



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة زيان عاشور-الجلفة

Université Ziane Achour – Djelfa

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Impact de l'inoculation arbusculaire sur la structure microbienne de la rhizosphère de deux variétés de *Medicago sativa* (Var. américaine et var. italienne)**

Présenté par :

M<sup>r</sup> DAOUDECH Aymen Abdelfatah

M<sup>lle</sup> FAKROUN Mouna Hadjer

Devant le jury composé de :

Président : M<sup>me</sup> Belhadj S

Pr Université de Djelfa

Promotrice : M<sup>me</sup> Bencherif - Trodi K

MCA Université de Djelfa

Examineur : M<sup>r</sup> Adli B

MCA Université de Djelfa

Année universitaire 2022/2023



# Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers Mme Ben Cherif - Trodi Karima pour son encadrement et ses précieux conseils tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions également nos familles et nos amis pour leur soutien constant.

Enfin, nous sommes reconnaissants envers tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. Merci à tous.

# Dédicace

À nos familles, source d'inspiration, et à nos amis, piliers de soutien.

**Aymen & Mouna**

## SOMMAIRE

Liste des abréviations et des acronymes .....	
Introduction.....	1
Première partie .....	
<i>Synthèse bibliographique</i> .....	
<i>Chapitre 1 : Medicago sativa</i> .....	
1.Présentation de la Luzerne .....	3
2.Morphologie et Anatomie de la luzerne .....	4
3.Cycle de vie de <i>Medicago sativa</i> .....	4
3.1-Germination .....	4
3.2-Stade de Croissance végétative .....	5
3.3-Stade de reproduction .....	6
3.3.1. Floraison .....	6
3.3.2. Formation de graines .....	6
3.3.3. Dispersion des graines.....	6
4.Exigences de croissance de la luzerne .....	7
5.Intérêt de la luzerne .....	7
<i>Chapitre 2 : La rhizosphère</i> .....	
1.Rhizosphère .....	10
2.Communité microbienne de la rhizosphère .....	12
2.1-Les Bactéries rhizosphériques .....	12
2.1.1.Plant growth promoting Rhizobacteria .....	13
2.1.2.Mécanismes de fonctionnement des PGPR .....	14
2.1.2.1.Fixation de l'Azote .....	14
2.1.2.2.Solubilisation du Phosphate .....	15
2.2-Les Archées .....	15
2.3-Les champignons mycorhiziens .....	16
3.Facteurs biotiques et a abiotique affectant plant-rhizosphère .....	18
4.Interactions entre plante-rhizo-microbiome .....	18
Deuxième partie .....	
<i>Matériels et méthodes</i> .....	
1.Préparation du sol avec inoculum .....	20
2.Plantation <i>Medicago sativa</i> .....	20
3.Isolement des microorganismes de la rhizosphère .....	20
3.1.Dilution .....	20

<b>3.2. Ensemencement</b>	21
3.2.1 Recherche de la pyoverdine	21
3.2.2 Recherche de la pyocyanine	21
3.2.3 Détection du Rhizobium	21
3.2.4 Recherche des microorganismes solubilisateurs de phosphate naturel (PSM)	21
3.2.5 Recherche des microorganismes fixateurs d'azote	22
<b>3.3. Etude macroscopique et purification</b>	22
<b>3.4. Coloration de gram et étude microscopique</b>	22
<b>3.5. Test biochimiques</b>	22
3.5.1 Citrate de Simmons	22
3.5.2 Indole	23
3.5.3 Nitrate	23
3.5.4 Triple sucre fer (TSI)	23
3.5.5 Catalase	23
<b>4. Extraction d'ADN</b>	23
<b>5. Mettre en évidence l'activité antimicrobienne du <i>Medicago sativa</i></b>	24
5.1. Préparation de la suspension bactérienne	24
5.2. Préparation de l'extrait	24
5.3. Préparation des disques	25
5.4. Méthode de diffusion	25
<b>Troisième partie</b>	
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>1. Etude macroscopique des colonies</b>	26
<b>2. Détection de la pyoverdine</b>	26
<b>3. Détection de la pyocyanine</b>	26
<b>4. Croissance sur le milieu YMA</b>	26
<b>5. Croissance sur le milieu NBRIP</b>	27
<b>6. Détection des bactéries fixatrices de l'Azote</b>	27
<b>7. Coloration de gram</b>	28
<b>8. Test biochimiques</b>	29
8.1. Test catalase	31
8.2. Test indole	31
8.3. Citrate de Simmons	32
8.4. Test de nitrate	32
8.5. Test TSI (Triple Sugar Iron)	33
<b>9. Extraction d'ADN et absorbance UV</b>	33

<b>10.L'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique des deux variétés de <i>Medicago sativa</i> cultivés sous les trois traitements</b> .....	36
<b>Discussion</b> .....	38
<b>Conclusion</b> .....	42
<b>Références bibliographiques</b> .....	43
<b>Annexes</b> .....	
<b>Résumé</b> .....	

**Liste des abréviations et des acronymes :**

<b>LB</b>	<b>Milieu Luria Bertani</b>
<b>NBRIP</b>	<b>National Botanical Research Institute's phosphate growth medium</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphore Sodium Buffer</b>
<b>YMA</b>	<b>Yeast Mannitol Agar</b>
<b>PGPR</b>	<b>Plant growth promoting rhizobacteria</b>
<b>N.In.Vi</b>	<b>Non Inoculé variété Italienne</b>
<b>N.InVa</b>	<b>Non inoculé Variété américaine</b>
<b>In.Vi</b>	<b>Inoculé variété italienne</b>
<b>In.Va</b>	<b>Inoculé variété américaine</b>
<b>A1</b>	<b>Variété américaine inoculé par CMA + bactérie rhizosphérique</b>
<b>I1</b>	<b>Variété italienne inoculé par CMA + bactérie rhizosphérique</b>
<b>ROS</b>	<b>Espèces réactives de l'oxygène</b>
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Ion dihydrogène phosphate</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Sulfate d'ammonium</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>Sulfate de Magnésium Heptahydrate</b>
<b>ADN</b>	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
<b>ADNg</b>	<b>Acide désoxyribonucléique génomique</b>
<b>ADNr</b>	<b>Acide désoxyribonucléique ribosomique</b>
<b>ITS1</b>	<b>L'Espaceur interne transcrit 1</b>
<b>PCR</b>	<b>Réaction en chaîne par polymérase</b>

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : Germination de la luzerne.....	05
<b>Figure 2</b> : Intérêt de la luzerne.....	08
<b>Figure 3</b> : Les composés organiques libérés par les racines des plantes.....	19
<b>Figure 4</b> : Préparation des dilutions.....	21
<b>Figure 5</b> : Extraction de l'ADN.....	23
<b>Figure 6</b> : Les suspensions des souches bactériennes pathogènes.....	24
<b>Figure 7</b> : Préparation de l'extrait du <i>Medicago sativa</i> .....	25
<b>Figure 8</b> : Photos représentatives de la détection de la fluorescence du souche KB1 sur milieu King B avant et après purification.....	26
<b>Figure 09</b> : Photos représentatives des microorganismes solubilisateurs de phosphate naturel (PSM) par la présence d'un halo.....	27
<b>Figure 10</b> : Souches fixatrices de l'azote sur le milieu BURK's N-Free.....	28
<b>Figure 11</b> : Test catalase positive à droite et négative à gauche.....	31
<b>Figure 12</b> : Test indole positive à droite et négative à gauche.....	32
<b>Figure 13</b> : Test de citrate de Simmons positive à droite et négative à gauche.....	32
<b>Figure 14</b> : Test de nitrate positive à droite et négative à gauche.....	33
<b>Figure 15</b> : Test TSI positive à droite et négative à gauche.....	33
<b>Figure 16</b> : Résultats de la PCR d'amplification pour les microorganismes rhizosphériques.....	35
<b>Figure 17</b> : Zones inhibition pour <i>E.coli</i> (l'extrait de <i>M. sativa</i> variété Américaine avec CMA + bactéries) .....	37
<b>Figure 18</b> : Zones inhibition pour <i>K.pneumoniae</i> (l'extrait de <i>M. sativa</i> variété naturel Italienne non inoculé).....	37

**Liste des tableaux :**

<b>Tableau N°1 :</b> La taxonomie de <i>Medicago sativa</i> .....	03
<b>Tableau N°2 :</b> Les résultats de la coloration du gram.....	28
<b>Tableau N°3 :</b> Les résultats des tests biochimique.....	29
<b>Tableau N°4 :</b> Résultats d'absorbance de l'ADN d'UV.....	34
<b>Tableau N°5 :</b> Les résultats de zones d'inhibition des disques.....	36

# *Introduction*

### Introduction

La luzerne est une plante fourragère principalement destinée à l'alimentation des ruminants. Cependant, son utilisation est limitée en raison de la valeur énergétique modérée de ce fourrage dans les rations destinées aux ruminants à fort niveau de production. Par conséquent, il est nécessaire d'améliorer sa digestibilité pour maintenir un niveau de production optimal. Une meilleure digestibilité entraîne notamment une augmentation de la production laitière chez les vaches laitières (Émile *et al.*, 1997).

La luzerne présente également divers avantages tant sur le plan agronomique (pérennité, rusticité, production estivale, économie d'intrants) que zootechnique (richesse en protéines, substances minérales et forte digestibilité). Dans un contexte socio-économique caractérisé par une préoccupation croissante pour la protection de l'environnement et la sécurité alimentaire, la luzerne se distingue par sa capacité à générer une quantité significative de protéines tout en ayant un faible impact environnemental.

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde. Elle est couramment utilisée comme alimentation pour le bétail et est généralement récoltée sous forme de foin, mais peut également être ensilée, broutée ou pâturée en vert. La luzerne possède généralement la plus grande valeur nutritionnelle parmi les cultures de foin courantes. En outre, elle améliore le régime alimentaire des agneaux et favorise leur production. En tant que légumineuse fourragère vivace, elle est largement cultivée en raison de sa teneur élevée en protéines et de sa biomasse productive. Elle présente une tolérance modérée aux stress abiotiques tel que : la salinité et la sécheresse. A l'échelle mondiale, la luzerne occupe une superficie d'environ 12,5 Millions d'hectares, et en Afrique la superficie occupée par la luzerne avoisine les 185 000 hectares (FAO-STAT, 2015). Par contre, en Algérie, l'utilisation du fourrage vert est très réduite. La culture de *M. sativa* ne représentait pas plus de 3 000 hectares en 2013 (FAO-STAT, 2015). Ceci se répercute directement sur la production laitière.

La salinité des sols représente un sérieux problème dans les régions arides et semi-arides. Près de 15 millions d'hectares sont affectés par la salinité dans le Maghreb (Afrique du nord) et le Moyen-Orient (Hadj-Amor *et al.*, 2022), dont environ 1/6<sup>ème</sup> sont occupés par des chotts et des sebkhas (dépressions salées, épisodiquement inondées) colonisés par des halophytes (Haran et Thaher, 2019). En Algérie, bien qu'il n'existe pas d'étude cartographique précise de la salinité des terres, quelques données fragmentaires donnent une idée générale de ce phénomène de salinisation et de dégradation des sols (Bencherif, 2016). Le phénomène de salinisation touche 3.2 millions d'hectares à des degrés de sévérité variable. Une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où les températures élevées et le manque d'exutoire

## Introduction

---

conduisent à une salinisation accrue (INSID, 2008). Cette situation diminue la capacité d'utilisation de ces sols (Hadj-Amor *et al.*, 2022), réduisant ainsi les terres agro-écologiques et accélérant la dégradation des sols (Haran et Thaher, 2019). Pour remédier à cette situation, les plantations agro-sylvo-pastorales, associées à une gestion efficace des communautés de symbiotes microbiens, sont une solution biotechnologique prometteuse pour restaurer les écosystèmes dégradés tout en assurant une protection de l'équilibre environnemental des sols (Bencherif *et al.*, 2023).

En effet, les végétaux établissent des symbioses avec un nombre impressionnant de microorganismes qui impactent positivement la croissance, le développement, la germination des graines, la vigueur des semis de leurs plantes hôtes en plus d'un effet significatif sur la résistance aux maladies et l'amélioration de la nutrition (Mendes *et al.*, 2013). Par exemple, les légumineuses peuvent établir une relation symbiotique avec les rhizobiums qui les aident à convertir l'azote gazeux ( $N_2$ ) en ions ammonium, qui sont assimilables par la plante hôte. Cette fixation symbiotique de l'azote permet aux légumineuses de survivre dans des zones à faible apport en azote, ce qui représente une importance cruciale pour l'agriculture et l'écosystème (Mahapatra *et al.*, 2023). De leur côté, les champignons mycorhiziens arbusculaires sont un allié des végétaux supérieurs contre les stressés abiotiques (Bencherif *et al.*, 2023).

Focaliser sur l'amélioration des fourrages verts est une solution à envisager, que ce soit pour améliorer les qualités des sols pauvres en nutriments où dans la perspective d'élargir ces cultures nutritives pour le cheptel. La seule façon biologique de développer ces cultures sans nuire à la balance écologique est l'utilisation de biofertilisants naturels natifs des zones à stressés abiotiques.

Dans notre présente étude nous visons à mettre en valeur l'impact de la biofertilisation par des microorganismes natifs sur des sols naturellement salins des régions semi-arides algériennes et sur l'équilibre du microbiote rhizosphérique dans des cultures fourragères de *Medicago sativa*. Le travail s'articule en trois parties : une première partie sur l'état de l'art dans laquelle nous allons mettre la lumière sur les dernières recherches des points qui composent notre étude. Une deuxième partie, expérimentale, dans laquelle nous allons présenter nos principales expériences et en troisième partie nous allons exposer nos résultats et les discuter avant de conclure notre travail par une conclusion ouvrant des voies pour de nouvelles recherches.

**Première partie :**  
***Synthèse bibliographique***

# *Chapitre 1 : Medicago sativa*

### 1. Présentation *Medicago sativa* :

La luzerne (*Medicago sativa* L.) occupe une place prépondérante parmi les légumineuses fourragères à l'échelle mondiale, souvent qualifiée de « reine des fourrages » en raison de son adaptation étendue, de son rendement élevé et de sa qualité supérieure en tant que légumineuse fourragère riche en protéines avec une excellente digestibilité (Neal et Fan, 2014). Ces qualités en font de cette espèce une culture à haute valeur nutritionnelle pour divers animaux d'élevage. C'est une espèce vigoureuse qui peut être récoltée plusieurs fois par année, ce qui entraîne une productivité élevée en termes de rendement fourrager.

Par conséquent, la luzerne est largement utilisée en élevage car elle peut être transformée en ensilage préfané, en ensilage ou nourrie directement. En résumé, la luzerne est l'un des fourrages les plus essentiels pour soutenir la production animale (Feng *et al.*, 2022). Elle appartient à la famille des Fabaceae, la troisième plus grande famille de plantes à fleurs après les orchidacées et les astéracées, avec plus de 600 genres et 20 000 espèces recensés (Woods et Orcutt, 2017 ; Doyle, 2019). En raison de sa distribution géographique vaste, les légumineuses ont fait l'objet d'études approfondies, principalement en raison de leur capacité à fixer l'azote par le biais de leurs interactions avec les rhizobiums, ainsi que de leur importance économique (Lopez *et al.*, 2018).

Le terme « alfalfa » est couramment utilisé en espagnol et en arabe pour désigner *Medicago sativa*, tandis que dans les pays européens, on l'appelle « luzerne » (Gunn *et al.*, 1978). La taxonomie de *Medicago sativa* est documentée dans l'étude de Marble (1989).

**Tableau N°1** : La taxonomie de *Medicago sativa* (Marble, 1989).

<b>Phylum</b>	<i>Plantae</i>
<b>Division</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivision</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Fabales</i>
<b>Famille</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Medicago</i>
<b>Espèce</b>	<i>Medicago sativa</i>

### 2. Morphologie et Anatomie de *Medicago sativa* :

Il existe une très grande variabilité génétique dans la morphologie et l'anatomie des différentes populations de luzerne. La luzerne est une dicotylédone. À la levée, deux cotylédons émergent en premier. La première feuille est unifoliée, tandis que les feuilles suivantes sont composées de trois folioles reliées à la tige par un pétiole, ce qui les rend trifoliées (Mauriès, 2003).

Au cours de son développement, la première tige grandit en produisant des feuilles en alternance. Ensuite, le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe pour former une tige secondaire. Deux autres tiges secondaires débutent à partir du niveau des cotylédons. Les variétés de luzerne non dormantes produisent davantage de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que les types dormants, dont la croissance est interrompue en hiver. C'est cet ensemble de tiges qui formera le collet. Les jeunes plantes qui ne sont pas récoltées produisent également des tiges secondaires à partir des bourgeons axillaires des premières feuilles trifoliées (Castleman, 2021).

En même temps, la luzerne développe une racine pivotante principale et des racines secondaires plus ou moins ramifiées. Les types résistants au froid ont des systèmes racinaires plus fasciculés en raison de leur origine *Falcata*.

Le développement des tiges suit un ordre précis : on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaires. Les feuilles sont généralement de type trifolié, mais il existe des variétés dites multifoliées, avec 4, 5, 6 ou même 7 folioles portées par un pétiole. Des feuilles portant jusqu'à 11 folioles ont déjà été observées. Les fleurs apparaissent entre le 6e et le 14e entrenœud en fonction des conditions environnementales et de leur déterminisme génétique (Mauriès, 2003 ; Castleman, 2021).

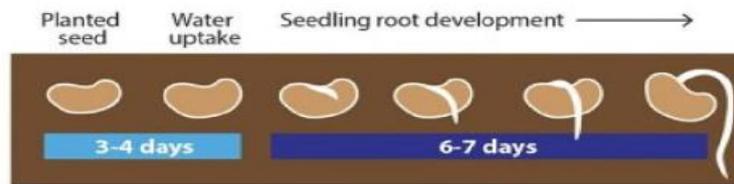
### 3. Cycle de vie de *Medicago sativa* :

*Medicago sativa*, comme toutes les plantes terrestres passe par un cycle de vie composé de trois étapes : la germination, la croissance végétative et le stade de la reproduction.

#### 3.1- Germination :

Le cycle de vie de la luzerne débute par la germination de la graine (Figure 1). Les graines de luzerne possèdent une dormance variable, ce qui implique qu'elles peuvent nécessiter des conditions spécifiques, comme des variations de température ou d'exposition à la lumière, pour initier le processus de germination. Lorsque les conditions deviennent favorables, la graine germe et une jeune pousse émerge du sol. Un bon contact entre la graine et le sol est essentiel, car cela permet à la graine d'absorber l'humidité du sol. Si la coque protectrice de la graine a été fragilisée par des fluctuations de température ou des mécanismes externes, la graine peut

commencer à germer. La température optimale pour cette phase est généralement située entre 19 et 25°C. Dans un délai de 2 à 4 jours, la radicule, c'est-à-dire la première racine, commence à émerger du sol (Coburn, 1901 ; Castleman, 2021).



**Figure 01** : Germination de la luzerne (Castelman, 2021).

### 3.2- Stade de Croissance végétative :

Les cotylédons fournissent de l'énergie jusqu'au début de la photosynthèse. Cette phase est particulièrement sensible aux dommages causés par les insectes, à l'application d'herbicides ainsi qu'à l'humidité du sol, qui peut être excessive ou insuffisante. Les nodules commencent à se former sur les racines, la feuille unifoliée émerge, et la plante entame le processus de photosynthèse. Lorsque la feuille trifoliée se développe, la plante devient plus résistante aux dommages causés par les insectes et les herbicides. Cette résistance s'accroît lorsqu'elle possède au moins 3 à 4 feuilles trifoliées. De nouvelles pousses se développent à partir de la base et des aisselles des feuilles. Les pousses secondaires émergent également de la base, c'est-à-dire des bourgeons basaux. La partie située à la base est souvent appelée la couronne. La suppression des pousses basales affaiblit la plante en gaspillant une réserve d'énergie nécessaire à sa croissance. De nouveaux bourgeons peuvent se former à partir de la couronne, et de nouvelles pousses apparaissent à l'aisselle des feuilles sur les tiges (Castelman, 2021 ; Understander, 2021).

En ce qui concerne les racines de la luzerne, la racine pivotante profonde et le système racinaire latéral étendu jouent tous deux un rôle dans la rétention d'humidité. La racine pivotante agit comme une réserve d'énergie pour la repousse et la croissance des racines, qui réagissent à l'approvisionnement en eau pour assurer leur survie. La plante vivace utilise l'énergie stockée dans la racine pivotante pour se régénérer après la coupe ou le pâturage. Les racines peuvent être endommagées ou restreintes par des maladies, des insectes souterrains, des déséquilibres nutritionnels, des sols compactés, des couches sodiques dans le sous-sol et des épisodes d'engorgement (Castelman, 2021).

En ce qui concerne les racines de la luzerne et les nodules racinaires, les bactéries rhizosphériques forment des nodules sur les racines, où se produit la fixation de l'azote. La

luzerne, étant une légumineuse, dépend des *Rhizobia* pour l'apport principal de son azote. Le nom du *Rhizobia* qui colonise la luzerne en tant qu'hôte est *Sinorhizobium* spp. Ces bactéries appartiennent au groupe AL, utilisé pour la luzerne, le trèfle et le trèfle médic. Les nodules ont la capacité de fixer l'azote de l'air, le convertissant d'une forme gazeuse en une forme assimilable par la plante (Castleman, 2021).

### 3.3- **Stade de reproduction :**

**3.3.1. Floraison** : La floraison de la luzerne est déclenchée par trois facteurs, tous influencés par les conditions saisonnières : la température de l'air, la durée du jour et le stress hydrique. En général, la luzerne entre en phase de floraison au printemps ou en été, selon les conditions environnementales. Pendant cette période, les nutriments sont redirigés des racines vers les fleurs et les graines. La plante produit des grappes de fleurs de couleur violette, blanche ou jaune, qui attirent les pollinisateurs tels que les abeilles. La pollinisation croisée des fleurs conduit à la formation de gousses contenant les graines de luzerne. Il est important de noter que la floraison d'une plante vivace ne signifie pas que son cycle de vie est terminé (Castleman, 2021 ; Understander, 2021).

**3.3.2. Formation de graines** : Une fois que les fleurs sont pollinisées, les gousses de luzerne commencent à se développer et à renfermer les graines. Au fil du temps, les gousses mûrissent, passant du vert au brun ou au noir. Une fois complètement mûres et sèches, les gousses s'ouvrent naturellement, libérant ainsi les graines.

**3.3.3. Dispersion des graines** : Les graines de luzerne sont dispersées de diverses manières, notamment par le vent, l'eau, les animaux et l'intervention humaine. Localement, elles peuvent également se propager par autofécondation. Les graines dispersées ont la capacité de rester dormantes pendant une période plus ou moins longue, en attendant des conditions favorables pour la germination.

Le cycle de vie de la luzerne se poursuit indéfiniment, car il s'agit d'une plante vivace. Après la formation des graines, la plante peut continuer à croître et à se développer pendant plusieurs années, à condition que les conditions environnementales adéquates ainsi que les pratiques agricoles appropriées soient maintenues. La luzerne est souvent récoltée plusieurs fois par an pour son feuillage riche en nutriments, et elle peut produire des rendements de fourrage élevés pendant de nombreuses années (Castleman, 2021 ; Understander, 2021).

### 4. Exigences de croissance de la luzerne :

Un ensoleillement adéquat joue un rôle essentiel dans la photosynthèse, fournissant l'énergie nécessaire à la croissance des plantes. Pour une croissance optimale, la luzerne nécessite une exposition directe au plein soleil. Cette culture saisonnière préfère les températures modérées, idéalement entre 15 et 25°C. La disponibilité adéquate d'eau est cruciale pour sa croissance ; l'humidité appropriée du sol facilite l'absorption des éléments nutritifs et contribue à la santé globale de la plante (Understander, 2011 ; Marble, 1989).

Les sols préférés par la luzerne sont bien drainés et dotés d'une structure et d'une fertilité satisfaisante. Elle prospère davantage dans des sols légèrement alcalins à neutres, avec un pH compris entre 6,2 et 7,8 (Skuodienė *et al.*, 2023). *Medicago sativa* requiert des nutriments essentiels pour sa croissance et son développement, en particulier l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K). Une analyse du sol et une gestion adéquate des nutriments sont nécessaires pour maintenir des niveaux optimaux de ces éléments nutritifs (Marble, 1989 ; Understander, 2011 ; Castelman, 2021). La gestion appropriée des coupes joue un rôle crucial pour optimiser le rendement en fourrage, la qualité et le potentiel de repousse de la luzerne (Small, 2011).

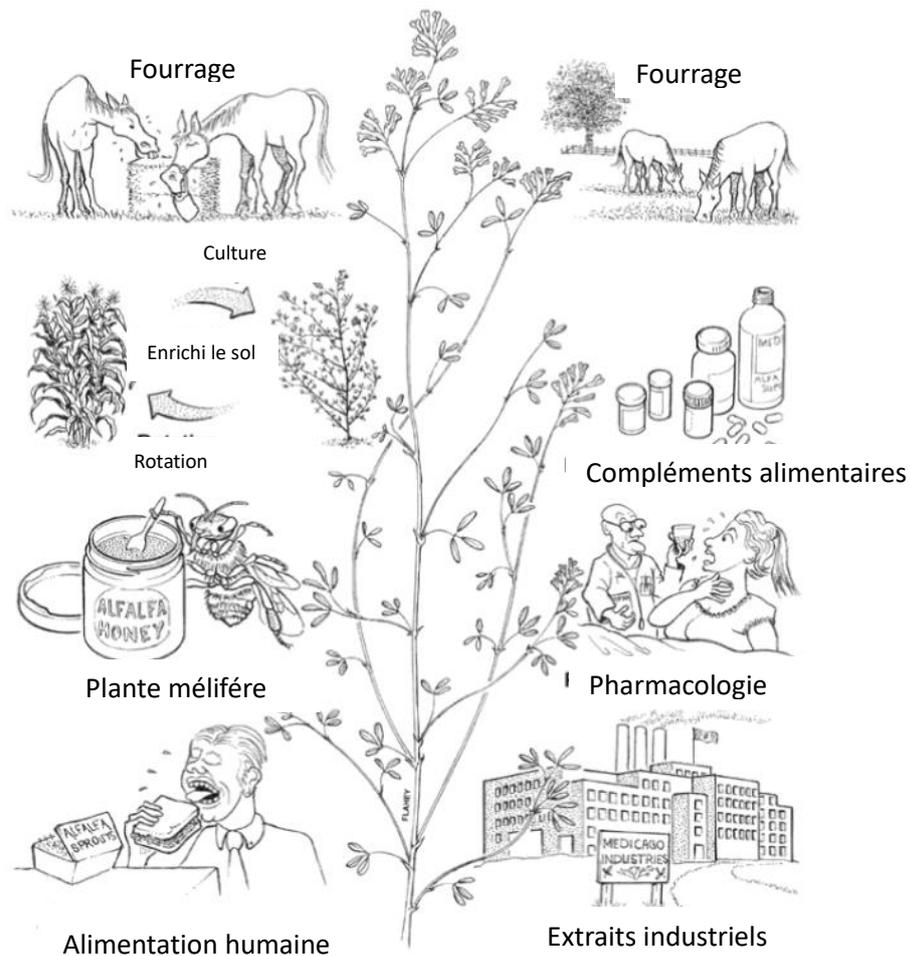
### 5. Intérêt de la luzerne :

La luzerne présente plusieurs avantages significatifs à divers égards (Figure 2). Grâce à sa teneur élevée en protéines, sa digestibilité et sa valeur nutritionnelle, elle constitue une source d'alimentation précieuse pour divers animaux de pâturage, tels que les vaches laitières, les bovins de boucherie, les chevaux, les moutons, et bien d'autres. La luzerne fournit les nutriments essentiels nécessaires à la croissance optimale de ces animaux et contribue à améliorer la production de lait chez les vaches laitières (Rodoviç *et al.*, 2009).

La productivité impressionnante de la biomasse de la luzerne est mise en évidence par des rendements record pouvant atteindre 22 tonnes de matière sèche par hectare sans irrigation, et jusqu'à 54 tonnes de matière sèche par hectare avec irrigation. Cette productivité joue un rôle écologique crucial en réduisant la pression agricole sur les terres agricoles mondiales en diminution. En contenant généralement de 15 à 22 % de protéines brutes, la luzerne est capable de produire plus de deux fois plus de protéines que le soja par unité de surface, en faisant ainsi la source de production de protéines la plus efficace dans les régions tempérées (Small, 2011).

En ce qui concerne le sol, la luzerne suscite un intérêt croissant pour ses propriétés écologiques. Depuis des millénaires, les capacités de fixation de l'azote par les bactéries symbiotiques logées dans ses nodules racinaires améliorent le sol. Ces bactéries peuvent fixer jusqu'à 560 kg d'azote atmosphérique par hectare et par an, ce qui fait de la luzerne un élément clé dans les rotations de cultures. Le système racinaire vivace étendu de la luzerne, souvent

caractérisé par une racine pivotante ressemblant à une carotte, contribue à réduire l'érosion, à améliorer la structure du sol, l'infiltration de l'eau, et à favoriser l'écologie du sol incluant les invertébrés et les micro-organismes. La nécessité minimale voire nulle de fertilisation azotée en fait une culture économe en énergie. Son caractère pérenne signifie qu'elle peut être cultivée pendant plusieurs années sans nécessiter de réensemencement, ce qui réduit également le travail du sol et atténue l'érosion du sol en maintenant une couverture continue à long terme. La croissance vigoureuse de la luzerne permet un excellent contrôle des mauvaises herbes et réduit la nécessité d'utiliser des herbicides (Small, 2011 ; Castelman, 2021).



**Figure 2 :** Intérêt de la luzerne.

La luzerne contribue également à l'assainissement des sols. Elle peut prévenir la contamination des eaux souterraines en absorbant l'excès d'azote du sol avant qu'il ne pénètre dans les nappes phréatiques et les cours d'eau. Elle peut aussi réduire la contamination du sol due aux hydrocarbures pétroliers, aux métaux et aux composés organiques (Yu et Kole, 2021).

## Chapitre 1 : *Medicago sativa*

---

Dans les systèmes de rotation des cultures, la luzerne est souvent utilisée comme culture de rotation. Ses racines profondes contribuent à briser les couches compactées du sol, améliorant le cycle des nutriments et supprimant les mauvaises herbes, ce qui profite aux cultures suivantes dans la rotation (Small, 2011).

En ce qui concerne la biodiversité, la floraison de *Medicago sativa* fournit une source précieuse de nectar et de pollen pour les abeilles, les papillons et autres pollinisateurs. En soutenant les populations de pollinisateurs, la luzerne contribue à la biodiversité globale et à la santé de l'écosystème (Burezq, 2021).

## ***Chapitre 2 : La rhizosphère***

### 2. Rhizosphère :

L'importance cruciale du sol pour l'humanité ainsi que son rôle essentiel dans la santé des écosystèmes et l'agriculture sont indiscutables. Le sol est un système vivant qui nécessite des pratiques durables pour être enrichi, afin de soutenir diverses activités vitales pour les sociétés humaines. En plus de ses fonctions positives, le sol peut également agir comme un réservoir de polluants. La contamination des terres agricoles accroît la pression pour répondre à la demande mondiale en alimentation tout en préservant l'intégrité des écosystèmes planétaires (Ling *et al.*, 2022).

Les racines des plantes jouent un rôle crucial non seulement en fournissant l'ancrage et en permettant l'acquisition d'eau et de nutriments du sol, mais elles participent également à des interactions physiques et chimiques complexes avec le sol (Yee *et al.*, 2021). La rhizosphère, quant à elle, représente un environnement unique, habité par une multitude de micro-organismes. Elle constitue une zone d'activité autour du point central, les racines. La rhizosphère est cette fine couche du sol influencée par la présence de racines vivantes, se manifestant par l'exsudation ou la libération de substances qui interagissent avec les micro-organismes du sol (Curl et Truelove, 2012).

Le terme "rhizosphère" a été créé pour la première fois par Lorenz Hiltner, un agronome allemand, en 1904, en combinant les mots "rhiza" (racine) et "sphère" (environnement d'influence). Hiltner a déclaré : "La nutrition des plantes en général dépend certainement de la composition de la flore du sol dans la rhizosphère." Il a également avancé l'hypothèse suivante : "Si les plantes ont tendance à attirer des bactéries utiles par leurs excréments de racines, il ne serait pas surprenant qu'elles attirent également des hôtes indésirables qui, tout comme les organismes bénéfiques, s'adaptent à des excréments de racines spécifiques." Ainsi, Hiltner avait déjà identifié les deux principales influences de la rhizosphère sur les plantes, des sujets qui allaient faire l'objet de recherches intensives au cours des décennies suivantes. Ces domaines de recherche comprenaient la relation entre la rhizosphère et la nutrition, la croissance et le développement des plantes, ainsi que l'impact des phénomènes rhizosphériques sur les agents pathogènes et la pathogenèse (Curl et Truelove, 2012).

## Chapitre 2 : La rhizosphère

---

La rhizosphère désigne le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire. Dans la pratique, le sol considéré comme rhizosphérique est celui qui adhère aux racines. Ce volume de sol est plus ou moins important et varie selon les plantes et le sol (Louvel, 2010). La matrice du sol qui entoure la rhizosphère et qui est moins affectée par l'activité des racines et des micro-organismes est appelée le sol en vrac (Gobran et Huang, 2011).

La rhizosphère, une zone cruciale pour les interactions entre les racines des plantes et le sol, peut être divisée en plusieurs zones distinctes :

**Endorhizosphère** : Cette fine couche s'étend de la surface de la racine aux cellules proches de la surface. Elle est colonisée ou potentiellement colonisable par des micro-organismes.

**Rhizoplan** : Ce terme, introduit par Clark en 1949, désigne la surface externe de la racine de la plante, soit l'interface bidimensionnelle entre la racine et le sol.

**Ectorhizosphère** : Il s'agit de la couche de sol entourant les racines et influencée par l'activité des racines elles-mêmes et des micro-organismes. Son épaisseur varie généralement d'un à quelques millimètres. Ce terme a été initialement utilisé par Hiltner en 1904, qui l'appelait simplement la rhizosphère. La même définition et le même terme ont été rapportés par Curl et Truelove en 1986 (Gobran et Huang, 2011).

Deux caractéristiques dynamiques de la rhizosphère sont les exsudats racinaires et les microbes du sol. Les exsudats racinaires sont des composés chimiques sécrétés par les racines, servant de source de nourriture pour les microbes du sol et jouant un rôle clé dans l'interaction entre les microbes et les plantes. Ils peuvent être de bas ou de haut poids moléculaire et sont importants pour la communication entre les racines et les micro-organismes du sol. L'autre aspect essentiel de la rhizosphère est la présence des microbes du sol, tels que les bactéries, les champignons et les actinomycètes (Khan *et al.*, 2016).

La rhizosphère est un écosystème dynamique façonné par des interactions complexes entre les racines des plantes, le sol, les communautés microbiennes et d'autres micro et macrofaunes (Yee *et al.*, 2021). De nombreuses études ont révélé que les micro-organismes associés aux plantes ont des effets profonds sur divers aspects, tels que la germination des graines, la croissance et le développement des plantes, la nutrition, les maladies et la productivité (Mendes *et al.*, 2013). La recherche sur la rhizosphère peut être divisée en trois grandes parties distinctes :

- ✓ Influence des racines sur les micro-organismes du sol
- ✓ Influence des micro-organismes de la rhizosphère sur la croissance des plantes

- ✓ Influence de la rhizosphère sur les agents pathogènes du sol et les maladies des plantes

### 1. Communauté microbienne de la rhizosphère :

La rhizosphère est associée à de nombreux microbes. Le « microbiome » associé à la rhizosphère est connu sous le nom de rhizomicrobiome. Il est considéré comme le deuxième génome des plantes, le nombre de gènes du microbiome présents dans la rhizosphère est bien supérieur au nombre de gènes de la plante (Odelde et Babalola, 2019 ; Sharma *et al.*, 2021)

Le terme « rhizomicrobiome » est défini comme une communauté microbienne présente dans la rhizosphère qui constitue un environnement riche en nutriments, servant de point de rencontre pour les échanges nutritifs entre le sol, les plantes et les microbes notamment des bactéries, des archées, des champignons, des oomycètes, des virus et des protistes, qui interagissent tous les uns avec les autres dans des réseaux d'échange trophiques complexes (Li *et al.*, 2021). La densité des cellules microbiennes dans la rhizosphère dépasse largement celle des cellules végétales. La microflore constituant le rhizomicrobiome peut influencer la vigueur des graines, la germination, la nutrition, la productivité, la croissance, le développement des plantes et l'apparition de maladies (Woźniak, et Gałązka, 2019).

Dans des conditions de salinité élevée, l'accumulation excessive d'ions sodium (Na) et de chlorure (Cl) dans divers organes végétaux entraîne une cytotoxicité qui entrave la croissance et le développement des plantes (Li *et al.*, 2021). De plus, la salinité induit un stress oxydatif par la génération d'espèces réactives de l'oxygène, provoquant des altérations irréversibles dans les processus cellulaires et physiologiques. L'une des conséquences du stress salin est le déséquilibre rédox entraîné par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Khare *et al.*, 2020).

Outre les mécanismes distincts d'adaptation au sel des plantes et des bactéries, les plantes pourraient améliorer leur tolérance au stress salin grâce à des associations symbiotiques avec des communautés bactériennes rhizosphériques et endophytes. La salinité du sol affecte les communautés de la rhizosphère et crée une pression de sélection naturelle positive pour les bactéries halotolérantes (Slama *et al.*, 2023).

#### 2.1- Les Bactéries rhizosphériques :

La rhizosphère abrite une diversité considérable d'espèces bactériennes, et les compositions des communautés bactériennes varient en fonction de la zone racinaire, des espèces végétales, de la phase phénologique de la plante, des stress et des événements pathologiques. Les phylums bactériens prédominants appartiennent aux classes *Proteobacteria*,

*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Acidobacteria*. Parmi eux, les protéobactéries sont reconnues comme le groupe bactérien le plus abondant dans la rhizosphère en raison de leur capacité à exploiter les sources de carbone labile (C labile), ce qui se traduit par une croissance rapide et une adaptation à la diversité des rhizosphères végétales. Les protéobactéries sont suivies par les acidobactéries, qui jouent un rôle crucial dans le cycle du carbone des sols en raison de leur aptitude à dégrader la cellulose et la lignine (Pantigoso *et al.*, 2022).

### 2.1.1. Plant growth promoting Rhizobacteria :

À la fin des années 1970, Kloepper and Schroth a introduit le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) pour décrire les bactéries qui colonisent les racines des plantes et possèdent la capacité de stimuler la croissance des plantes (Rana *et al.*, 2011). La bactérie PGPR de la rhizosphère doit être caractérisée par (1) la capacité à coloniser la zone racinaire des plantes, (2) la capacité à survivre et à se reproduire en présence de micro-organismes compétitifs, au moins pendant le temps nécessaire pour révéler leur activité bénéfique contribuant à la promotion et à la reproduction. Protection des plantes, (3) activité favorisant la croissance des plantes (Woźniak, et Gałązka, 2019).

Selon la base de données GenBank actuelle du National Center for Biotechnology Information (NCBI), les groupes bactériens les plus couramment associés à la promotion de la croissance des plantes sont les actinobactéries, les firmicutes, les protéobactéries (alphaprotéobactéries, bêtaprotéobactéries, gammaprotéobactéries) ainsi que les bactéroïdes. La majorité du groupe crédible de PGPR appartient aux genres *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Goswami *et al.*, 2016).

Cependant, ces groupes bactériens ne sont pas toujours observés en tant que dominants ou en tant que PGPR dans la rhizosphère. Cette observation peut être due à notre connaissance limitée de leur taxonomie et de leurs séquences génétiques fonctionnelles. Il est également possible que des groupes bactériens moins abondants possèdent des capacités métaboliques spécifiques et adaptées aux caractéristiques de la rhizosphère de certaines espèces végétales, ce qui rendrait difficile leur détection à travers les méthodes classiques d'extraction d'ADN du sol. De plus, des études ont montré que les pratiques agricoles et le pH du sol peuvent influencer la composition des communautés bactériennes. De même, certains groupes bactériens peuvent dépendre d'autres microorganismes présents dans la rhizosphère pour leur propre croissance et activités (Lagos *et al.*, 2015).

### 2.1.2. Mécanismes de fonctionnement des PGPR :

L'azote et le phosphore comptent parmi les nutriments essentiels primaires pour la croissance végétale. Parallèlement, les ions de potassium, de fer et les micronutriments jouent également un rôle crucial dans la vie des plantes. Dans les sols déficients en nutriments, il est courant d'appliquer des amendements chimiques tels que les engrais N-P-K pour compenser ces carences. Bien que cette méthode puisse entraîner une croissance végétale significative, elle n'est pas durable à long terme.

La tendance actuelle consiste à explorer des alternatives durables pour remplacer ces méthodes chimiques. Parmi ces alternatives, l'utilisation de bactéries bénéfiques qui ont la capacité de transformer les nutriments en formes directement assimilables par les plantes se révèle prometteuse. Cette approche vise à favoriser une relation symbiotique entre les bactéries et les racines des plantes, permettant ainsi une meilleure utilisation des ressources nutritives disponibles.

Le pH du sol joue également un rôle significatif dans la disponibilité des nutriments pour les plantes. Un sol ayant un pH neutre ou alcalin peut rendre le fer sous forme ferrique insoluble, ce qui limite son absorption par les plantes et, par conséquent, leur croissance. En revanche, dans un environnement au pH acide, ces ions ferriques deviennent solubles et peuvent être absorbés par les racines des plantes, favorisant ainsi leur développement optimal (Lugtenberg, 2014).

#### 2.1.2.1. Fixation de l'Azote :

L'azote (N) représente un élément nutritif essentiel crucial pour la croissance et la productivité des plantes. Malgré la présence d'environ 78 % de N<sub>2</sub> dans l'atmosphère, cette forme n'est pas directement accessible aux plantes en croissance. L'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) subit une transformation en formes assimilables par les plantes grâce à un processus appelé fixation biologique de l'azote (BNF). Ce processus, exécuté par des micro-organismes fixateurs d'azote, implique une conversion de l'azote en ammoniac à l'aide d'un système enzymatique complexe appelé nitrogénase. La BNF représente environ les deux tiers de l'azote fixé à l'échelle mondiale (Saeed *et al.*, 2021).

Les organismes capables de fixer l'azote sont généralement classifiés en deux groupes. Premièrement, il y a les bactéries fixatrices d'azote symbiotiques, telles que les membres de la famille des rhizobiacées qui établissent une symbiose avec des plantes légumineuses (par exemple, *Rhizobium*) et des arbres non légumineux (par exemple, *Frankia*). Deuxièmement, il y a les formes non symbiotiques, comprenant des organismes vivants librement, des associations et des endophytes. Les cyanobactéries (comme *Anabaena* et *Nostoc*), *Azospirillum*,

*Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* et *Azocarus* font partie de ces fixateurs d'azote non symbiotiques. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, capables de fixer l'azote dans des plantes non légumineuses, sont également désignées comme des diazotrophes. Ces diazotrophes ont la capacité de former des interactions non obligatoires avec les plantes hôtes (Ahemad et Kibret, 2014).

### 2.1.2.2. Solubilisation du Phosphate :

Le phosphore (P) est le deuxième macroélément le plus vital après l'azote et est essentiel pour une nutrition adéquate des plantes. Il joue un rôle clé dans des processus tels que la photosynthèse, le transfert d'énergie et divers processus métaboliques au sein des plantes. Bien que le phosphore soit généralement présent en excès dans la plupart des sols, il n'est pas disponible sous une forme assimilable par les plantes : seulement 0,1 % du phosphore total du sol est accessible aux plantes (Ahemad et Kibret, 2014).

Ces micro-organismes contribuent à augmenter la disponibilité du phosphore dans le sol en favorisant la minéralisation du phosphore organique présent dans le sol. La minéralisation du phosphore organique par les micro-organismes nécessite une solubilisation du phosphore, processus fortement influencé par le pH du sol. Ces microbes ajustent le pH du sol en produisant divers acides organiques, inorganiques et autres métabolites par le biais d'un mécanisme connu sous le nom d'acidification de la rhizosphère. Certaines espèces telles que *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Bacillus* sont reconnues comme des bactéries solubilisant les phosphates (PSB) qui contribuent à ce processus (Ahemad et Kibret, 2014 ; Saeed *et al.*, 2021).

### 2.2- Les Archées :

Le domaine Archaea est un autre domaine important qui pourrait servir de moyen alternatif d'amélioration des productions agricoles en raison de leurs caractéristiques uniques. Les groupes de microbes archaea, ont été trouvés dans tous les environnements, y compris les zones extrêmophiles. Ces groupes de microbes se trouvent dans différents habitats et ils sont importants dans le recyclage des nutriments (azote, soufre et carbone) qui est très important dans les productions agricoles car ces nutriments sont requis par la plante en grande quantité (Odelade et Balbalola, 2019).

En fait, les archées ont été considérées comme un composant substantiel complexe des microbiomes et ont des interactions profondes avec les bactéries, les champignons et les virus dans un large éventail d'écosystèmes terrestres. Comparées aux bactéries et aux champignons du sol, les communautés d'archées sont généralement peu abondantes et ont moins de diversité et on pensait qu'elles ne se produisaient que dans des environnements extrêmes (Zhang *et al.*, 2020).

Dans le cycle de l'azote, les microbes archéens ont été établis pour participer à plusieurs étapes métaboliques. L'une des réactions est celle qui conduit à l'élimination de l'azote d'une niche écologique, par exemple la dénitrification, la respiration à base de nitrate et les autres réactions introduisent de l'azote dans l'écosystème, par exemple la fixation de l'azote et l'assimilation de l'azote (Cabello *et al.*, 2004). Récemment, des études ont révélé l'immense importance des microbes archéens dans les réactions d'oxydation de l'ammoniac, en particulier dans les océans et les sols (Francis *et al.* 2009). Dans les chaînes métaboliques, le nitrite est produit par les archées ; celui-ci est ensuite oxydé en nitrate par d'autres classes de microbes et est ensuite utilisé à la fois par les consommateurs microbiens et les plantes (Odelade et Balbalola, 2019).

Le soufre est un autre nutriment requis par les plantes en grande quantité et il a été démontré qu'il est recyclé via les microbes archéens. Dans le recyclage du soufre, l'élément est mis à la disposition d'autres microbes lorsque les microbes archéens qui se développent dans l'environnement oxydent les composés soufrés et sont libérés dans l'environnement. Les archées méthanogènes du cycle du carbone contribuent énormément à la décomposition de la matière organique en éliminant l'hydrogène. Dans un écosystème sans oxygène, ces microbes archéens se comportent comme des décomposeurs, par exemple, le traitement des eaux usées, les marais et les sédiments sont brisés par ces microbes dans les zones écologiques. L'association entre les communautés archéennes et une gamme d'autres organismes a été prouvée ; par exemple, on les trouve dans les zones des racines des plantes rhizosphériques et à la surface du corail (Odelade et Balbalola, 2019).

En raison du développement rapide de la technologie de séquençage à haut débit, des études récentes ont élargi nos connaissances sur la biologie des archées et ont découvert leurs fonctions écologiques fondamentales, voire cruciales, notamment la méthanogenèse, l'oxydation de l'ammoniac, la dégradation des hydrocarbures, réduction des sulfates, etc. Ainsi, une meilleure connaissance de la structure, de l'assemblage et de l'interaction des composants archéens dans le sol est d'une grande importance (Zhang *et al.*, 2020).

### **2.3- Les champignons mycorhiziens :**

Le terme mycorhize est un mot grec qui pourrait être divisé en « myco » et « rhiza », signifiant respectivement champignon et racine. Généralement, ce terme décrit une association entre un champignon habitant le sol et la racine d'une plante, qui est une relation symbiotique. Contrairement à la relation des rhizobiums avec leurs plantes légumineuses, les associations de champignons et de racines (associations mycorhiziennes) sont omniprésentes, cosmopolites et modérément non sélectives et se produisent chez tous les membres des gymnospermes et

## Chapitre 2 : La rhizosphère

---

environ 80 % des membres des angiospermes. Principalement, ces associations sont généralement bénéfiques à la fois pour les plantes hôtes et les colonisateurs fongiques ; cependant, des associations neutres et parasites existent (Odelade et Balbalola, 2019).

Les champignons favorisant la croissance des plantes résidant dans la rhizosphère (PGPF, plant growth promoting Fungi) sont l'une des stratégies de gestion écologique efficaces des maladies des plantes, et ils peuvent également servir de tactique alternative pour stimuler la croissance et le mécanisme de défense des plantes. L'application de PGPF réduira au minimum l'utilisation de la lutte chimique et protégera les plantes contre divers stress biotiques et abiotiques (Murali *et al.*, 2021 ; Chang *et al.*, 2021).

De nombreuses espèces de PGPF (*Trichoderma*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Gliocladium*, *Phoma*, etc.) ont été signalées jusqu'à présent pour stimuler la croissance des plantes et renforcer leur immunité innée ainsi que d'autres métabolites secondaires importants dans les plantes. Les aspects bénéfiques mentionnés ci-dessus résultent de la colonisation des racines, de la production d'hormones de croissance, de la solubilisation des minéraux essentiels, des propriétés antagonistes, de la résistance mycoparasitaire et saprophytique, ainsi que de la compétition pour l'espace et les nutriments, en plus de l'induction de la résistance systémique (ISR) chez les plantes (Murali *et al.*, 2021 ; Adelade et babalola, 2023).

L'association mycorhizienne est très cruciale dans l'acquisition des nutriments pour les plantes ; par exemple, les plantes peuvent obtenir de l'eau et des nutriments importants comme le phosphore via l'association. Il aide également à acquérir des micronutriments tels que Cu et Zn et d'autres forment les composés organiques du sol et, par conséquent, le carbone est libéré des plantes pour la subsistance de l'association. L'interface physique avec les plantes hôtes est utilisée pour catégoriser largement l'association mycorhizienne en endomycorhize et ectomycorhize (Odelade et Babalola, 2019).

Principalement, les champignons ectomycorhiziens sont présents dans les racines des plantes ligneuses telles que les arbres de la forêt. Ils forment une couverture dense en hyphes appelée manteau / gaine fongique qui se trouve au-dessus de la pointe de la racine. C'est à partir de là que les hyphes se développent dans les espaces intercellulaires, qui forment maintenant un filet appelé filet d'hyphes Hartig autour des cellules corticales de la racine, bien qu'il ne pénètre pas dans la paroi des cellules. En revanche, les hyphes des champignons endomycorhiziens se développent dans le cortex de la racine et pénètrent dans les cellules, ce qui forme une structure appelée arbuscule. L'arbuscule est une structure en éventail très ramifiée que les membranes plasmiques d'une plante séparent du cytoplasme. De plus, les champignons

endomycorhiziens pourraient également être largement classés en mycorhizes arbusculaires (AM), mycorhizes éricoïdes et orchidées spécialisées et, selon leurs noms, ils sont des colonisateurs des espèces de ces plantes particulières, par exemple la canneberge (Odelade et Babalola, 2019).

Parmi toutes les associations de mycorhizes, la relation fongique AM est la plus abondante. Dans les cas des arbuscules et du réseau de Hartig, il y a respectivement des transferts de nutriments et de carbone vers la plante et le champignon, car la surface de contact entre la plante et le champignon est augmentée par les deux associations. De plus, pendant les associations mycorhiziennes, l'endomycorhize et l'ectomycorhize exigent environ 20 à 40% du total des plantes à carbone fixe synthétisées pendant la photosynthèse ; cependant, les ectomycorhizes ne dépendent absolument pas de la plante alors que les endomycorhizes sont totalement dépendantes de la plante (Liang *et al.*, 2023).

### **2. Facteurs biotiques et abiotiques affectant l'ensemble plant-rhizosphère :**

Les conditions abiotiques qui influencent la croissance des plantes incluent la température, le pH, le type de sol, le potentiel hydrique et les concentrations en nutriments essentiels ainsi qu'en sels bio-disponibles. Les sols peuvent varier en termes de leur aptitude à soutenir la croissance des plantes. Les sols fertiles contiennent une quantité adéquate d'eau et de nutriments. La sécheresse et la salinisation sont des problèmes majeurs et croissants qui entravent la croissance des plantes (Woźniak, et Gałązka, 2019).

En contraste, les facteurs biotiques de la rhizosphère incluent les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons, ainsi que de petits organismes tels que les amibes, les larves d'insectes, les acariens, les nématodes et les protozoaires (Odelade et Babalola, 2019).

### **3. Interactions entre plante-rhizo-microbiome :**

La rhizosphère constitue l'un des écosystèmes les plus complexes de la planète, étant considérée comme un point central des interactions entre les plantes et les microbes. Le microbiome des plantes et de la rhizosphère a évolué conjointement pour des avantages mutuels. Les plantes fournissent des métabolites carbonés et azotés au microbiome de la rhizosphère par l'exsudation racinaire. En retour, les micro-organismes bénéfiques contribuent à l'absorption des nutriments, à la régulation des phytohormones et à la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (Kong et Liu, 2022).

Les interactions entre les plantes et les micro-organismes sont variées, allant des interactions étroites positives ou négatives, incluant le mutualisme (symbiose), le parasitisme

et le commensalisme. Les interactions positives comprennent celles avec des micro-organismes tels que les rhizobiums, les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGRB - Plant Growth Promotion Bacteria) et les mycorhizes, qui aboutissent à des bénéfices tels que la stimulation de la croissance, l'amélioration de l'accès aux nutriments et la protection contre les stress environnementaux, qu'ils soient abiotiques ou biotiques. En contraste, les interactions entre les plantes et les agents pathogènes microbiens mènent à des conséquences négatives, c'est-à-dire aux maladies végétales (Jamil *et al.*, 2022).

Les exsudats racinaires des plantes (Figure 3) jouent un rôle essentiel dans leur communication avec l'environnement biotique, orchestrant une multitude de réponses incluant l'absorption des nutriments, la compétition pour les ressources, la signalisation au sein de la même espèce, l'attraction des micro-organismes, et bien d'autres interactions encore (Pantigoso *et al.*, 2022).

<b>TABLE 1.1</b> <b>Organic Compounds Released by Plant Roots</b>
<b>Sugars and Polysaccharides</b>
Arabinose, desoxyribose, fructose, galactose, glucose, maltose, mannose, mucilages of various compositions, oligosaccharides, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, xylose
<b>Amino Acids<sup>a</sup></b>
$\alpha$ -alanine, $\beta$ -alanine, $\alpha$ -amino adipic, $\gamma$ -amino butyric, arginine, asparagine, aspartic, citrulline, cystathionine, cysteine, cystine, deoxymugineic, 3-epihydroxymugineic, glutamine, glutamic, glycine, homoserine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, mugineic, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine
<b>Organic Acids<sup>a</sup></b>
Acetic, aconitic, aldonic, ascorbic, benzoic, butyric, caffeic, citric, <i>p</i> -coumaric, erythronic, ferulic, formic, fumaric, glutaric, glycolic, glyoxilic, lactic, malic, malonic, oxalacetic, oxalic, <i>p</i> -hydroxy benzoic, piscidic, propionic, pyruvic, succinic, syringic, tartaric, tetric, valeric, vanillic
<b>Fatty Acids<sup>a</sup></b>
Linoleic, linolenic, oleic, palmitic, stearic
<b>Sterols</b>
Campesterol, cholesterol, sitosterol, stigmasterol
<b>Growth Factors</b>
<i>p</i> -amino benzoic acid, biotin, choline, <i>n</i> -methyl nicotinic acid, niacin, pantothenic, vitamins B <sub>1</sub> (thiamine), B <sub>2</sub> (riboflavin), and B <sub>6</sub> (pyridoxine)
<b>Enzymes</b>
Amylase, invertase, peroxidase, phenolase, phosphatases, polygalacturonase, protease
<b>Flavonones and Nucleotides</b>
Adenine, flavonone, guanine, uridine or cytidine
<b>Miscellaneous</b>
Auxins, <i>p</i> -benzoquinone, scopoletin, hydrocyanic acid, 8-hydroxyquinoline, glucosides, hydroxamic acids, luteolin, unidentified ninhydrin-positive compounds, unidentified soluble proteins, reducing compounds, ethanol, glycinebetaine, inositol and myo-inositol-like compounds, Al-induced polypeptides, dihydroquinone, quercetin, quercitrin, sorgoleone

**Figure 03 :** Les composés organiques libérés par les racines des plantes (Pinton *et al.*, 2007).

**Deuxième partie :**  
*Matériels et méthodes*

### 1. Préparation du sol avec inoculum :

Le sol utilisé est un sol naturellement salin provenant de la région du Rocher de Sel de la rhizosphère du *Tamarix articulata*. La salinité du sol est de l'ordre de 8.5 dS.m<sup>-1</sup> le pH est acide (5.95). Une texture limono-sableuse et une teneur en calcaire total de 7.49%. Le sol choisi a été prélevé en 2020 et conservé à température ambiante dans des sachets en plastiques hermétique.

La préparation de l'expérimentation consiste à diviser le sol en trois parties : une partie utilisée à l'état naturel est considéré comme témoin et une deuxième partie auquel nous avons ajouté 1/3 d'inoculum mycorhizien native des sols salins steppiques. Et à la troisième partie nous avons ajouté le même inoculum mycorhizien que pour la deuxième partie additionnée d'une souche de bactérie rhizobienne dans la deuxième partie. Ces mélanges de sols ont servi de substrat pour les deux variétés de *Medicago sativa* étudiées.

### 2. Plantation de *Medicago sativa* :

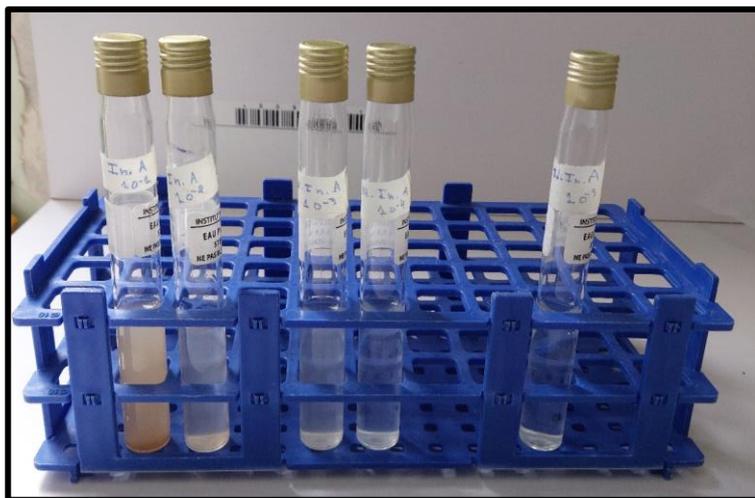
Dans cette étude, nous avons effectué trois plantations des graines de deux variétés de *Medicago sativa* : Var. américaine, et Var. Italienne. Chacune de ces variétés a été plantée dans trois substrats différents, qui avaient été préparés au préalable. Ces substrats comprennent : une plantation dans un substrat sans inoculum, une autre dans un substrat avec inoculum mycorhizien, et enfin, une troisième plantation dans un substrat avec inoculum mycorhizien plus bactéries rhizosphériques rhizobiennes. Le protocole est le suivant : 3 traitements X deux variétés d'espèces végétales.

### 3. Isolement des microorganismes de la rhizosphère :

Après une croissance de deux semaines de *Medicago Sativa*, nous avons récupéré 10g de sol de la rhizosphère pour préparer la solution mère et les dilutions.

#### 3.1. Dilution :

Dans un tube à essai, nous avons mis 10 g de sol rhizosphérique dans 10 ml du tampon PBS (la composition est indiquée dans l'annexe 01). Une fois la solution mère préparée, nous réalisons des dilutions décimales comme suit : nous ajoutons 1 ml de la solution mère à 9 ml d'eau distillée pour obtenir la dilution 10<sup>-1</sup>, puis 1 ml de cette dernière dilution est prélevé et ajouté à 9 ml d'eau distillée pour obtenir la dilution de 10<sup>-2</sup>, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10<sup>-5</sup> (Figure 04).



**Figure 04 :** Préparation des dilutions.

### 3.2. Ensemencement :

Un ensemencement en surface de chaque dilution est effectué dans les milieux de culture YMA, NBRIP, King B, King A, BURK, LB (dont la composition est mentionnée dans l'annexe 01). Le but de chaque milieu est le suivant :

#### 3.2.1 Recherche de la pyoverdine :

Sur milieu solide « King B », l'incubation a été faite à 28°C pendant 24 h. Le développement du pigment fluorescent a été révélé sous lumière ultraviolette (UV) à 365 nm.

#### 3.2.2 Recherche de la pyocyanine :

Sur milieu solide « King A » (Annexe 01) à 28°C pendant 24 h. Le développement du pigment fluorescent a été révélé sous lumière ultraviolette (UV) à 365 nm.

#### 3.2.3 Détection du Rhizobium :

YMA est l'un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de Rhizobia sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. L'incubation des bactéries a été faite à 28°C pendant 48 h.

#### 3.2.4 Recherche des microorganismes solubilisateurs de phosphate naturel (PSM) :

Sur le milieu NBRIP à incubation 28°C, ce milieu de criblage sélectionne des microorganismes capables d'utiliser les formes insolubles du phosphate inorganique et de produire des zones claires autour des colonies.

#### 3.2.5 Recherche des microorganismes fixateurs d'azote :

Nous avons utilisé le milieu BURK à incubation 30°C, ce milieu contient des sels inorganiques ainsi qu'une source de glucides mais manque de source d'azote. Les bactéries

fixatrices d'azote sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de se développer lorsqu'elles sont cultivées sur ce milieu sans azote.

### **3.3. Etude macroscopique et purification :**

Il s'agit de l'étude morphologique des colonies à l'aide d'une loupe binoculaire pour déterminer les types de colonies en fonction de caractères tels que la taille, la couleur, l'opacité, la forme, l'élévation et la surface.

### **3.4. Coloration de gram et étude microscopique :**

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par le bactériologiste Hans Christian Gram. Après coloration, les bactéries Gram<sup>+</sup> deviennent violettes alors que les bactéries Gram<sup>-</sup> apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram<sup>+</sup> ou Gram<sup>-</sup> est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram<sup>+</sup> gardent la coloration violette. Les bactéries Gram<sup>-</sup>, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram<sup>-</sup>, on recolore avec de la fuschine (rose). Les bactéries Gram<sup>+</sup> resteront violettes alors que les Gram<sup>-</sup> seront maintenant teintées en rose. Bien que le résultat de la coloration de Gram puisse dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissances...) elle reste cependant la technique de base de la bactériologie.

### **3.5. Test biochimiques :**

#### **3.5.1 Citrate de Simmons :**

Ce test a pour but de déterminer la capacité du microorganisme à utiliser le citrate comme source de carbone et l'ammoniac comme source d'azote. On fait des stries à l'aide d'une anse de platine sur le milieu citrate de Simmons incliné, incubation 38°C pendant 24h.

#### **3.5.2 Indole :**

Ce test sert à mettre en évidence la capacité du microorganisme à dégrader le tryptophane et produire de l'indole, On prélève une colonie et on l'inocule dans un bouillon d'eau peptonée exempt d'indole, incubation 37°C pendant 24h. Ensuite, quelques gouttes du réactif Kovacs sont additionnées avec un temps de repos d'une minute. Par la suite nous examinons la couche extérieure.

### 3.5.3 Nitrate :

Ce test détermine si la bactérie capable de produire l'enzyme nitrate réductase, qui hydrolyse le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). Un inoculum est incubé dans un bouillon nitraté pendant 24h à température 37°C. nous ajoutons ensuite une goutte du réactif nitrite 1 (acide sulfanilique) puis une goutte du réactif nitrite 2 (0.5 % de N,N-diméthyl-alpha-naphtylamine).

### 3.5.4 Triple Sucre Fer (TSI) :

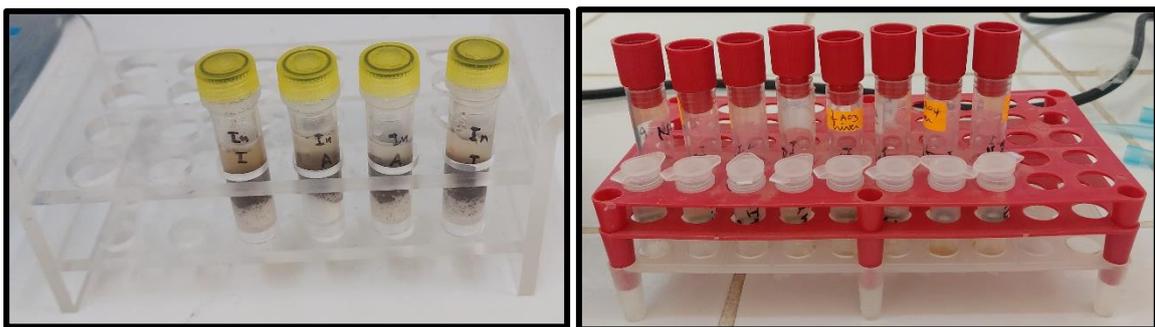
La gélose triple sucre-fer est conçue pour différencier les organismes en fonction de la fermentation des glucides tels que le glucose, le lactose et le saccharose, ainsi que la production de sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ . À l'aide d'une anse de platine, on réalise une piqure centrale puis des stries sur la pente de la gélose, incubation à 38°C pendant 24h.

### 3.5.5 Catalase :

La catalase intervient dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxygène et en eau. Un petit inoculum d'un isolat bactérien est mélangé à une solution de peroxyde d'hydrogène (3%). Une réaction positive par une formation rapide de bulles d'oxygène. Le manque de catalase est évident par un manque ou une faible production de bulles.

## 4. Extraction d'ADN du sol (kit Macherey Nagel) :

L'extraction de l'ADN du sol rhizosphérique a été réalisée selon le protocole décrit par Meglouli (2016). Le principe est simple : récupérer 250 mg de sol bien frais et lui faire subir une série de réactions chimiques disponibles dans le kit Macherey Nagel.



**Figure 05** : Extraction de l'ADN.

### 5. Mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'extrait polyphénolique de *Medicago sativa* :

Nous avons utilisé deux milieux de culture pour cette étape : la gélose nutritive (GN) pour effectuer la croissance des souches jeunes des bactéries pathogènes et le milieu Mueller Hinton (MH) pour tester l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques.

#### 5.1.Préparation de la suspension bactérienne :

- Les souches bactériennes pathogènes sont ensemencées sur milieu (GN) puis incubées 37°C pendant 24 heures.
- Après la purification, à l'aide d'une anse de platine des colonies sont inoculées dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile (Figure 6).



**Figure 06** : Les suspensions des souches bactériennes pathogènes.

#### 5.2.Préparation de l'extrait :

Les extraits polyphénoliques des deux variétés de *M. sativa* étudiées ont été réalisés par nos collègues de la spécialité Biotechnologie végétale qui travaillent sur la même thématique que nous. Elles nous ont fournis des extraits séchés au quels nous avons ajouté de l'éthanol pure afin de les éluer (Figure 7).



**Figure 07 :** Préparation de l'extrait de *Medicago sativa*.

### **5.3.Préparation des disques :**

- Autoclaver les disques Wattman, puis sont trempés dans l'extrait polyphénols de *Medicago sativa* avec une quantité approximative de 20 $\mu$ l pour chaque disque.

### **5.4.Méthode de diffusion :**

- Un écouvillon stérile est prolongé dans la suspension bactérienne, l'excès de liquide est éliminé en tournant l'écouvillon sur la paroi du tube.

- Ensemencement par inondation frotter l'écouvillon sur toute la plaque de la gélose MH par stries.

- A l'aide d'une pince stérile, on dépose les disques trempés par l'extrait sur la gélose ensemencé plus un disque témoin.

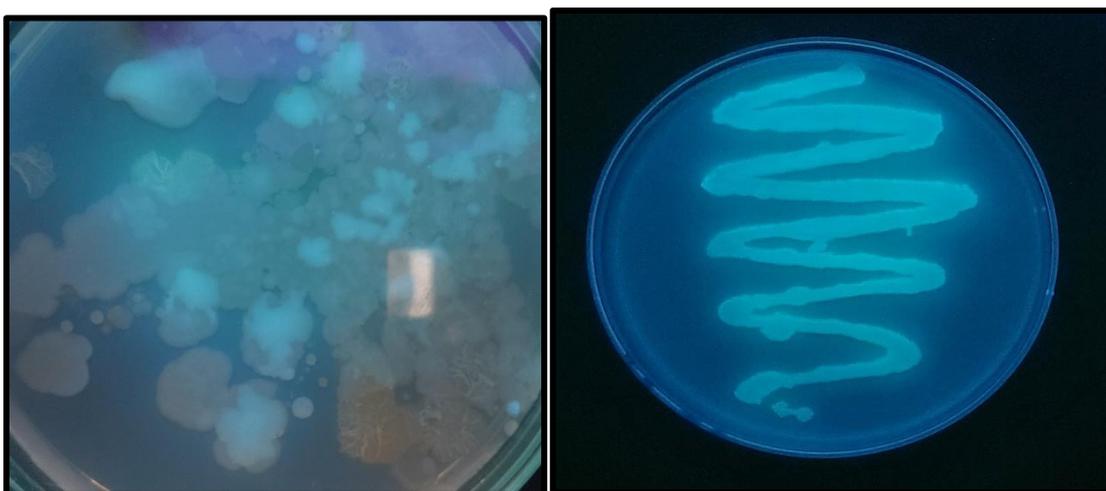
**Troisième partie :**  
*Résultats et discussion*

### 1. Etude macroscopique des colonies :

Afin de déterminer les caractéristiques macroscopiques des colonies bactériennes, nous avons effectué deux lectures : une après 24h et la deuxième après 48h à partir de l'ensemencement des bactéries. Nous avons dénombré les différents types de colonies bactériennes observées, à savoir : L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, PS1, PS2, PS3, PS4, AZ, AX, A1, AJ, AC2, AO, AA, AB, KB1, KB2, AX1, AX2. (Annexe 02).

### 2. Détection de la pyoverdine :

Dans le milieu King B, la coloration fluorescente jaune-vert de la souche KB1 a été détectée par l'UV, ce qui constitue un indicateur de la présence de *Pseudomonas fluorescens* (Figure 08).



**Figure 08** : Photos représentatives de la détection de la fluorescence de la souche KB1 sur milieu King B avant purification (à gauche) et après purification (à droite).

### 3. Détection de la pyocyanine :

Pour les souches bactériennes que nous avons isolées sur le milieu King A, aucune fluorescence n'a été détectée.

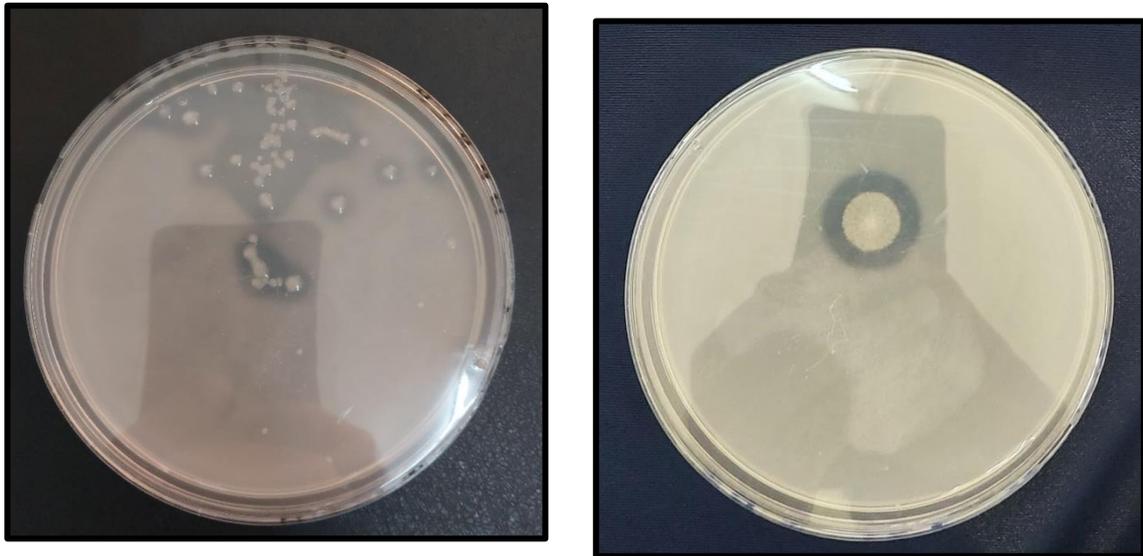
### 4. Croissance sur le milieu YMA :

Les colonies de nos souches isolées présentaient un diamètre compris entre 2 et 5mm. Elles étaient de couleur blanche laiteuse, translucides, brillantes et de forme circulaire, surélevées. D'autres souches avaient les mêmes caractéristiques morphologiques, à l'exception de la couleur qui était jaune. La famille de bactéries Rhizobiaceae peut être divisée en deux

groupes principaux : les rhizobiums à croissance rapide, dont les colonies sont de couleur jaune, et ceux à croissance lente, dont les colonies sont blanches. Ces caractéristiques sont décrites par Jordan en 1984. De plus, les résultats de la coloration de Gram ont confirmé la présence de rhizobium. Les souches se sont avérées Gram négatives.

### 5. Croissance sur le milieu NBRIP :

Ce milieu est spécifiquement conçu pour isoler les bactéries de la rhizosphère qui possèdent la capacité de solubiliser le phosphate. Pour déterminer cette capacité, la formation d'un halo doit être observée autour de la colonie. Nous avons isolé quatre souches qui ont présenté ce halo caractéristique (Figure 9). Toutes ces colonies se sont avérées être Gram positives.



**Figure 09 :** Photos représentatives des microorganismes solubilisateurs de phosphate naturel (PSM) par la présence d'un halo.

### 6. Détection des bactéries fixatrices de l'Azote :

Selon le protocole de Wilson et Kgnite ainsi que par Park *et al.* (2005), toute croissance observée sur le milieu Burk's N-Free indique la capacité des bactéries à fixer l'azote (Figure 10).



**Figure 10** : Souches fixatrices d'azote sur le milieu BURK's N-Free.

### 7. Coloration de gram :

Nos résultats de la coloration de Gram ont révélé des caractéristiques distinctes des bactéries étudiées. Les bactéries à Gram positif ont réagi en retenant la coloration violette du cristal violet, apparaissant sous forme de cocci ou de bacilles violets au microscope. En revanche, les bactéries à Gram négatif ont perdu la coloration violette et ont pris une coloration rose due à la contre-coloration à la fuschine. Cette différence dans la réaction à la coloration de Gram souligne la diversité des parois cellulaires et des structures des membranes des bactéries présentes dans notre échantillon. Ces résultats sont essentiels pour la classification des bactéries et offrent des informations précieuses sur la composition de la population bactérienne étudiée, contribuant ainsi à notre compréhension de la microbiologie de l'échantillon analysé.

**Tableau N°2** : Les résultats de la coloration de gram.

Code des souches	Gram
L1	-
L2	+
L3	-
L4	-
L5	+
L6	-
L7	+
L8	-
L9	-
L10	-
L11	-

## Résultats et discussion

L12	-
L13	+
L14	+
L15	-
L16	+
PS1	+
PS2	+
PS3	+
PS4	+
AZ	-
AX	-
A1	-
AJ	-
AC2	-
AO	-
AA	-
AB	-
KB1	-
KB2	-
AX1	-
AX2	-

Les résultats de cette coloration différentielle ont révélé que 73,4% des souches isolées sont Gram négatives, tandis que 26,6% sont Gram positives.

### 8. Test biochimiques :

Les tests biochimiques réalisés pour identifier les différentes souches bactériennes nous ont permis de consigner les résultats présentés dans le tableau 3.

**Tableau N°3 :** Les résultats des tests biochimiques.

Code de la souche	Citrate de Simmons	TSI	Indole	Nitrate	Catalase
L1	+	+	+	+	+
L2	-	-	-	+	+
L3	+	-	+	+	+
L4	-	+	-	+	+
L5	-	+	-	+	-
L6	-	+	-	-	+
L7	+	+	+	+	-
L8	+	-	-	+	+
L9	+	+	+	-	+
L10	-	+	+	-	-
L11	+	+	+	-	+
L12	+	+	+	+	+
L13	-	+	+	-	+
L14	+	+	+	+	+

## Résultats et discussion

<b>L15</b>	-	+	-	-	+
<b>L16</b>	-	+	-	+	+
<b>PS1</b>	-	+	-	+	-
<b>PS2</b>	-	+	-	-	-
<b>PS3</b>	-	+	-	-	-
<b>PS4</b>	-	+	-	-	-
<b>AZ</b>	-	-	-	-	+
<b>AX</b>	-	-	-	+	+
<b>A1</b>	-	-	+	+	+
<b>AJ</b>	-	-	+	-	-
<b>AC2</b>	-	-	-	-	-
<b>AO</b>	-	-	+	+	+
<b>AA</b>	+	-	+	+	+
<b>AB</b>	+	-	+	-	+
<b>KB1</b>	-	-	-	+	+
<b>KB2</b>	-	+	-	+	+
<b>AX1</b>	-	+	+	+	+
<b>AX2</b>	-	-	+	+	+

Les résultats des tests biochimiques révèlent tout d'abord, en ce qui concerne le test de Citrate de Simmons, que seules les souches positives utilisent le citrate comme source de carbone. De plus, seules les bactéries possédant la perméase du citrate et étant prototrophes (c'est-à-dire n'ayant pas besoin de facteurs de croissance métaboliques) peuvent se développer dans ce milieu. Sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure que 10 souches sont Citrate Simmons + et sont capables de se nourrir de citrate.

En ce qui concerne le test TSI, nous avons constaté que 19 de nos souches ont réagi positivement, ayant effectué la fermentation des trois sucres sans produire de gaz ni de H<sub>2</sub>S. En ce qui concerne le test d'indole, 16 souches ont montré des résultats positifs, tandis que les autres souches n'ont pas produit d'indole, suggérant qu'elles appartiennent probablement aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*.

De plus, nous avons identifié 19 souches avec un résultat positif au test de Nitrate. En outre, 23 souches ont réagi de manière positive au test de la catalase.

### 8.1. Test catalase :

L'activité de la catalase constitue un trait important chez les bactéries, car elle les aide à se défendre contre le peroxyde d'hydrogène, un composé toxique pour les bactéries ainsi que pour les racines des plantes. De ce fait, la mesure de l'activité catalase permet de confirmer la résistance de la souche bactérienne et sa capacité à résister dans la rhizosphère.

Le test de catalase est couramment utilisé pour différencier certains genres de bactéries Gram-positives, tels que *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* et *Micrococcus*, car ces genres bactériens sont généralement catalase-positifs. Ce test permet d'établir si une bactérie est Gram-positif ou Gram-négatif en fonction de la présence ou de l'absence de l'enzyme catalase, simplifiant ainsi le processus d'identification en réduisant d'abord le groupe de bactéries à considérer en fonction de cette caractéristique. Cependant, au sein des bactéries Gram-négatives, le test de la catalase n'est pas principalement utilisé pour différencier les genres spécifiques.

Parmi nos souches isolées, 71,86% se sont révélées catalase positives, tandis que 28,13% ne l'étaient pas (Figure 11).



**Figure 11** : Test catalase positive à droite et négative à gauche.

### 8.2. Test indole :

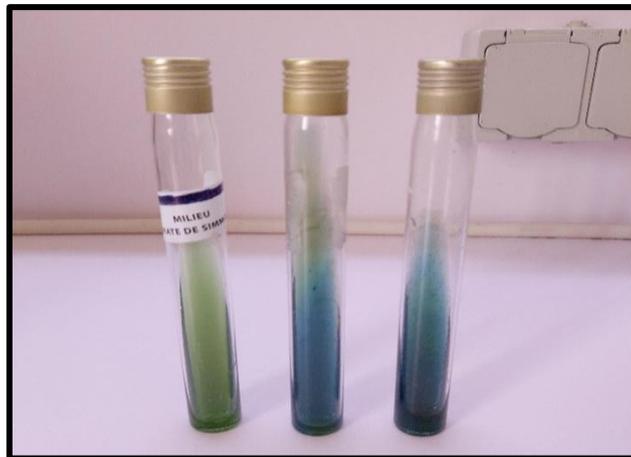
L'indole est un précurseur important synthétisé par les bactéries, jouant un rôle crucial dans le développement des plantes ainsi que dans les interactions entre les bactéries de la rhizosphère et entre les bactéries et la plante. Parmi nos isolats, 50 % ont été testés positifs à la présence d'indole, tandis que les 50 % restants se sont avérés négatifs. Ce pourcentage est calculé selon le résultat obtenu pour discuter la prévalence des positives et négatives.



**Figure 12 :** Test indole positive à droite et négative à gauche.

### 8.3. Citrate de Simmons :

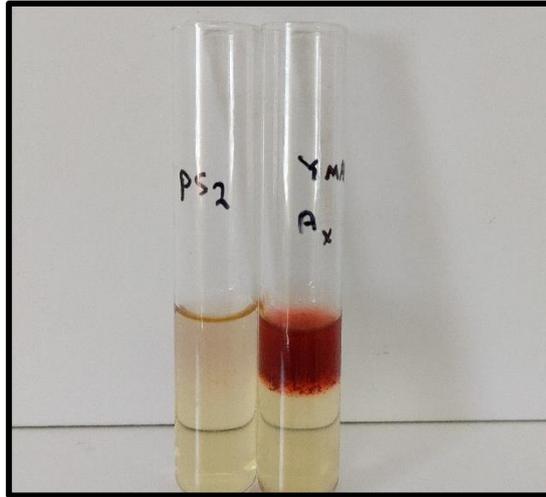
68,75% de nos souches isolées ont été négatives pour ce test et 31,25% ont été positives, ce qui est un trait caractéristique des bactéries rhizosphériques.



**Figure 13 :** Test de citrate de Simmons positive à droite et négative à gauche.

### 8.4. Test nitrate :

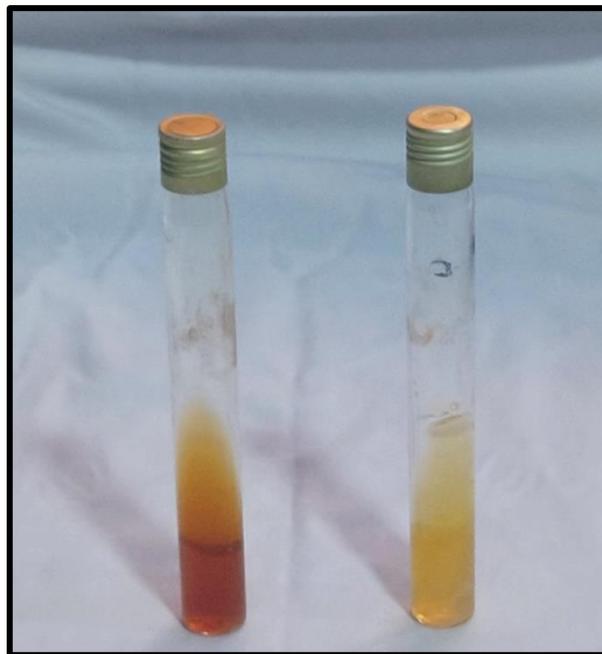
59,38% de nos résultats se sont révélés positifs au test du nitrate, tandis que 40,62% ont été négatifs.



**Figure 14** : Test de nitrate positive à droite et négative à gauche.

### 8.5. Test TSI (Triple Sugar Iron):

Toutes les souches qui ont donné un résultat négatif n'ont pas présenté de fermentation des sucres ni de production de gaz ou de H<sub>2</sub>S. Les souches qui ont obtenu un résultat positif ont fermenté les trois sucres (glucose, saccharose et lactose), mais elles se sont avérées négatives pour la production de gaz et de H<sub>2</sub>S.



**Figure 15** : Test TSI positive à droite et négative à gauche.

### 9. Extraction d'ADN et absorbance UV :

La quantité d'ADN est quantifiée par spectroscopie UV à une absorption max de 260nm.  $A_{260}=1$  correspond à 50 $\mu$ g/ml de double brin d'ADN. Le ratio de pureté  $A_{260}/A_{230}$  est utilisé

## Résultats et discussion

pour déterminer la pureté de l'ADN. Il doit être supérieur à 2 pour l'ADN pure. La valeur d'ADN est acceptable à 1,5. Le Ratio de pureté A260/A280 doit être situé entre 1,8 – 1,9.

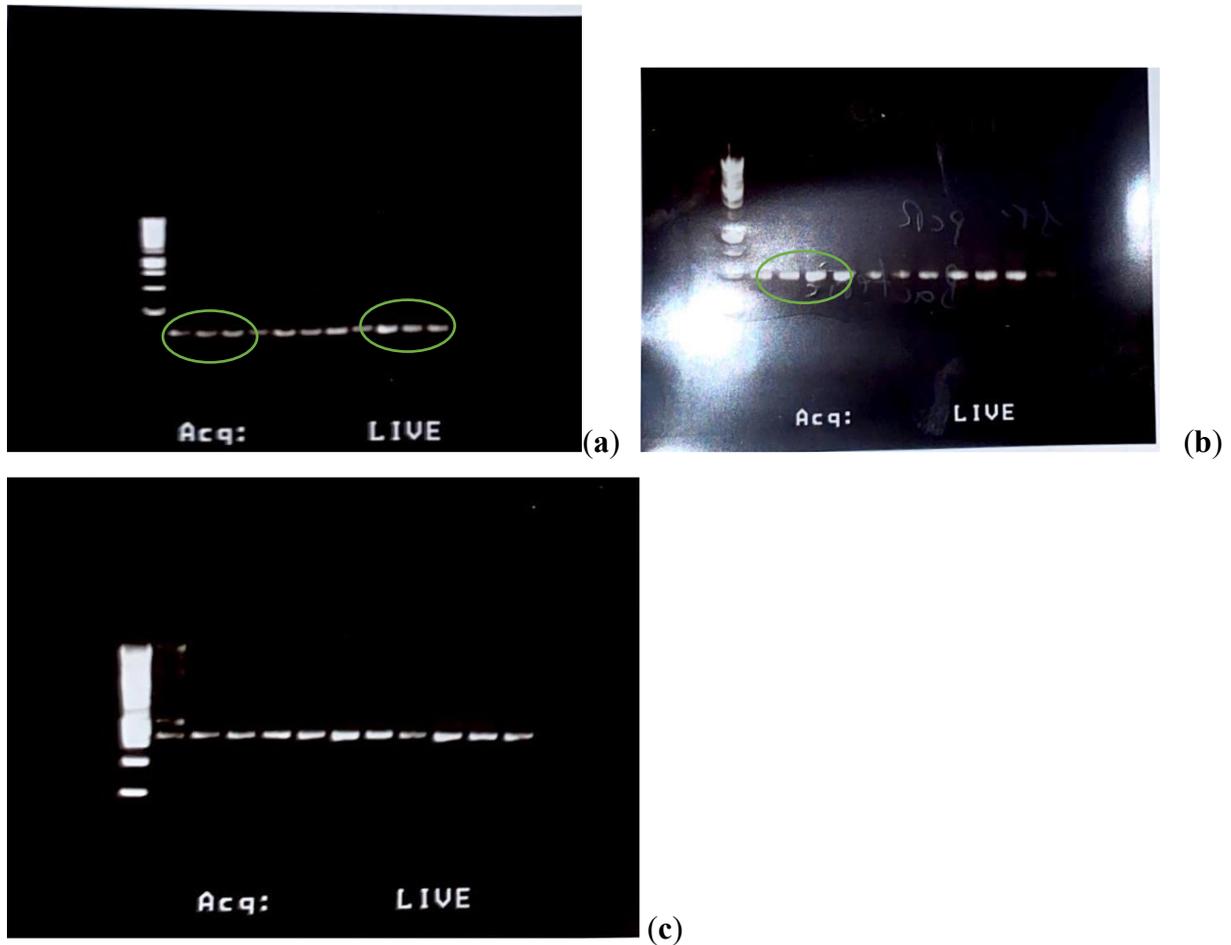
Les valeurs des quantités d'ADN sont présentées dans le tableau N°4. La détermination de la quantité d'ADN permet d'évaluer l'abondance des micro-organismes du sol et d'estimer leur diversité. L'ADN s'avère être un indicateur fiable de la biodiversité microbienne des sols. En général, plus la quantité d'ADN est élevée, plus la biodiversité microbienne dans le sol est considérée comme importante. Le tableau N°4 montre que l'ADN est pur pour les traitements d'inoculation combinée CMA + la bactérie rhizosphérique (N.IN.Vi) pour les deux variétés de *Medicago* étudiées. En revanche, les traitements d'inoculation avec le CMA seul ainsi que les sols non-inoculés présentent des quantités d'ADN plus faibles (Tableau 4).

**Tableau N°4 : Résultats d'absorbance de l'ADN d'UV.**

	Quantité (pb)	260/230nm	260/280nm
<b>N.In.Vi</b>	75.01	2.35	0.75
<b>N.IN.Vi</b>	80.22	2.94	0.36
<b>In.Va</b>	59.67	2.04	0.89
<b>In.Va</b>	27.43	1.42	0.55
<b>In.Vi</b>	38.40	4.22	0.81
<b>In.Vi</b>	64.78	2.08	1.12
<b>N.In.Va</b>	65.04	2.59	0.85
<b>N.In.Va</b>	62.19	1.96	1.12
<b>A1</b>	76.28	2.34	0.92
<b>A2</b>	70.15	1.76	0.59
<b>I1</b>	79.7	1.43	1.03
<b>I2</b>	89.71	1.65	0.72

Une PCR d'amplification a été réalisé pour nos extraits d'ADN des sols étudiés avec des amorces spécifiques pour les champignons mycorhiziens arbusculaire, pour les ITS et pour les bactéries. La migration sur gel d'agarose a été réalisée avec un ladder à 750pb. Cette analyse a été établie par notre promotrice au laboratoire de l'ULCO en France. Les résultats de

l'amplification sont évalués par électrophorèse. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 16.



**Figure 16 :** Résultats de la PCR d'amplification pour les microorganismes rhizosphériques.

**a.** les ITS, **b :** les CMA et **c** les bactéries rhizosphériques. La migration a été réalisée à 750 pb. Cette technique nous a permis d'identifier les fragments d'ADN découpés par des enzymes des trois groupes de microorganismes les plus importants dans la rhizosphère et en même temps d'établir les empreintes génétiques par Southern Blot. Cette étape d'analyse des résultats est en cours de réalisation.

Les résultats de la figure 16 montrent que la richesse microbienne au niveau de la rhizosphère varie en fonction de l'inoculum et du groupe de microorganisme étudié. Les ITS sont stimulés par l'inoculum composées de CMA et de bactérie. Les CMA ne sont pas fortement stimulés par les inoculum et les bactéries sont stimulées par l'inoculum à base de CMA.

**10. L'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique des deux variétés de *Medicago sativa* cultivés sous les trois traitements :**

L'activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques fournis par nos collègues de la spécialité Biotechnologie végétale, qui travaillent sur la même thématique, ces extraits ont été testés sur 6 souches pathogènes pour l'homme. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°5.

**Tableau N°5 :** Les résultats de zones d'inhibition des disques.

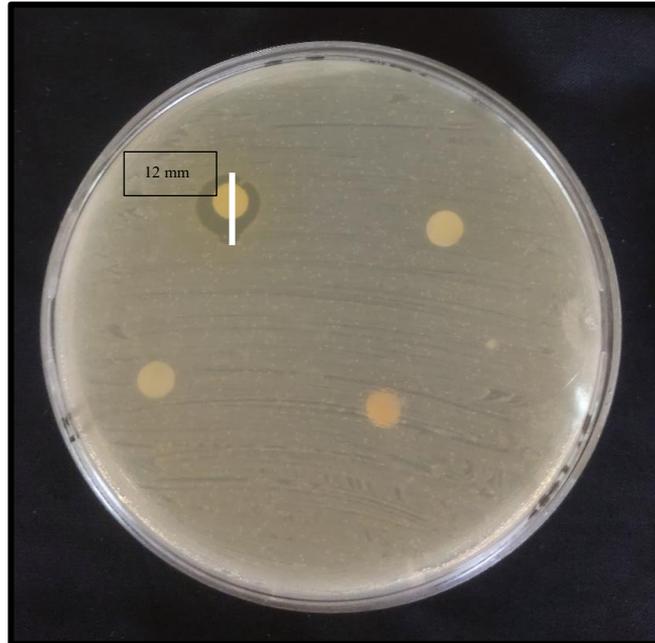
	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Strepto</i>	<i>Staphy</i>	<i>Proteus</i>
<b>Variété Américaine inoculé avec CMA sans bactéries</b>	6mm	6mm	10mm	8mm	8mm	8mm
<b>Variété Italienne inoculé avec CMA sans bactéries</b>	8mm	8mm	6mm	8mm	8mm	8mm
<b>Variété Américaine avec CMA + bactéries</b>	8mm	12mm	8mm	10mm	8mm	8mm
<b>Variété Italienne avec CMA + bactéries</b>	6mm	8mm	8mm	6mm	6mm	6mm
<b>Variété naturel Américaine Non inoculé</b>	10mm	8mm	8mm	8mm	10mm	10mm
<b>Variété naturel Italienne Non inoculé</b>	6mm	10mm	13mm	10mm	8mm	12mm

Le diamètre du disque utilisé dans cette étude était de 6mm. Les résultats indiquant un diamètre de 6 mm suggèrent que certaines souches étaient résistantes à l'extrait de *Medicago sativa*, tandis que les autres souches ont montré une sensibilité à cet extrait. Dans nos résultats, l'extrait de luzerne a démontré une meilleure activité antibactérienne contre *E. coli*, *K.*

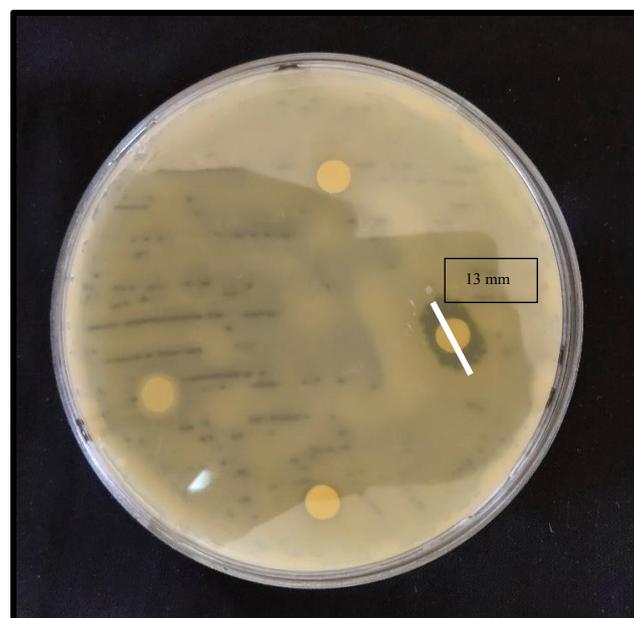
## Résultats et discussion

---

*pneumoniae*, *S. aureus* et *P. mirabilis*. Cependant, les effets antibactériens sur *P. aeruginosa* ont été considérés comme ordinaire.



**Figure 17** : Zone inhibition 12mm pour *E. coli* (l'extrait de *M. sativa* variété Américaine avec CMA + bactéries).



**Figure 18** : Zones inhibition 13mm pour *K. pneumoniae* (l'extrait de *M. sativa* variété naturel Italienne non inoculé).

L'extrait provenant de la variété américaine inoculée avec les CMA additionnée aux bactéries a présenté la meilleure efficacité contre *E. coli* et *S. aureus*. De son côté la variété américaine inoculé avec les CMA seuls a présenté un résultat intéressant contre la bactérie pathogène *K. pneumoniae*.

### **Discussion :**

La présente étude vise à étudier la biodiversité rhizosphérique de deux variétés de *Medicago sativa* (Var. américaine et Var. italienne) cultivées sur un sol naturellement salin. Ces variétés ont été étudiées après l'ajout de deux inoculums : le premier à base de CMA et le deuxième à base de CMA additionnée avec une bactérie rhizosphérique du genre *Rhizobium*. Ces résultats sont comparés à des témoins sans inoculums.

En premier lieu, nous avons tenté d'évaluer la richesse bactérienne de la rhizosphère en utilisant les méthodes de microbiologie classique. En effet, les bactéries rhizosphériques, qui favorisent la croissance des plantes, sont reconnues pour améliorer le développement des végétaux en augmentant la disponibilité des macronutriments lors de la colonisation des racines des plantes. Comparativement à d'autres genres, *Pseudomonas* est le symbiote le plus apprécié en raison de ses propriétés significatives à la fois dans la croissance des plantes et dans la régulation des phytopathogènes lorsqu'il interagit de manière synergique avec la plante hôte. Ces propriétés englobent la production de sidérophores, la solubilisation du phosphate, la fixation de l'azote, la synthèse de phénazines, d'antibiotiques et la stimulation d'une résistance systémique, comme observé chez différentes espèces de *Pseudomonas* telles que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas syringae* (Sah *et al.*, 2021).

Grâce à l'utilisation du milieu sélectif YMA nous avons pu isoler les souches du genre *Rhizobium*. En effet, il est connu que la famille de bactéries Rhizobiaceae se divise en deux groupes : les rhizobiums à croissance rapide, dont les colonies sont de couleur jaune, et ceux à croissance lente, dont les colonies sont blanches en plus d'une coloration identifiant les Gram négatives (Jordan, 1984). Nos résultats concordent avec ceux de Ondieki (2017) qui avaient évalué les caractéristiques morphologiques des rhizobiums nodulants le niébé isolé à partir d'échantillons de sol prélevés dans les champs des agriculteurs de la région de l'est du Kenya.

Nos résultats ont permis de constater que les bactéries isolées sont majoritairement Gram-négatives. Ce qui est en accord avec les travaux de Kennedy, (2005). En effet, les bactéries Gram négatives sont prédominantes dans la rhizosphère, parmi celles-ci, les bactéries colonisatrices des racines qu'elles soient endophytes ou exophytes. Le genre le plus dominant dans le sol est le genre *Pseudomonas*.

Le test catalase nous a permis de constater qu'un nombre intéressant des souches isolées sont « catalase positive ». En conséquence, ces souches dotés d'une activité catalase sont en mesure de survivre dans la rhizosphère, favorisant ainsi indirectement la croissance des plantes, c'est un phénomène fréquemment rencontré chez les PGPR (Bumunang et Babalola, 2014). Nos résultats concordent avec ceux de Boufares *et al.* (2023) qui ont démontré l'hypothèse que les rhizobactéries isolées possèdent plusieurs caractéristiques favorables à la croissance des plantes (PGP) et qu'elles peuvent être employées en tant que biofertilisants pour stimuler la croissance du blé (*Triticum durum* L.) en situation de stress lié à la salinité. Les souches bactériennes présentant une activité catalase doivent être hautement résistantes aux contraintes environnementales, mécaniques et chimiques (Kumar *et al.*, 2012).

Dès 1889, le test indole est utilisé comme moyen de distinguer entre *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes*. Ce test a été généralisé sur les autres souches bactériennes afin de rechercher la capacité d'un organisme à dégrader le tryptophane et produire de l'indole. La production d'indole est mise en évidence par l'addition du réactif de Kovacs, qui réagit avec l'indole en produisant une coloration rouge. L'indole joue un rôle crucial dans la vie des plantes ainsi que dans les interactions entre les bactéries de la rhizosphère et les bactéries associées à la plante hôte. Nos résultats ont montré que 50% de nos souches sont testés positifs. Ce pourcentage est calculé selon le résultat obtenu pour discuter la prévalence des positives et négatives. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Das *et al.*, (2019), dont l'étude a été menée pour isoler les bactéries potentiellement productrices d'acide indole acétique de la région du sud-ouest de Khulna au Bangladesh, suivie de leur caractérisation et analyse.

Les résultats du test citrate de Simmons ont révélé plus de 68% de souches négatives. Généralement, les bactéries rhizosphériques répondent négativement à ce test, cela pourrait être dû à la complexité de la molécule de citrate en termes de volume de ses groupes fonctionnels (trois groupes carboxyle), par rapport aux autres sources de carbone utilisées par ces micro-organismes qui comprennent essentiellement des sucres, des alcools et des acides organiques (Gaurav *et al.*, 2016), nos résultats sont en accord avec les travaux de Perez *et al.*, (2019).

De son côté, le test nitrate a révélé plus de 59% de souches positives. Ce qui est compatible avec les travaux de Godbole *et al.*, (2021), qui ont travaillé sur l'isolement et caractérisation des trois groupes de PGPR : les solubilisants de phosphate, les producteurs d'acide indole acétique et les producteurs de sidérophores à partir des échantillons de sol rhizosphériques des cultures de blé, de sorgho et de sucre. Leurs résultats sont compatibles avec les nôtres.

En 1940, Sulkin, Willet et Hajna ont décrit un milieu de sulfate ferreux à trois sucres pour l'identification des bacilles entériques. La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S. La Triple Sugar Iron Agar contient trois glucides (glucose, lactose et saccharose). Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux obtenus par Mahmud *et al.*, (2023). Les travaux de ces derniers avaient pour but d'identifier et de caractériser les rhizobactéries halotolérantes provenant des nodules racinaires de diverses légumineuses de la côte du Bangladesh et également de comprendre comment ces rhizobactéries halotolérantes affectaient la croissance des plants de riz dans divers environnements salins afin d'augmenter les rendements et de surmonter la crise alimentaire.

Du fait du nombre réduit des tests biochimiques réalisés, nous n'avons pas pu aboutir à une identification précise de nos souches bactériennes. Néanmoins, nous avons réussi à établir une part importante de l'identification caractéristique de ses souches qui servira de base pour la poursuite de ce travail.

L'extraction d'ADN nous a permis de calculer la concentration précise en ADN<sub>g</sub> des échantillons pour chacun des échantillons. Les régions d'ADN<sub>r</sub> 16S bactérien et archaebactériens et ITS1 fongique ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN<sub>g</sub> selon les conditions décrites précédemment, afin d'étudier la diversité bactérienne, archéenne et fongique. Le but principal de notre étude est d'évaluer l'impact de l'inoculation sur les communautés microbiennes des sols salins. Il est vrai que l'apport des CMA utilisées peut dépendre des espèces ou des souches mycorhiziennes utilisées pour inoculer les plantes. Même constat pour les souches bactériennes utilisées comme inoculum. Il a souvent été démontré que les souches isolées d'un milieu salin sont capables de tolérer des taux plus élevés de salinité (Bencherif *et al.*, 2023). De plus, les espèces autochtones sont généralement mieux adaptées aux conditions climatiques et édaphiques locales et sont donc plus susceptibles de survivre et de se propager que les espèces exogènes. Nos résultats ont montré que l'inoculation affecte la richesse microbienne de nos sols (bactéries, champignons et les Archées) stimule spécifiquement certaines communautés microbiennes susceptibles d'être impliquées dans la dissipation des sels dans le sol. Ces travaux ne sont pas encore achevés et les résultats finaux ne sont pas encore fixés.

Dans la dernière partie de notre étude, nous avons évalué l'effet antibactérien de nos plantes cultivées sous les trois traitements. Les résultats que nous avons obtenus se sont révélés intéressants et ouvrent des perspectives pour la poursuite de ce travail avec d'autres souches, qu'il s'agisse de souches pathogènes pour l'homme, d'autres potentiellement nuisibles pour les

## Résultats et discussion

---

animaux ou les plantes. Les propriétés antibactériennes de la plante pourraient être attribuées à l'abondance de flavonoïdes, de saponines et de tanins. Ces composants phytochimiques, tels que les tanins, les saponines, les flavonoïdes, les alcaloïdes, ainsi que de nombreux autres composés aromatiques, sont des métabolites secondaires des plantes qui servent de mécanismes de défense contre la prédation par de nombreux micro-organismes, insectes et autres herbivores (El-Desoukey, 2015). Les activités antibactériennes que nous avons observées pourraient être attribuées à l'abondance de flavonoïdes, de saponines et de tanins.

# *Conclusion*

### Conclusion

La rhizosphère est la région étroite du sol qui est directement influencée par les racines des plantes. C'est une zone dynamique et biologiquement active où se produisent les interactions entre les racines des plantes, les micro-organismes du sol et d'autres composants de l'environnement du sol. *Medicago sativa* (luzerne) revêt une importance significative dans divers aspects de l'agriculture, de l'écologie et du bien-être humain, ses interactions avec la rhizosphère ont intéressé les chercheurs en raison de la capacité de la plante à former des relations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens. De plus la luzerne contient différentes classes de métabolites secondaires dont les saponines, les flavonoïdes, les tanins...etc montrant des activités biologiques intéressante à exploiter.

Dans notre étude, nous avons isolé des souches bactériennes de la rhizosphère du *Medicago sativa* brut et du *Medicago sativa* modifié par l'inoculation de champignons mycorhiziens arbusculaires et d'inoculation bactérienne. Cette démarche a été suivie par une série d'expériences visant à explorer les caractéristiques de ces souches bactériennes isolées du sol rhizosphérique. Pour commencer, nous avons procédé à l'isolement de ces souches bactériennes, après quoi nous les avons ensemencées dans six milieux de culture différents : NBRIP, King B, King A, LB, YMA et BURK sans azote. Par la suite, nous avons utilisé des tests biochimiques, notamment le test du milieu triple sucre fer (TSI), la catalase, l'indole, les nitrites et le citrate de Simmons, afin de caractériser ces souches bactériennes et d'appréhender leurs propriétés métaboliques.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir du sol rhizosphérique. Cette étape est cruciale pour obtenir des informations génétiques précises sur les micro-organismes présents dans cet environnement spécifique.

Enfin, dans la dernière partie de notre étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne de *Medicago sativa* contre plusieurs souches pathogènes, notamment *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* et *S. aureus*. Les résultats de cette évaluation nous offrent des indications prometteuses quant à l'utilisation potentielle de cette plante dans des applications antimicrobiennes, soulignant son rôle en tant que source de molécules bioactives potentielles.

# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques :

1. **Adedayo, A. A., & Babalola, O. O.** (2023). Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. *Journal of Fungi*, 9(2), 239.
2. **Ahemad, M., & Kibret, M.** (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
3. **Astuti, A., & Fauzi, R.** (2021, April). Characterization of rhizobium indigenous isolates and their compatibility with edamame soybean. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 752, No. 1, p. 012001). IOP Publishing.
4. **Bencherif, K.** 2016. Etude de la symbiose arbusculaire chez deux espèces de *Tamarix* : *Tamarix articulata* Vahl ET *Tamarix gallica* L. et des microorganismes auxiliaires. Thèse de doctorat en sciences. Université de Blida.
5. **Bencherif, K.; Laruelle, F.; Tisserant, B.; Dalpé, Y.; Lounés-Hadj Sahraoui, A.** Engineering Approach for Production of Arbuscular Mycorrhizal Inoculum Adapted to Saline Soil Management. *Stresses* 2023, 3, 404–423.
6. **BOUFARES, K., KOUADRIA, M., KARIMA, M., & MERDJET, Y. N.** (2023). Investigating the effects of plant growth-promoting rhizobacteria isolates on germination and physiology status of durum wheat under salt stress. *Acta agriculturae Slovenica*, 119(2), 1-9.
7. **Bumunang, E. W., & Babalola, O. O.** (2014). Characterization of rhizobacteria from field grown genetically modified (GM) and non-GM maizes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 1-8.
8. **Burezq, H.** (2022). Reproductive Ecology of Forage Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Recent Advances. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.100640
9. **Cabello P., Roldan M.D., Moreno-Vivian C.** 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* ;**150** :3527–3546 ;
10. **Castleman, L.** (2021). Lucerne Management. NSW Agriculture.
11. **Chang, J., Sun, Y., Tian, L., Ji, L., Luo, S., Nasir, F., Kuramae, E. E., & Tian, C.** (2021). The Structure of Rhizosphere Fungal Communities of Wild and Domesticated Rice: Changes in Diversity and Co-occurrence Patterns. *Frontiers in microbiology*, 12, 610823.

12. **Chegini, H., Oshaghi, M., Boshagh, M. A., Foroutan, P., & Jahangiri, A. H.** (2018). Antibacterial effect of *Medicago sativa* extract on the common bacterial in sinusitis infection. *International Journal of Biomedicine and Public Health*, 1(1), 1-5.
13. **Coburn, F.** (1901). Alfalfa, Lucerne, Spanish Trefoil, Chilian Clover, Brazilian Clover, French Clover, Medic, Purple Medic (*Medicago Sativa*).
14. **Curl, E., Truelove, B.** (2012). The Rhizosphere. Springer Science & Business Media.
15. **Das, S., Nurunnabi, T. R., Parveen, R., Mou, A. N., Islam, M. E., Islam, K. M. D., & Rahman, M.** (2019). Isolation and characterization of indole acetic acid producing bacteria from rhizosphere soil and their effect on seed germination. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 8(3), 1237-1245.
16. **Doyle, J. J.** (2019). Legume phylogeny: context for the family, the major groups, and the relationships of crop and model species. *Legume Crop Genomics*.
17. **Dubey, R. K., Tripathi, V., & Abhilash, P. C.** (2015). Book review: principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture.
18. **El-Desoukey, R. M. A.** (2015). Phytochemical and antimicrobial activity of *Medicago sativa* (alfalfa) as source of animal food against some animal pathogens. *Glob. Veteri*, 14, 136-141.
19. **Emile, J. C., Mauries, M., Allard, G., & Guy, P.** (1997). Genetic variation in the feeding value of alfalfa genotypes evaluated from experiments with dairy cows. *Agronomie*, 17(2), 119-125.
20. **Faostat.**, 2015 : Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations database available in <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/F> (accessed February 20, 2015).
21. **Feng, Y., Shi, Y., Zhao, M., Shen, H., Xu, L., Luo, Y., ... & Fang, J.** (2022). Yield and quality properties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their influencing factors in China. *European Journal of Agronomy*, 141, 126637.
22. **Francis C.A., Beman J.M., Kuypers M.M.** 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation ;1 :19
23. **Gaurav, K., Singh, A. K., & Singh, G.** (2016). Spent wash as an alternative medium for growth of *Rhizobium*. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 5(6), 81-4.

24. **Getachew, M. A., Mitchell, A., Gurr, G. M., Fletcher, M. J., Pilkington, L. J., & Nikandrow, A.** (2007). First Report of a "Candidatus *Phytoplasma australiense*"-Related Strain in Lucerne (*Medicago sativa*) in Australia. *Plant disease*, 91(1), 111. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0111A>.
25. **Gobran, G., Huang, P.** (2011). *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*. Elsevier.
26. **Godbole, S., Sambherao, A., & Choubey, S.** (2021). Isolation and characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) from different crops in junnar tehsil. *International Journal of Recent Scientific Research*, 12(03), 41186-41190.
27. **Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C.** (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.
28. **Gunn, C. R., Skrdla, W. H., & Spencer, H. C.** (1978). Classification of *Medicago sativa* L. using legume characters and flower colors (No. 1574). Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
29. **Haj-Amor, Z., Araya, T., Kim, D. G., Bouri, S., Lee, J., Ghiloufi, W., ... & Lal, R.** (2022). Soil salinity and its associated effects on soil microorganisms, greenhouse gas emissions, crop yield, biodiversity and desertification: A review. *Science of the Total Environment*, 843, 156946.
30. **Haran, M.S.; Thaher, A.Z.T.** 2019. Effect the single and mixture inoculation with Phosphate solubilizing bacteria, Azotobacter bacteria and P. floresences in growth and production of the corn (*Zea mays* L.) irrigated with different saline water. *Adv. Nat. Appl. Sci*, 13, 22–26.
31. **INSID** : Institut national des sols, de l'irrigation et du drainage. "Les sols salins en Algérie". Rapport d'activité, Ministère de l'agriculture et du développement rurale (2008), 7p
32. **Jamil, F., Mukhtar, H., Fouillaud, M., & Dufossé, L.** (2022). Rhizosphere signaling: Insights into plant–rhizomicrobiome interactions for sustainable agronomy. *Microorganisms*, 10(5), 899.
33. **Kennedy, A. C.** (2005). *Soil biota in the rhizosphere. Principles and applications of soil microbiology*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 242-62.

34. **Khare, T., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & Kumar, V.** (2020). Individual and additive stress impacts of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> on proline metabolism and nitrosative responses in rice. *Plant physiology and biochemistry*, 152, 44-52.
35. **Kong, Z., & Liu, H.** (2022). Modification of rhizosphere microbial communities: A possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness. *Frontiers in Plant Science*, 13, 920813.
36. **Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., & Negi, S.** (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent research in science and technology*, 4(1), 1-5.
37. **Lagos, L., Maruyama, F., Nannipieri, P., Mora, M. L., Ogram, A., & Jorquera, M. A.** (2015). Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini-review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 504-523.
38. **Li, J., Wang, C., Liang, W., & Liu, S.** (2021). Rhizosphere microbiome: The emerging barrier in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 772420.
39. **Li, P. S., Kong, W. L., & Wu, X. Q.** (2021). Salt tolerance mechanism of the rhizosphere bacterium JZ-GX1 and its effects on tomato seed germination and seedling growth. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657238.
40. **Liang, S., Arraiano-Castilho, R., Neuenkamp, L., Li, H., Bai, Z., Zhang, M., ... & Wang, X.** (2023). Rhizosphere fungal community assembly varied across functional guilds in a temperate forest. *Ecological Processes*, 12(1), 6.
41. **Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y.** (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature communications*, 13(1), 836.
42. **López, J. L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, M. E., Lozano, M. J., Draghi, W. O., Jofré, E., & Lagares, A.** (2018). Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *Journal of biotechnology*, 267, 55–62.
43. **Louvel, B.** 2010. Étude en microcosmes de l'effet du ray-grass et de ses exsudats racinaires sur la dissipation des HAP et les communautés bactériennes dégradantes. Thèse de Doctorat de l'Université de Nancy.
44. **Lugtenberg, B.** (2014). Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer. P : 228

45. **Mahapatra, R., Mishra, P., & Patel, Z. M.** (2023). The molecular architecture of rhizobium–plant symbiosis in nitrogen fixation. In *The Chemical Dialogue Between Plants and Beneficial Microorganisms* (pp. 137-144). Academic Press.
46. **Mahmud, F. A., Islam, M. A., Rubel, M. H., Mukharjee, S. K., Kumar, M., Bhattacharya, P., & Ahmed, F.** (2023). Effects of halotolerant rhizobacteria on rice seedlings under salinity stress. *Science of The Total Environment*, 892, 163774.
47. **Marble, V. L.** (1989). *Fodders for the near east: alfalfa*. Food & Agriculture Org.
48. **Mauriès, M.** (2003). *La luzerne*. France Agricole Editions.p :15-22
49. **Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M.** (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634–663
50. **Murali, M., Naziya, B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., AlYahya, S., Almatroudi, A., ... & Amruthesh, K. N.** (2021). Bioprospecting of rhizosphere-resident fungi: Their role and importance in sustainable agriculture. *Journal of Fungi*, 7(4), 314.
51. **Odelade, K. A., & Babalola, O. O.** (2019). Bacteria, fungi and archaea domains in rhizospheric soil and their effects in enhancing agricultural productivity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 3873.
52. **Ondieki, D. K., Nyaboga, E. N., Wagacha, J. M., & Mwaura, F. B.** (2017). Morphological and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from Agricultural Soils of Lower Eastern Kenya. *International journal of microbiology*, 2017, 8684921. <https://doi.org/10.1155/2017/8684921>
53. **Pantigoso, H. A., Newberger, D., & Vivanco, J. M.** (2022). The rhizosphere microbiome: Plant-microbial interactions for resource acquisition. *Journal of applied microbiology*, 133(5), 2864–2876
54. **Park, M., Kim, C., Yang J., Lee, H., Shin, W., Kim, S.** (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res* 160(2) : 127-133
55. **Pérez-Pérez, R., Oudot, M., Serrano, L., Hernández, I., Nápoles, M., Sosa, D., & Pérez-Martínez, S.** (2019). Rhizospheric rhizobia identification in maize (*Zea mays* L.) plants. *Agromía Colombiana*, 37(3), 255-262.
56. **Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P.** (2007). *The Rhizosphere*. CRC Press., page 2.

57. **Radović, J., Sokolović, D., & Marković, J. J. B. A. H.** (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
58. **Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K., & Nain, L.** (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of microbiology*, 61(4), 893-900.
59. **Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., ... & Mustafa, A.** (2021). Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10529.
60. **Sah, S., Krishnani, S., & Singh, R.** (2021). Pseudomonas mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Current research in microbial sciences*, 2, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084>
61. **Sharma, S., Singh, U., Sahu, P., Singh, H., Sharma, P.** (2021). *Rhizosphere Microbes*. Springer Nature.
62. **Skuodienė, R., Liatukienė, A., & Petrauskas, G.** (2023). Comparison of Productivity and Agro-Biological Traits of Alfalfa Populations Resistant to Mobile Al Grown on Acidic and Neutral Soils. *Agronomy*, 13(1), 156. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy13010156>
63. **Slama, H. B., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Baranov, O., Ahadi, R., & Belbahri, L.** (2023). Impacts of Salt Stress on the Rhizosphere and Endophytic Bacterial Role in Plant Salt Alleviation. *International Journal of Plant Biology*, 14(2), 361-376.
64. **Small, E.** (2011). *Alfalfa and Relatives*. NRC Research Press.
65. **Undersander, D., Cosgrove, D., Cullen, E., Grau, C., Rice, M., Renz, M., Sheaffer, C., Shewmaker, G., Sulc, M.** (2021). *Alfalfa Management Guide*. John Wiley & Sons.
66. **Van Alfen, N. K. (Ed.)**. (2014). *Encyclopedia of agriculture and food systems*. Elsevier. page 381
67. **Wang, R., Shi, F., & Xu, D.** (2022). The Extraction Method of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Mapping Using Different Remote Sensing Data Sources Based on Vegetation Growth Properties. *Land*, 11(11), 1996.
68. **Westover, H. L.** (1916). *Illustrated Lecture on the Production of Alfalfa East of the Ninety-fifth Meridian (No. 20)*. US Government Printing Office.

69. **Wilson, P.W. & Knight, S.C.** (1952). Experiments in bacterial physiology Minneapolis, Minn: Burgess Publishing Co, USA, pp. 49.
70. **Woods, M. I. C. H. A. E. L., & Orcutt, J. U. L. I. A.** (2017). The genus *Medicago* (*Fabaceae*) in Alabama. *Phytoneuron* 2017, 52, 1-17.
71. **Woźniak, M., & Gałazka, A.** (2019). The rhizosphere microbiome and its beneficial effects on plants—current knowledge and perspectives. *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology*, 58(1), 59-69.
72. **Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), 1-4.
73. **Yee, M. O., Kim, P., Li, Y., Singh, A. K., Northen, T. R., & Chakraborty, R.** (2021). Specialized Plant Growth Chamber Designs to Study Complex Rhizosphere Interactions. *Frontiers in microbiology*, 12, 625752.
74. **Yu, L., Kole, C.** (2021). *The Alfalfa Genome*. Springer Nature.
75. **Zhang, M., Chai, L., Huang, M., Jia, W., Guo, J., & Huang, Y.** (2020). Deciphering the archaeal communities in tree rhizosphere of the Qinghai-Tibetan plateau. *BMC microbiology*, 20, 1-13.

# *Annexes*

**Annex 01** : les milieux de culture :

<b>Milieu « LB » (Bertani, 1951)</b>	
<b>Tryptone</b>	<b>10 g/l</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>5 g/l</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5 g/l</b>
<b>Agar bactériologique</b>	<b>15 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH du milieu</b>	<b>7.2</b>

<b>Milieu « NBRIP » (Nautiyal, 1999)</b>	
<b>Glucose</b>	<b>10 g/l</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>so<sub>4</sub></b>	<b>1,7 g/l</b>
<b>Mgso<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,25 g/l</b>
<b>Insp<sub>6</sub></b>	<b>5 g/l</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,2 g/l</b>
<b>Kcl</b>	<b>0,2 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>Agar</b>	<b>15 g/l</b>
<b>pH</b>	<b>7</b>

<b>Milieu « YMA »</b>	
<b>Mannitol</b>	<b>10 g/l</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>0,5 g/l</b>
<b>Mgso<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,2 g/l</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>0,5 g/l</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,1 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>6.8</b>

<b>Milieu « KingB » (King et al.,1954)</b>	
<b>Peptone</b>	<b>20 g/l</b>
<b>Glycérol</b>	<b>10 ml</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1,5 g/l</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</b>	<b>1,5 g/l</b>
<b>Agar</b>	<b>15 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>7,2</b>

## Annexes

<b>Milieu « King A » (king et al., 1954)</b>	
<b>Peptone</b>	<b>20 g/l</b>
<b>Glycérol</b>	<b>10 ml</b>
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>10 g/l</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1,4 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>Agar</b>	<b>12 g/l</b>
<b>pH</b>	<b>7,1</b>

<b>Milieu « Burk's N-free » (Wilson et Knight, 1952)</b>	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>0,4 g/l</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>0,5 g/l</b>
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0,05 g/l</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>0,2 g/l</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,1 g/l</b>
<b>Sulfate de fer (7H<sub>2</sub>O)</b>	<b>0,005 g/l</b>
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	<b>0,003 g/l</b>
<b>Agar bactériologique</b>	<b>15 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>PH du milieu</b>	<b>7,0 ± 0,1</b>

<b>Milieu « TSI »</b>	
<b>Extrait autolytique de levure</b>	<b>3,0 g/l</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>3,0 g/l</b>
<b>Peptone</b>	<b>20,0 g/l</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5,0 g/l</b>
<b>Lactose</b>	<b>10,0 g/l</b>
<b>Saccharose</b>	<b>10,0 g/l</b>
<b>Glucose</b>	<b>1,0 g/l</b>
<b>Citrate de fer (III)</b>	<b>0,3 g/l</b>
<b>Rouge de phénol</b>	<b>0,024 g/l</b>
<b>Thiosulfate de sodium anhydre</b>	<b>0,3 g/l</b>
<b>Agar</b>	<b>11,0 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>7,4 ± 0,2</b>

## Annexes

Milieu « Citrate de Simmons »	
Citrate de sodium	1 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Sulfate de magnésium	0,2 g/l
Phosphate mono-ammonique	1 g/l
Phosphate dipotassique	1 g/l
Bleu de bromothymol	0,08 g/l
Agar	15 g/l
Eau distillée	1000ml
pH final	6,8 ± 0,2

Milieu « eau peptonée exempte d'indole »	
Tryptone	9 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Extrait de levure	1 g/l
Eau distillée	1000ml
pH final	7,2 ± 0,2

Tampon PBS	
Kcl	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
Na <sub>2</sub> hpo <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> o	3,51 g/l
KH <sub>2</sub> po <sub>4</sub>	0,48 g/l
Eau distillée	1000ml
pH	7

Eau physiologique	
Eau distillée	1000ml
NaCl	9%

Bouillon nitraté	
Peptone	5 g/l
Extrait de viande	3 g/l
Nitrate de potassium	1 g/l
Eau distillée	1000ml
pH	7 ± 0,2

## Annexes

---

<b>Gélose nutritive</b>	
<b>Peptone</b>	<b>5 g/l</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>1 g/l</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>2 g/l</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5 g/l</b>
<b>Agar bactériologique</b>	<b>15 g/l</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>7.4 ± 0,2</b>

## Annexes

### Annexe 02 : étude macroscopique et microscopique des colonies.

Isolats	Milieu	Couleur	Surface	Relief	Opacité	Consistance	Forme de la bactérie
L1	LB	Transparente	Rugueuse	Plate	Opaque	Muqueuse	Coccobacille
L2	LB	Beige	Lisse	Plate	Opaque	Sèche	Bacille
L3	LB	Transparente	Rugueuse	Plate	Transparente	Crémeuse	Coccobacille
L4	LB	Jaune	Lisse	Convexe	Translucide	Crémeuse	Cocci
L5	LB	Beige	Lisse	Bombé	Opaque Brillante	Crémeuse	Bacille
L6	LB	Orange	Lisse	Bombé	Opaque brillante	Crémeuse	Coccobacille
L7	LB	Beige	Lisse	Plate	Terne	Sèche	Coccobacille
L8	LB	Beige	Lisse	Convexe foncé au centre	Opaque	Crémeuse	Cocci
L9	LB	Blanche et orange au centre	Lisse	Bombé	Brillante	Muqueuse	Coccobacille
L10	LB	Jaune	Lisse	Bombé	Translucide brillante	Crémeuse	Coccobacille
L11	LB	Beige	Lisse	Plate	Opaque brillante	Crémeuse	Bacille
L12	LB	Orange	Lisse	Plate	Opaque	Muqueuse	Bacille
L13	LB	Jaune	Lisse	Bombé	Opaque	Crémeuse	Bacille
L14	LB	Orange	Lisse	Bombé	Opaque brillante	Crémeuse	Coccobacille
L15	LB	Jaune	Lisse	Bombé	Opaque	Crémeuse	Cocci
L16	LB	Orange	Lisse	Convexe	Opaque	Muqueuse	Coccobacille
PS1	NBRIP	Blanche	Lisse	Convexe	Opaque	Rigide	Cocci
PS2	NBRIP	Blanche	Lisse	Bombé	Opaque	Crémeuse	Bacille
PS3	NBRIP	Blanche	Lisse	Plate	Opaque	Crémeuse	Cocci
PS4	NBRIP	Blanche	Lisse	Plate	Translucide	Crémeuse	Cocci
AZ	YMA	Blanche	Lisse	Bombé	Opaque	Muqueuse	Bacille
AX	YMA	Orange rosé	Lisse	Légèrement bombé	Opaque	Crémeuse	Bacille
A1	YMA	Blanche	Lisse	Bombé	Opaque	Muqueuse	Bacille
AJ	YMA	Jaune	Lisse	Bombé	Opaque	Crémeuse	Bacille
AC2	YMA	Blanche	Lisse	Plate	Opaque	Crémeuse	Bacille
AO	YMA	Orange jaune	Lisse	Bombé	Opaque	Crémeuse	Bacille
AA	YMA	Beige	Lisse	Plate	Opaque	Crémeuse	Bacille
AB	YMA	Blanche	Lisse	Plate	Opaque brillante	Muqueuse	Bacille
KB1	KB	Beige	Lisse	Bombé	Opaque	Muqueuse	Bacille
KB2	KB	Beige	Lisse	Plate	Translucide	Muqueuse	Bacille
AX1	Burk	Blanche	Rugueuse	Plate	Translucide	Crémeuse	Bacille
AX2	Burk	Blanche	Lisse	Plate	Opaque	Crémeuse	Bacille

# *Résumé*

## Résumé

Cette étude vise à déterminer la richesse du microbiote rhizosphérique de *Medicago sativa* cultivé sur sol salin sous trois traitements d'inoculations différents : le premier avec des champignons mycorrhiziens, un deuxième avec des CMA et des bactéries rhizosphériques, et un dernier non inoculé (témoin). À partir de ces trois traitements nous avons isolé 32 souches bactériennes en utilisant six milieux de culture différents : LB, NBRIP, YMA, King B, King A, et Burk's N-Free. Plusieurs tests biochimiques moléculaires ont été réalisés. La majorité de nos isolats ont été caractérisés comme étant des bactéries Gram-, catalase+, indole+, citrate+, et nitrate+. Nous avons identifié des genres appartenant aux PGPR, tels que *Pseudomonas* et *Rhizobium*, ainsi que des bactéries fixatrices d'azote et des bactéries solubilisatrices de phosphate. Enfin, nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits de *Medicago sativa* contre six souches bactériennes pathogènes. Ce qui est révélé des résultats positifs. Cette étude contribue ainsi à une meilleure compréhension de la rhizosphère de la luzerne et de ses interactions avec les micro-organismes, ainsi qu'à l'exploration de ses propriétés antibactériennes.

**Mots clés :** Rhizosphère, inoculation, activité antimicrobienne, microbiote rhizosphérique.

## Abstract

The aim of this study is to evaluate the *Medicago sativa* rhizospheric microbiota richness cultivated on saline soil under three different inoculation treatments: the first one was with mycorrhizal fungi, a second with AMF and rhizospheric bacteria, and a last non-inoculated (control). From these three treatments we isolated 32 bacterial strains using six different culture media: LB, NBRIP, YMA, King B, King A, and Burk's N-Free. Several molecular biochemical tests were carried out. The majority of our isolates were characterized as Gram-, catalase+, indole+, citrate+, and nitrate+ bacteria. We identified genera belonging to PGPR, such as *Pseudomonas* and *Rhizobium*, as well as nitrogen-fixing bacteria and phosphate-solubilizing bacteria. Finally, we evaluated the antibacterial activity of *Medicago sativa* extracts against six pathogenic bacterial strains. Which showed positive results. This study thus contributes to a better understanding of the alfalfa rhizosphere and its interactions with microorganisms, as well as to the exploration of its antibacterial properties.

**Keywords:** Rhizosphere, inoculation, antimicrobial activity, rhizospheric microbiota.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مدى ثراء الكائنات الحية الدقيقة في منطقة الجذور لنبات *Medicago sativa* المزروعة على تربة مالحة تحت ثلاث علاجات مختلفة للتلقيح : الأولى مع فطريات الميكوريزا، والثانية مع AMFs وبكتيريا الجذور، والأخيرة غير الملقحة (الشاهد). من هذه الزراعات الثلاثة قمنا بعزل 32 سلالة بكتيرية باستخدام ستة وسائط زراعية مختلفة: LB، NBRIP، YMA، King B، King A، و Burk's N-Free. تم إجراء العديد من الاختبارات البيوكيميائية الجزيئية. تم تشخيص غالبية العزلات لدينا على أنها بكتيريا جرام-، كاتالاز+، إندول+، سيترات+، ونترات+. لقد حددنا أجناسًا تنتمي إلى PGPRs، مثل الزائفة (*Pseudomonas*)، والريزوبيوم (*Rhizobium*)، بالإضافة إلى البكتيريا المثبتة للنيتروجين، والبكتيريا المذيبة للفوسفات. أخيرًا، قمنا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات *Medicago sativa* ضد ستة سلالات بكتيرية ممرضة. والتي أظهرت نتائج إيجابية. وبالتالي تساهم هذه الدراسة في فهم أفضل لجذور البرسيم الحجازي وتفاعلاته مع الكائنات الحية الدقيقة، وكذلك في استكشاف خصائصه المضادة للبكتيريا.

**الكلمات المفتاحية:** ريزوسفير، التلقيح، النشاط المضاد للميكروبات، الكائنات الحية الدقيقة في ريزوسفير.