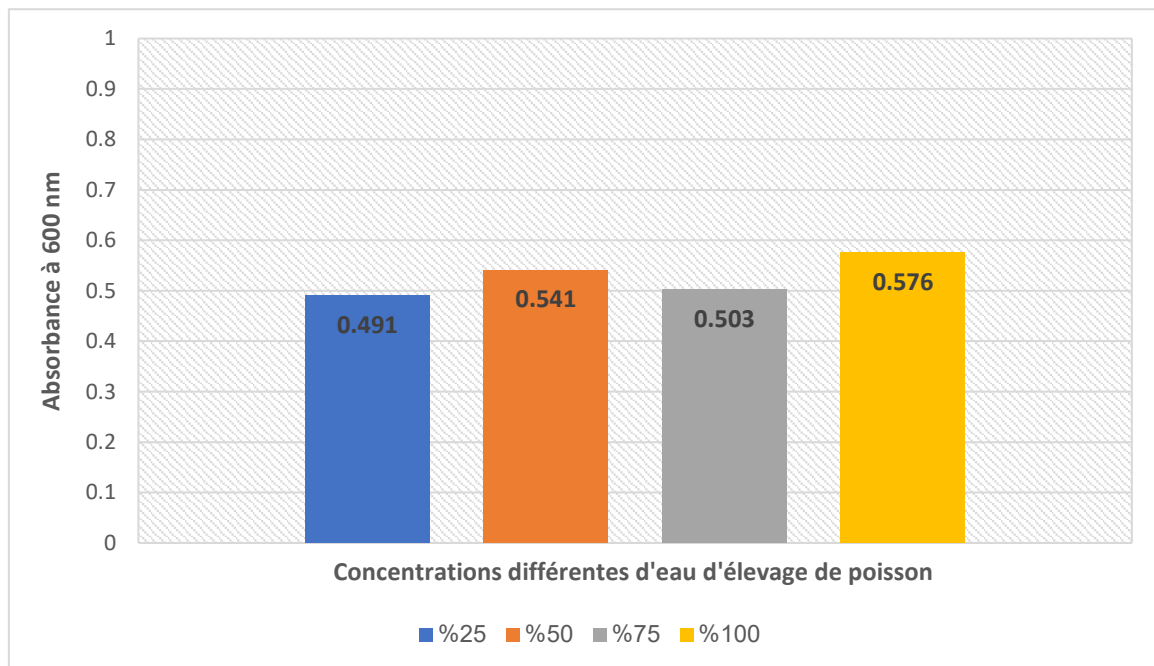


Figure 14: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec extrais de levure et mannitol.

Dans l'eau d'élevage de poisson (avec 1g de mannitol et 1g d'extrais de levure), valeurs de la D.O maximales obtenues a été à 100% (0.576) après 72h d'incubation (**Figure 14**).

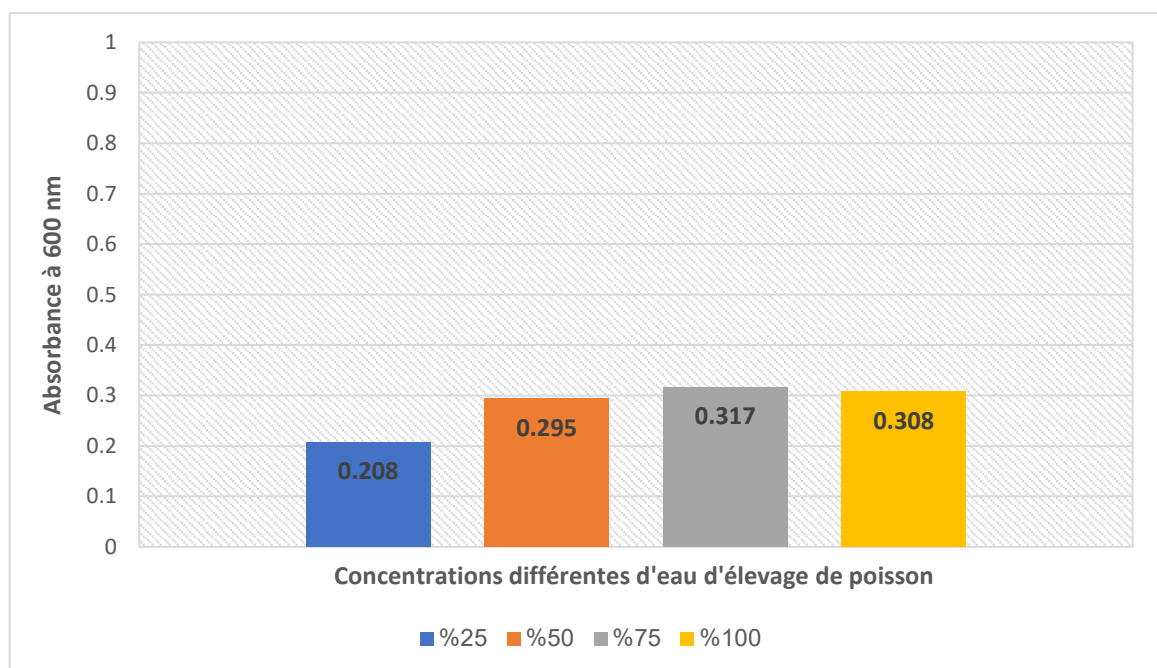


Figure 15: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec tryptone.

Dans l'eau d'élevage de poisson (avec 1g de tryptone), valeurs de la D.O maximales obtenues a été à 75% (0.317) après 72h d'incubation (**Figure 15**).

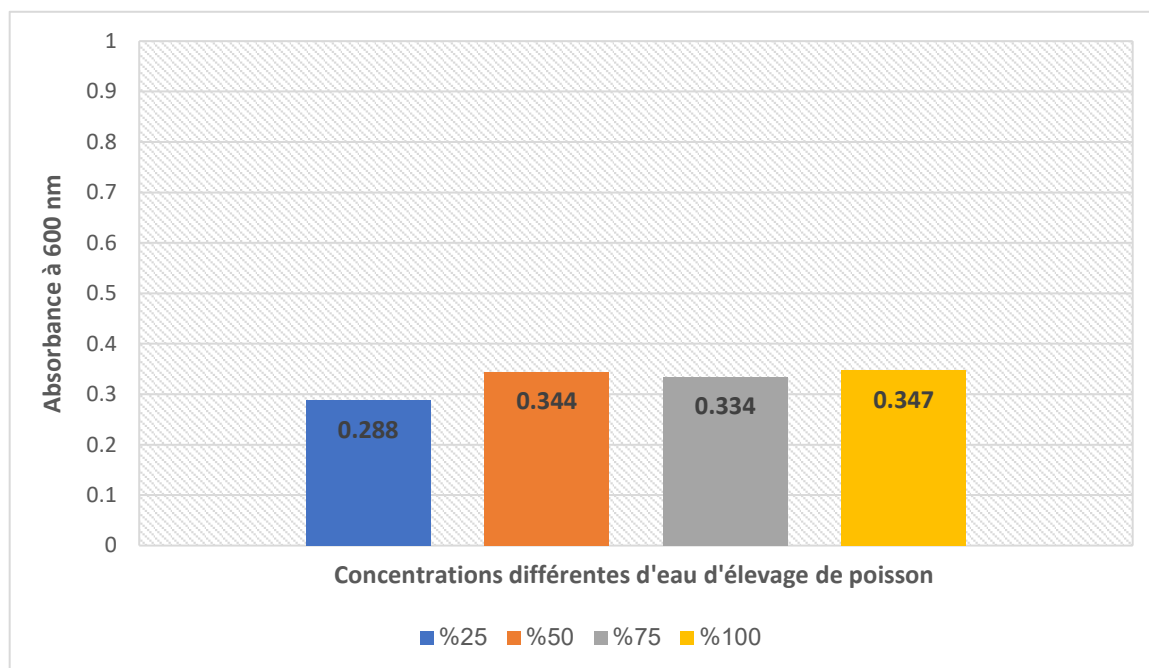


Figure 16: Croissance de Rhizobium sur différentes concentrations d'eau d'élevage de poisson avec Extraits de levure et Tryptone.

Dans l'eau d'élevage de poisson (avec 1g de tryptone et 1g d'extraits de levure), valeurs de la D.O maximales obtenues a été à 100% (0.347) après 72h d'incubation (Figure 16).

Tableau 5: la D.O des cultures sur eau d'élevage dilué et/ou modifié.

Les additifs (1g)	Les dilutions			
	25%	50%	75%	100%
/	0,193	0,195	0,244	0,267
Mannitol	0,376	0,387	0,399	0,351
Extraits de levure	0,199	0,209	0,212	0,210
Extraits de levure + Mannitol	0.491	0.541	0.503	0.576
Tryptone	0.208	0.295	0.317	0.308
Extraits de levure + Tryptone	0.288	0.344	0.334	0.347

La croissance et le développement des rhizobium ont été grandement améliorés lors de la dilution de l'eau d'élevage de poisson, également lors de l'amendement en nutriments. Ceci est très probablement dû à la présence de certains produits inhibiteurs dans les déchets, car

leurs concentrations ont été réduites à des niveaux acceptables (non inhibiteurs) lors de la dilution (Ali, 2005).

III.5. La viabilité des souches

Les résultats de test de viabilité des souches ensemencées dans des différents flacons préparés ont indiqué des résultats positifs sur le milieu YMA après 03 jours d'incubation (Figure 17).



Figure 17: viabilités des souches sur YMA (Photo originale)

Discussion

La présente étude a abouti à l'isolement d'isolats bactériens nodulant les racines de *Sesbania acuelata* et le *Melilotus indica* qui ont été collectés à l'agrosystèmes de Hassi Ben Abdellah et à l'exploitation agricole du département d'agronomie de l'université d'Ouargla, respectivement. Six souches microbiennes ont été récupérées dans des nodules racinaires de ces deux plantes, dont quatre ont présentés les caractéristiques microscopiques générales des isolats de rhizobium (colonies blanchâtre et translucide, d'un diamètre variable de 1 à 3 mm, d'une forme circulaire, convexe d'un contour régulier et d'une surface lisse) (Vincent, 1970 ; Amin et al., 2022).

Dans l'étude actuelle, l'eau d'élevage de poisson obtenu de bassin d'élevage de la serre piscicole située à l'exploitation agricole de l'université KASDI Merbah Ouargla, est utilisé comme milieu de culture pour les rhizobiums à croissance rapide. Les résultats de la caractérisation physico-chimique effectués sur l'échantillon d'eau d'élevage ont indiqué une eau extrêmement salée et légèrement alcaline (USSS, 1954) et (Aubert, 1978) (Baouia et Guemmouli., 2019). Ces valeurs sont légèrement élevées par rapport à ceux présentés au milieu synthétique pour le rhizobium (YEM), mais tout en étant dans la gamme de résistance de souches de rhizobiums (AZIB, 2020).

Chapitre III : Résultats Et Discussion

Les résultats de la production d'inoculant en utilisant l'eau d'élevage de poisson (aucun additif) comme milieu de culture ont été positif, dont la meilleure valeur de D.O était 0.232. Aussi, tous les échantillons d'eaux d'élevage de poisson ont favorisé la croissance de rhizobium (Sellami, 2015).

La croissance du rhizobium a été observée à différentes concentrations (25%, 50%, 75% et 100%) en enregistrant la densité optique (D.O) à 600 nm. Les résultats ont indiqué que l'eau d'élevage de poisson peuvent être utilisés avec succès comme substrat de croissance pour la production d'inoculum de rhizobium. Une croissance maximale de rhizobium a été observée dans des concentration entre (75-100%). Ces résultats sont en accord avec celles déjà faites par (Ashok, 2019), dont ils sont utilisés les déchets de l'industrie alimentaire (déchets de champignons et eaux usées à l'aneth) comme milieu de culture pour le Rhizobium.

Après dilution, la croissance de toutes les souches de rhizobia a été améliorée dans le milieu d'eau d'élevage de poisson, très probablement en raison d'une éventuelle dilution de certains produits inhibiteurs qui pourraient être présents. L'effet inhibiteur a été éliminé en diluant avec de l'eau et en rétablissant la valeur nutritionnelle d'eau d'élevage de poisson dilué en apportant des nutriments et certains facteurs de croissance (mannitol, extrais de levure, tryptone). Ces résultats sont en accord avec Muilenburg et al. (1994) qui ont découvert que la mélasse contenait certaines substances inhibitrices des cellules de Bradyrhizobium et que leur effet était nettement réduit par dilution.

Les résultats obtenus confirment l'adéquation d'eau d'élevage de poisson comme milieu de croissance pour une large gamme de rhizobiums à croissance rapide après dilution avec de l'eau uniquement (Ali, 2005).

L'amendement en nutriments (mannitol, extrais de levure et tryptone) fortement améliorés la croissance et le développement des rhizobiums. Après 72h d'incubation, la valeur de la D.O maximales obtenues a été à 100% (0.576) dans un milieu d'eau d'élevage de poisson avec 1g de mannitol et 1g d'extrais de levure. L'extrait de levure et le mannitol sont deux composants principaux des milieux standards pour la croissance du Rhizobium, donc un niveau de dilution entre (75-100%) d'eau d'élevage de poisson avec une concentration d'extrait de levure (1 g/l) et mannitol (1 g/l) ont été encore optimisées (Ashok, 2019). Les effets de sources supplémentaires de nutriments sur la croissance de *S. meliloti* ont été étudiés dans les boues secondaires de l'usine de traitement des eaux usées de Québec (Ben Rebah, 2001). Le lavage usé complété avec différentes concentrations d'extrait de levure et de

Chapitre III : Résultats Et Discussion

glycérol a augmenté le nombre maximal de cellules. L'augmentation la plus élevée était d'environ six fois et a été obtenue avec l'ajout de 4 g/L d'extrait de levure et de 7,5 g/L de glycérol.

Conclusion

CONCLUSION

Le présent travail de recherche a étudié la possibilité d'utiliser l'eau d'élevage de poissons comme milieu de culture, face au coût élevé des milieux synthétiques et les soucis de valorisation des eaux usées. Cette recherche est donc très intéressante car elle aborde des problèmes de dimensions écologiques et économiques ainsi que agronomiques.

Nous avons consacré la première partie de ce travail pour présenter des connaissances concernant les milieux de culture et leurs immenses rôles dans l'avancée de la microbiologie, les rhizobia et ses avantages pour l'agriculture, la production d'inoculant.

Ce travail nous a permis de tirer des résultats très intéressantes représentées en isolement des bactéries des rhizobia en milieu YMA au niveau de la région de Ouargla, il s'agit des isolats obtenus à partir des plantes de *Sesbania aculeata* et *Melilotus indica*. Après les cultures d'identifications en YMA-RC et YMA-BBT, on arrive à déduire que tous les isolats sont des rhizobiums à croissance rapide (*Sinorhizobium*).

A travers la simple caractérisation d'eau des bassins d'élevage au niveau de notre faculté, nous avons remarqué que salinité et la conductivité sont très élevée. Ces valeurs peuvent inhiber la croissance de rhizobia.

En fin, on arrive à démontrer que le rhizobium pousse et maintenir son pouvoir symbiotique dans l'eau d'élevage des poissons. Cela ouvre la porte vis-à-vis au développement d'une nouvelle technologie de production des inoculants à base de rhizobium (**biofertilisants**) par utilisation d'eau des bassins d'élevage comme milieu de culture et comme support pour les rhizobia. Ceci représente une nouvelle option de recyclage de ces eaux qui peut contribuer à réduire les coûts de production des inoculants liée à l'utilisation du milieu standard.

Les résultats obtenus à partir de ce travail ont révélé que les eaux utilisées dans l'élevage des poissons représentent un substrat pouvant être utilisé pour favoriser la croissance des rhizobia.

En règle générale, un traitement préalable de l'eau d'élevage a tendance à augmenter leur efficacité, ce qui entraîne par conséquent une amélioration de la croissance du rhizobium.

L'idée d'utiliser les eaux d'élevage de poissons comme milieu de culture est prometteuse, mais elle nécessite des recherches approfondies surtout ceux liés à la caractérisation de l'eau afin de mieux évaluer, optimiser les conditions de culture et minimiser les risques potentiels. Il serait judicieux de collaborer avec des experts en aquaculture, en microbiologie et en agriculture pour développer cette approche de manière efficace et responsable.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ali, S. M., Amin, G., Fayez, M., El-Tahan, M., Monib, M., et Hegazi, N. A. (2005). Production of rhizobia biofertilizers using baker's yeast effluent and their application to *Leucaena leucocephala*: (Produktion von Rhizobium-Biodüngern unter Verwendung von Backhefeabwasser und ihre Anwendung zu *Leucaena leucocephala*). Archives of Agronomy and Soil Science, 51(6), 605-617.
2. Amin, D., Ray, S., et Wagh, V. (2022). Mother Culture, Broth, and Peat Test. Practical Handbook on Agricultural Microbiology, 395-403.
3. Ashok, K., Gauri, S., et Gaurav, Y. (2019). Food industry waste material as a growth medium for rhizobium. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 9(2), 144-155.
4. Aubert, G. (1978). Méthodes d'analyses des sols. 2ème Edition, Centre Régional de Documentation Pédagogique, CRDP Marseille, 191p.
5. Aynalem, B., Temesgen, T., Bezie, Y., et Yohannis, S. W. (2018). Phenotypic characterization and symbiotic effectiveness test of chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizobia isolated from Dejen and Aneded Districts, East Gojjam Zone, Amahara Region, Ethiopia. African Journal of Biotechnology, 17(23), 730-738.
6. AZIB, S. (2020). La symbiose rhizobium-luzerne: étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien. Université Kasdi Merbah Ouargla.
7. Baouia, O., Guemmouli Z. (2019), Suivi et évaluation des rejets piscicoles des bassins aquacoles expérimentales de l'université Kasdi- Merbah Ouargla. Département des sciences biologiques, UKMO, 20-32.
8. Beedou, A. (2020). The innovative technology to produce liquid and solid inoculant of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree University of Technology.
9. Ben Rebah, F. (2001). Utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculants à base de *Rhizobium*: Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).
10. Bissonnette, N., Lalande, R., et Bordeleau, L. (1986). Large-scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. Applied and environmental microbiology, 52(4), 838-841.
11. Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., et Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New microbes and new infections, 34, 1-2.
12. Burton, J. C. (1979). *Rhizobium* species Microbial technology (pp. 29-58): Elsevier.
13. Desai, S., et Amaresan, N. (2022). Selection of *Rhizobium* Strain for Inoculum Production. In N. Amaresan, P. Patel & D. Amin (Eds.), Practical Handbook on Agricultural Microbiology (pp. 389-394). New York, NY: Springer US.
14. Gulati, S. (1979). New nonsynthetic medium for *Rhizobium* culture production from wastes. Biotechnology and Bioengineering, 21(9), 1507-1515.
15. Jochems-Tanguay, L. (2014). Les inoculants mycorhiziens pour une agriculture québécoise plus productive et moins dépendante aux engrais minéraux phosphatés.
16. Kalita, M., et Małek, W. (2004). Phenotypic and genomic characteristics of rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. Systematic and applied microbiology, 27(6), 707-715.

17. Meade, J., Higgins, P., et O'gara, F. (1985). Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 58(5), 517-524.
18. Menelih, A., Hailu, F., et Adal, M. (2022). Plant Growth Promoting and Abiotic Stress Tolerant Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Rhizobial Isolates from Some Areas of South Wollo Zone, Ethiopia. *Advances in Agriculture*, 1-8.
19. Muilenburg M, Huu Hiep N, Ayhan K, Lie TA, Sukiman HI, Sukara E, Saono S. 1994. Cultivation of *Bradyrhizobium* on molasses and traditionally fermented food: Double fermentation process. In: Sadiki M, Hilali A, editors. *Recent developments in biological nitrogen fixation research in Africa*. Hassan II Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Rabat, Morocco. pp 439 – 447.
20. Naik, V., et Rahi, P. (2022). Methods for Isolation and Identification of Rhizobia. In N. Amaresan, P. Patel & D. Amin (Eds.), *Practical Handbook on Agricultural Microbiology* (pp. 3-14). New York, NY: Springer US.
21. Nitrogen Fixation for Tropical Agricultural Legumes Project, U., Fertilizer, A. O. o. t. U. N., Service, P. N., Crop, A. O. o. t. U. N., & Service, G. P. (1984). *Legume Inoculants and Their Use: A Pocket Manual* (Vol. 52): Food & Agriculture Org.
22. Odori, C., Ngaira, J., Kinyua, J., et Nyaboga, E. N. (2020). Morphological, genetic diversity and symbiotic functioning of rhizobia isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in soils of Western Kenya and their tolerance to abiotic stress. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), 1-15.
23. Pommerville, J. C. (2013). *Fundamentals of microbiology* (pp. 146-149): Jones & Bartlett Publishers.
24. Sellami, M., Oszako, T., Miled, N., & Ben Rebah, F. (2015). Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 407-413.
25. Senthilkumar, M. Amaresan, N. et Sankaranarayanan, A. (2021). *Plant-microbe interactions* (pp. 3-7): Springer.
26. Singleton, P., et Sainsbury, D. (2001). *Dictionary of microbiology and molecular biology* (p. 463): Wiley.
27. Somasegaran, P., et Hoben, H. J. (1994). Collecting Nodules and Isolating Rhizobia. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology* (pp. 7-23). New York, NY: Springer New York.
28. Tak, N., Bissa, G., & Gehlot, H. S. (2020). Methods for Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Legume-Nodulating Bacteria. In K. J. Gupta (Ed.), *Nitrogen Metabolism in Plants: Methods and Protocols* (pp. 119-143). New York, NY: Springer New York.
29. USSL Staff (1954). *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*. USDA Handbook No 60, Washington DC, USA, 160 pp.
30. Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria, *International Biological Program. IBP Handbook*, 1-13.
31. Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. F., Young, J. P. W., et Chen, W. X. (2019). *Ecology and evolution of rhizobia* (pp. 3-8): Springer.
32. Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil*, 287, 3-14.
33. Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2011). *Prescott's microbiology* (Vol. 7) (pp. 154-158): McGraw-Hill New York.

ANNEXES

ANNEXE 1 : les milieux de culture.

- Composition du milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) (Vincent, 1970)

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Eau distillée	1000 ml
Ajustement du pH à 6.8 ±0.2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

- Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970)

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
YMB	1000 ml
Agar	15
Ajustement du pH à 6.8 ±0.2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

- Composition du milieu YMA- Rouge Congo (Vincent, 1970)

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15
Ajustement du pH à 6.8 ±0.2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

- Composition du milieu YMA- bleu de bromothymol (Vincent, 1970)

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
YMB	1000 ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15
Ajustement du pH à 6.8 ± 0.2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Après ajustement de pH on ajoute 5ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100 ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Résumé

Résumé :

Afin de proposer un milieu de culture moins coûteux que celle synthétiques, on arrive à optimiser un milieu de culture en utilisant l'eau d'élevage de poissons pour la production d'inoculant à base de rhizobium. Ce milieu a présenté son potentiel en favorisant la croissance des rhizobia après certains traitements (dilutions, additions). Notamment, les milieux ont montré des différents niveaux d'efficacité face a les différentes gammes de dilution et encore au nature de l'additifs. La réussite d'eau d'élevage de poissons ouvre la porte devant d'autres études afin d'améliorer leur efficacité et commencer à l'utiliser à la place de milieu YMB.

Les mots clés : l'eau d'élevage des poissons, milieu de culture, YMB, rhizobia, production d'inoculant.

Abstract

In order to offer a culture medium that is less expensive than synthetic ones, we can optimize a culture medium by using fish breeding water for the production of rhizobium-based inoculant. This medium showed its potential in promoting the growth of rhizobia after certain treatments (dilutions, additions). In particular, the media showed different levels of effectiveness in the face of the different dilution ranges and the nature of the additives. The success of fish rearing water opens the door to further studies to improve their effectiveness and begin using it in place of YMB medium.

Key words: fish water, culture medium, YMB, rhizobia, inoculant production.

ملخص:

من أجل تقديم وسط استزراع أقل تكلفة من الوسط الاصطناعي، يمكننا تحسين وسط الاستزراع باستخدام مياه تربية الأسماك لإنتاج التلقيح القائم على الريزوبيوم. أظهرت هذه الوسيلة قدرتها على تعزيز نمو الريزوبيا بعد معاملات معينة (التخفيفات والإضافات). وعلى وجه الخصوص، أظهرت الوسائط مستويات مختلفة من الفعالية في مواجهة نطاقات التخفيف المختلفة وطبيعة المواد المضافة. إن نجاح مياه تربية الأسماك يفتح الباب أمام المزيد من الدراسات لتحسين فعاليتها والبدء في استخدامها بدلاً من وسط YMB.

الكلمات المفتاحية: مياه تربية الأسماك، وسط الاستزراع، YMB، الريزوبيا، إنتاج الملقحات.