



## Mémoire

### MASTER ACADÉMIQUE

**Domaine :** sciences de la nature et de la vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** Microbiologie appliquée

**Présentée par**

***MERKICHE Bisma***

***FALEK Hidayat***

***BOUSSEKINE Iman***

## Thème

***Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse Vicia faba***

### Devant le jury :

**Président :** Dr. SEDRATI Abdenour

**MCB**

Université de Khenchela

**Examinatrice :** Dr. BENRDJAM Lamia

**MAA**

Université de Khenchela

**Promotrice :** Dr. MELLAL Hanane

**MAB**

Université de Khenchela

# *Remerciements*

*Nos remerciements s'adressent premièrement et avant tout à Dieu  
tout puissant, qui nous a aidés à réaliser ce travail, et pour sa grâce tout au  
long de notre vie professionnelle et personnelle.*

*Nous tenons à exprimer nos plus grands respects et nos vifs remerciements aux membres du jury qui ont  
bien voulu examiner ce travail Dr Benredjem Lamia et Dr SEDRATI Abdenour*

*Nos profondes gratitudes s'adressent à Mme MELLAL Hanane notre encadrante, qui a accepté de nous  
diriger et nous a accordé tout son intérêt et sa patience, nous la remercions pour sa disponibilité, ses  
précieus conseils, son encouragement ainsi que sa gentillesse qui nous a permis de mener à bien ce  
travail.*

*Ainsi nous n'oublions pas de remercier les enseignants qui nous ont apporté le soutien moral et nous ont  
recommandé de nous faciliter de nombreuses taches surtout Dr LAOUAR.N et Dr MAAMER.H, Dr  
BADIS.Z aussi à Mme CHORFI.R responsable du hôte technologique dans le complexe de laboratoires et  
Mme Sarah*

*Nos remerciements a ceux et celle qui ont contribue de près ou de loin à réalisation de ce mémoire.*

*Nos tenons aussi à remercier nos familles pour leur soutien moral et leur patience pendant les moments*

*Merci.*

*Vos étudiantes qui suivent vos chemins*





## *Dédicace*

*Avec L'aide D'ALLAH, J'ai Pu Réaliser Ce Modeste Travail Que Je Dédie  
A ceux qui ont dessiné les plus belles images de ma vie, qui me poussent aujourd'hui vers  
l'avant et rassurent mes pas, qui m'ont tant appris et ont fait de moi ce que je suis, que Dieu  
les garde, joie de ma vie:*

*Mon Père LAZHER et ma Mère FADHILA*

*A mes frères : Charif et Said Pour leur soutient et leur amour*

*A mes sœurs : Soumia ET Sihem Pour leur soutien moral et pour leur amour et soins.*

*A mes oncles, mes tantes, mes cousins, mes cousines et toute la famille.*

*A mes chère trinômes : Hida et Emy*

*A mes fidèles amies : Hanine, Foulla, Sabrina, Ahlam, Mima, khaoula, Dounia,  
Lamiss, Nada, Amina, Fatima et Maroua*

*A tous mes collègues de la promotion avec qui j'ai partagé les joies les Difficultés durant  
ces années.*

*Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré,*

*IMEN, Malak, Athir, Souhil, Ayoub, IMED*

*A tous les enseignants que j'ai connus sur tout Mr LAOUAR*

*Enfin, je dédie ce modeste travail à ma très chère Mlle HANANE MELLAL*

*la femme avec qui j'ai appris beaucoup de choses*

*Pasma*





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui sont le symbole de  
tendresse et d'amour mes très chers parents.*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, ma source de volonté  
Ma toujours accompagné dans toute les phases de ma vie*

*Mon père NASSER EDDIN*

*A la femme qui s'est battue et elle se bat encore pour ne illuminer  
notre chemin de vie aucun dédicace ne serait exprimer le respect et  
l'amour que je vous porte .que dieu la bénisse et la protégé*

*Ma chère Maman IBTISSEM*

*A Mon chère frère mon bras et ma lumière et ma fierté*

*MAHDI*

*A mes tentes AMIRA et NADJETTE*

*Mon prof DR.LAOUAR Nadhir*

*Toutes mes chères copines*

*NADA, LAMISS, MALAK, BESMA, SOUHA, ASMA, RAYEN  
IMEN, IKRAM et mes cousines SARAH et RAZAN*

*Hidayat.*





## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail*

*A mes parents pour lesquels je pousse mes objectifs afin de voir leur regard briller de fierté.*

***Boussekkine Fatima***, ma mère, Aucune phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour que j'éprouve pour toi.

*Par ton soutien et tes encouragements, ta tendresse et ton affection,*

*Tu m'auras comblé tout au long de mon parcours.*

*Merci pour la patience dont tu as fait preuve.*

***Boussekkine Abd el rahmane***, mon père, Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

*Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie.*

*Mon frère Hakim et sœur Meriem pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse.*

*A mon support dans la vie, mon cousin Fouad.*

*A tous mes amies surtout : Hadia et Hanin, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire,*

*Sans oublier mes compagnons de projet: Besma et Hidayat, pour leur compréhension et patience tout au long de ce mémoire*

*A ma famille et toutes les personnes que j'aime*

*Parfois, les mots ne suffisent plus pour exprimer*

*tout le bien qu'on ressent ! Juste MERCI à vous !*

***Iman.***



## Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Vicia faba*

### Résumé

Dans cette étude, 3 bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires du *vicia faba* (fève), cultivés en 2 communes à la wilaya de Khenchela qui située à l'Est de l'Algérie; et dans notre cas les nodules prélevés été du types indéterminés, Bilobés et polylobés sous forme d'un amas.

Les isolats ont fait l'objet d'une : caractérisation phénotypique quelque soit macroscopique et microscopique, une caractérisation physiologique par l'effet de pH/NaCl et Température, aussi par une collection des tests nutritionnels et des tests biochimiques telle que la vitesse de croissance, tests enzymatiques respiratoires et spécifiques de la bactérie associée à la racine de cette légumineuse.

L'étude morphologique et culturale, ainsi que les tests biochimiques classent ces isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium* et les propriétés physico-chimiques des sols, montre que la fixation symbiotique chez la *vicia faba.L* est fortement liée aux conditions édaphiques du sol.

**Mots clés** : Symbiose, *Rhizobium*, Nodules, *Vicia faba L*, caractérisation phénotypique.

## Phenotypic characterization of microsymbionts isolated from root nodules of the legume *Vicia faba*

### Abstract

In this research, 3 bacteria were isolated from the root nodules of *vicia faba* (broad bean) grown in 2 communes in Khenchela which is located in the east of Algeria; and in our case the nodules taken were of the indeterminate, bilobed and polylobed types in the form of a cluster.

The isolates were subjected to: phenotypic characterization whatever macroscopic and microscopic, physiological characterization by the effect of pH/NaCl and temperature, also by a collection of nutritional tests and biochemical tests such as growth rate , respiratory or specific enzyme tests for the bacteria associated with the root of this legume.

The morphological and cultural study, as well as the biochemical tests classify these isolates as being bacteria with rapid growth, presenting the features of the bacteria of the genus *Rhizobium* and the physicochemical properties of the soils shows that the symbiotic fixation in the *vicia faba. L* is strongly related to the edaphic conditions of the soil.

**Keywords:** Symbiosis, *Rhizobium*, Nodules, *Viciafabab L*, phenotypic characterization.

## Phenotypic characterization of microsymbionts isolated from root nodules of the legume *Vicia faba*

### Abstract

In this research, 3 bacteria were isolated from the root nodules of *vicia faba* (broad bean) grown in 2 communes in Khenchela which is located in the east of Algeria; and in our case the nodules taken were of the indeterminate, bilobed and polylobed types in the form of a cluster.

The isolates were subjected to: phenotypic characterization whatever macroscopic and microscopic, physiological characterization by the effect of pH/NaCl and temperature, also by a collection of nutritional tests and biochemical tests such as growth rate , respiratory or specific enzyme tests for the bacteria associated with the root of this legume.

The morphological and cultural study, as well as the biochemical tests classify these isolates as being bacteria with rapid growth, presenting the features of the bacteria of the genus *Rhizobium* and the physicochemical properties of the soils shows that the symbiotic fixation in the *vicia faba. L* is strongly related to the edaphic conditions of the soil.

**Keywords:** Symbiosis, *Rhizobium*, Nodules, *Viciafabab L*, phenotypic characterization.

## الخصائص المظهرية للبكتيريا التعايشية المعزولة من العقيدات الجذرية للبقوليات *Vicia faba*

### ملخص

في هذه الدراسة ، تم عزل 3 بكتيريا من العقيدات الجذرية للبقوليات فيسيا فابا *vicia faba* (الفاول) ، المزروعة في بلديتين مختلفتين من ولاية خنشلة التي تقع شرق الجزائر. وفي الحالة التي قمنا بدراستها ، كانت العقيدات المأخوذة من الأنواع غير المحددة ، والمزدوجة الفصوص ، والمتعددة الفصوص في شكل كتلة.

تم إخضاع العزلات البكتيرية إلى : دراسة الخصائص الظاهرية على المستوى العيني و المجهرى ، كما دراسة الخصائص الفسيولوجية بتأثير درجتي pH/ NaCl ودرجة الحرارة T ، وكذلك من خلال مجموعة من اختبارات خصائص التعايش الغذائية والاختبارات البيوكيميائية مثل معدل النمو ، واختبارات التنفس كما اختبارات الإنزيمات النوعية للبكتيريا المصاحبة لجذور هاته البقوليات .

الدراسة المورفولوجية والزراعية وكذلك الاختبارات البيوكيميائية التي تمت تصنف هذه العزلات على أنها بكتيريا ذات نمو سريع ، وتمثل خصائص بكتيريا من نوع ريزوبيوم (*Rhizobium*) ، كما أن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للتربة ، دلت على أن التثبيت التكافلي أو التعايشي لفيسيا فابال (*vicia faba.L*) يرتبط بقوة بالظروف التكوينية للتربة.

**الكلمات المفتاحية :** التعايش، *Rhizobium* ، العقيدات الجذرية ، *Vicia faba L* الفول ، الخصائص الظاهرية

# TABLE DES MATIÈRES

Résumé en Français

Résumé en Anglais

Résumé en Arabe

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale..... 01

## Chapitre 01 : Revue bibliographique

### 1. Fixation d'azote.

1.1.	L'azote.....	02
1.2.	Fixation d'azote libre.....	02
1.3.	Fixation biologique d'azote.....	02
1.4.	Fixation d'azote symbiotique.....	03
1.5.	Bactérie fixatrice d'azote.....	04

### 2. Légumineuses.

2.1.	Généralités.....	06
2.2.	Intérêts des légumineuses.....	06
2.3.	Taxonomie et caractéristique.....	07
2.3.1.	Origine et historique de la <i>Vicia faba</i> L.....	08
2.3.2.	Description de l'espèce : <i>Vicia faba</i> L.....	08
2.3.3.	Position systématique de la <i>Vicia faba</i> L.....	08
2.3.5.	Intérêt alimentaire.....	09

### 3. *Rhizobium*.

3.1.	<i>Rhizobium</i> .....	10
3.2.	Caractérisation des <i>Rhizobium</i> s.....	10
3.2.1.	Caractères généraux.....	10
3.2.2.	Caractères biochimiques et physiologiques.....	11
3.3.	Diversité et classification des <i>Rhizobium</i> s.....	11
3.3.1.	Systématique des <i>Rhizobium</i> s.....	11

### 4. Association symbiotique *Rhizobium*-légumineuse.

4.1.	Généralités.....	13
4.2.	La symbiose fixatrice d'azote.....	13
4.3.	Symbiose plante-microorganisme.....	13
4.4.	Enzyme nitrogénase.....	14
4.5.	Les facteurs de fixation symbiotique d'azote.....	14
4.6.	Symbiose légumineuse- <i>Rhizobium</i> .....	15

### 5. Nodulation.

5.1.	Formation et mécanisme des nodules.....	15
5.2.	Morphologie des nodules.....	17
5.3.	Génétique de la nodulation.....	18

# TABLE DES MATIÈRES

5.4.	Facteurs limitant de la formation des nodules.....	19
------	--	----

## Chapitre 02 : Matériel et méthodes

1.	Échantillonnage et sites d'échantillonnage .....	21
1.1.	Échantillonnage des nodules .....	21
1.2.	Échantillonnage de sol .....	21
1.3.	Présentation générale de région de M'Toussa .....	21
1.4.	Présentation générale de région de Ain Djerboua.....	22
2.	Analyse pédologique de l'échantillon de sol .....	24
2.1.	Analyse physique.....	24
2.1.1.	Granulométrie.....	24
2.1.2.	Humidité.....	24
2.2.	Analyse chimique.....	24
2.2.1.	pH.....	24
3.	Collecte des nodules.....	25
3.1.	Conservation des nodules.....	26
4.	Isolement des bactéries à partir des nodules.....	26
4.1.	Purification des isolats.....	28
4.2.	Conservation des isolats.....	28
5.	Caractérisation phénotypique des isolats.....	29
5.1.	Caractérisation macroscopique.....	29
5.2.	Caractérisation microscopique.....	29
5.2.1.	État frais.....	29
5.2.2.	Coloration de Gram.....	29
5.3.	Test de la mobilité.....	29
5.4.	Tests nutritionnels.....	30
5.4.1.	Assimilation de la source de carbone.....	30
5.4.2.	Assimilation de la source d'azote.....	30
5.5.	Caractérisation physiologique .....	30
5.5.1.	Effet de salinité.....	30
5.5.2.	Effet d'acidité.....	31
5.5.3.	Effet de la température.....	31
5.6.	Tests biochimiques.....	31
5.6.1.	Vitesse de croissance.....	31
5.7.	Étude des enzymes respiratoires.....	32
5.7.1.	Test catalase.....	32
5.7.2.	Test oxydase.....	32
5.8.	Recherche des enzymes spécifiques.....	32
5.8.1.	Résistances aux antibiotiques.....	32
5.8.2.	Hydrolyse d'urée.....	32
5.8.3.	Activité cellulolytique.....	33
5.8.4.	Recherche de nitrate réductase.....	33

## Chapitre 03 : Résultats et Discussions

1.	Échantillonnage des nodules et de sol .....	34
2.	Analyse pédologique de l'échantillon de sol .....	34
2.1.	Analyse physique.....	34

# TABLE DES MATIÈRES

---

---

2.1.1.	Granulométrie.....	34
2.1.2.	Humidité.....	35
2.2.	Analyse chimique.....	36
2.2.1.	pH.....	36
3.	Caractérisation phénotypique .....	37
3.1.	Étude morphologique des colonies.....	37
3.1.1.	Croissance sur milieu YMA+ rouge Congo.....	37
3.1.2.	Croissance sur milieu YMA.....	38
3.2.	Caractérisation microscopique.....	38
3.3.	Caractérisation nutritionnels.....	38
3.3.1.	Assimilation de la source de carbone.....	38
3.3.2.	Assimilation de la source d'azote.....	39
3.4.	Caractérisation physiologique .....	39
3.4.1.	Tolérance à la salinité.....	39
3.4.2.	Tolérance au pH.....	40
3.4.3.	Effet de la température.....	41
3.5.	Caractérisation biochimiques.....	42
3.5.1.	Vitesse de croissance sur BTB.....	42
3.5.2.	Recherche des enzymes respiratoires.....	43
3.5.2.1.	Test catalase.....	43
3.5.2.2.	Test oxydase.....	43
3.6.	Recherche des enzymes spécifiques.....	43
3.6.1.	Résistances aux antibiotiques.....	43
3.6.2.	Hydrolyse d'urée.....	44
3.6.3.	Activité cellulolytique.....	45
3.6.4.	Recherche de nitrate réductase.....	45
<b>Conclusion et perspectives.....</b>		<b>52</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>54</b>

## Annexes

## LISTE DES TABLEAUX

---

Titre	Page
<b>Tableau. 1 :</b> Les différents systèmes de fixation biologique de l'azote moléculaire et leur potentiel de fixation d'azote en kg/ha de sol.....	<b>03</b>
<b>Tableau. 2 :</b> Systématique de La <i>Vicia faba</i> (Fève) .....	<b>09</b>
<b>Tableau.3 :</b> Majeures familles et genres de bactéries capables de noduler les légumineuses.....	<b>12</b>
<b>Tableau. 4 :</b> Informations géographique concernant la ville de MToussa.....	<b>22</b>
<b>Tableau. 5 :</b> Informations géographique concernant la ville de Ain Djerboua.....	<b>22</b>
<b>Tableau. 6 :</b> Les résultats d'analyses physico-chimiques de 3 zones d'études.....	<b>34</b>
<b>Tableau. 7 :</b> Croissance des isolats en présence de différents sucres.....	<b>38</b>
<b>Tableau. 8 :</b> Résultats de test Assimilation de source d'azote d'isolats.....	<b>39</b>
<b>Tableau. 9 :</b> Les résultats d'un teste antibiogramme chez les Rhizobiums.....	<b>44</b>

## LISTE DES FIGURES

Titre	Page
<b>Figure. 1 :</b> Cycle d'azote.....	04
<b>Figure. 2 :</b> Schéma représentatif des différentes parties de la fève.....	07
<b>Figure. 3 :</b> Aspect morphologique de La <i>Vicia faba</i> (Fève).....	08
<b>Figure. 4 :</b> a) <i>Rhizobium leguminosarum</i> sous microscope électronique à balayage b) <i>Rhizobium</i> sous microscope électronique .....	10
<b>Figure. 5 :</b> Fonction du nitrogénase.....	14
<b>Figure. 6 :</b> Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote.....	16
<b>Figure. 7 :</b> Processus de nodulation d'une plante légumineuse infectée par Rhizobia	17
<b>Figure. 8 :</b> Nodosités indéterminées (à gauche) et déterminées (à droite).....	18
<b>Figure. 9 :</b> complexe des laboratoires pédagogiques de la Faculté des sciences de la nature et de vie à El Hamma (Khenchela).....	20
<b>Figure. 10 :</b> Localisation géographique des communes d'échantillonnages.....	22
<b>Figure. 11 :</b> Image satellite de la zone de Ain Djerboua .....	23
<b>Figure. 12 :</b> Image satellite de la zone de M'Toussa .....	23
<b>Figure. 13 :</b> Zone de prélèvement M'Toussa.....	23
<b>Figure. 14 :</b> Zone de prélèvement Ain Djerboua.....	23
<b>Figure. 15 :</b> Test de sédimentation.....	24
<b>Figure. 16 :</b> Aspects des nodules de <i>Vicia faba L</i> .....	25
<b>Figure. 17 :</b> Conservation des nodules.....	26
<b>Figure. 18 :</b> Stérilisation des nodules.....	27
<b>Figure. 19 :</b> Test de stérilisation.....	27
<b>Figure. 20 :</b> Isolement des isolats selon la méthode des nodules écrasés.....	28
<b>Figure. 21 :</b> Conservation des isolats.....	29
<b>Figure. 22 :</b> Test de sédimentation.....	35
<b>Figure. 23 :</b> Test d'humidité selon la méthode gravimétrique.....	36
<b>Figure. 24 :</b> La mesure du pH des 3 échantillons.....	37
<b>Figure. 25:</b> Effet du NaCl sur la croissance des isolats après 24 et 48H .....	40
<b>Figure. 26:</b> Effet du pH sur la croissance des isolats après 24 et 48H .....	40
<b>Figure. 27:</b> Effet du T° sur la croissance des isolats après 24 et 48H.....	41
<b>Figure. 28:</b> a) Résultats de test de stérilisation, b) Croissance sure milieu YMA+RC.....	46
<b>Figure. 29:</b> Croissance sur milieu YMA.....	47
<b>Figure. 30:</b> Observation microscopique de l'isolat (x 100) après coloration de Gram..	47
<b>Figure. 31:</b> Utilisation des différentes sources de carbone (a) et d'azote (b) .....	48
<b>Figure. 32:</b> Résultats des tests physiologiques (NaCl, T° et pH).....	49
<b>Figure. 33:</b> Les 3 isolats produisent des bulles d'air.....	49
<b>Figure. 34:</b> Observation d'une teinte violette pour les 3 isolats.....	50
<b>Figure. 35:</b> Sensibilité des Rhizobiums aux antibiotiques .....	50
<b>Figure. 36:</b> Croissance sur YMA+ BTB.....	50
<b>Figure. 37:</b> Résultat de l'hydrolyse de l'urée .....	50
<b>Figure. 38:</b> Résultat de l'hydrolyse du CMC .....	51
<b>Figure. 39 :</b> a) Résultats de la recherche du nitrate et fermentation de mannitol. b) Mobilités des isolats.....	51

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>Ain Dj :</b>	Ain Djerboua.
<b>BNL :</b>	Bactéries Nodulant les légumineuses.
<b>BTB :</b>	Bleu de Bromothymol.
<b>CaCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de Calcium.
<b>Cal :</b>	Calories.
<b>CMC :</b>	Carboxy Methyl Cellulose.
<b>DO :</b>	Densité Optique.
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organisation of the United Nations (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).
<b>LCO :</b>	lipo-chito-oligosaccharides.
<b>FN :</b>	Facteur Nod.
<b>FBN :</b>	Fixation biologique de l'azote.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Peroxyde d'Hydrogène.
<b>ITIS :</b>	Integrated Taxonomic Information System (data base).
<b>KCl :</b>	Chlorure de Potassium.
<b>KNO<sub>3</sub> :</b>	Nitrate de potassium.
<b>µm :</b>	Micromètre.
<b>NaCl :</b>	Chlorure de Sodium.
<b>N<sub>2</sub> :</b>	L'azote moléculaire.
<b>NH<sub>3</sub> :</b>	L'azote minéral.
<b>NH<sub>4</sub>Cl :</b>	Chlorure d'Ammonium.
<b>Gène <i>nod</i> :</b>	Gène de nodulation.
<b>pH :</b>	Potentiel d'Hydrogène.
<b>PGPR :</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes).
<b>P/V :</b>	Poids par volume.
<b>RC :</b>	Rouge Congo.
<b>V/V :</b>	Volume par Volume.
<b>YMA :</b>	Yeast Mannitol Agar.
<b>YMB :</b>	Yeast Mannitol Broth.

# *Introduction générale*

L'azote est l'élément le plus important chez les plantes après le carbone. Il est souvent le principal facteur de la production agricole en raison de sa concentration assimilable à celle du carbone. Ces deux éléments sont à l'origine de la fertilité du sol (Foth, 1990), mais malheureusement pour le transformer en engrais azotés à l'échelle industrielle, on se trouve contraint par une importante demande en bilan énergétique.

L'air de l'atmosphère comprend 78% d'azote, sous forme gazeuse (N<sub>2</sub>). (Hien, 1990 ; Sédogo, 1981 ; Badoetal, 1997). Ce dernier, sous cette forme atmosphérique, est stable. Et par conséquent, les plantes sont incapables de le fixer directement. D'autre part et depuis des millions d'années, les bactéries sont le seul moyen de le leur rendre disponible en cycle naturel. (Jean-Marc ,2017).

Toute au contraire, les légumineuses, disposent de bactéries spécifiques responsables de la fixation d'azote au niveau des nodules racinaires, et ceux-ci représentent une niche écologique pour ces bactéries (Graham, 2003), en effet. Elles ont la capacité d'établir une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*.

Les Rhizobiums fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent à la plante sous une forme d'ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), grâce à une enzyme bactérienne, appelée la nitrogénase (Graham et Vance, 2003). La capacité des bactéries du genre *Rhizobium* à fixer l'azote au cours de cette symbiose représente un réel intérêt économique et écologique, c'est en effet, Une solution alternative et complémentaire à l'utilisation d'engrais azotés classiques. (Jean-Marc ,2017). De ce fait, la nécessité de lancer des investigations pour les descriptions phénotypiques, et de connaître la diversité des deux symbiotes est préalable à toute utilisation des potentialités de ce phénomène symbiose (rhizobia-légumineuses).

Dans ce contexte, Le travail comporte 3 chapitres : Le premier chapitre correspond à une étude bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique. Elle comporte une partie sur l'azote et légumineuse et la plante hôte *Vicia faba.L* et une partie sur le *Rhizobium* et une autre partie sur Association symbiotique Rhizobia- Légumineuse fixatrice d'azote et la nodosité ; le deuxième chapitre concerne matériel et méthode. En fin le troisième chapitre résultats et discussions est réservée pour comparaison des isolats avec des résultats investigateurs sur le thème en question.

Ce mémoire est clôturé par une conclusion qui comporte une série de réflexions scientifiques et de perspectives qui restent à réaliser dans un avenir proche.

# *Chapitre 01*

## *Revue bibliographique*

## 1. Fixation d'azote

### 1.1. L'azote

L'azote est l'élément constitutif le plus important des plantes après le carbone. Il est souvent le principal facteur de production agricole car la concentration des formes assimilables d'azote dans le sol (ammonium, nitrate et composés organiques simples) limite souvent la croissance des plantes. L'azote moléculaire (N<sub>2</sub>), l'un des principaux composants de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par des micro-organismes procaryotes appelés fixateurs de N<sub>2</sub>, libres ou symbiotiques (Roger, 1996).

### 1.2. Fixation d'azote libre

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe *Azotobacter* (Becking, 2006), *Azospirillum* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000), *Acetobacter* (Gillis et al, 1989), *diazotrophicus* des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) (Asami et Kiwamu, 2006) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) (Chelius et Triplett, 2000) des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique, *Rhodobacter* et *Rhodospirillum* (Wang et Noren, 2006) et des cyanobactéries *Anabaena* (Allen et Arnon, 1955).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer des grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucide disponible. Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (Tortora et al, 2003).

### 1.3. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote (FBN), un processus complexe, réalisé exclusivement par des microorganismes procaryotes (bactéries et Archaea), permet la conversion du N<sub>2</sub> atmosphérique en ammoniac par l'enzyme nitrogénase (Beunord, 1994).





### 1.4. Fixation d'azote symbiotique

La fixation symbiotique est le processus biologique qui permet de convertir l'azote de l'air (N<sub>2</sub>) en azote minéral (NH<sub>3</sub>) assimilable par les organismes vivants pour constituer leurs molécules organiques (notamment les protéines).

La réduction de l'azote en ammonium réalisée par des bactéries comme Rhizobiums , Azotobacter libres ou en symbiose avec certaines espèces de plantes (légumineuses et certaines ligneuses non légumineuses) est connue sous le nom de fixation biologique de l'azote (FBN).

Les organismes capables de fixer l'azote sont connus sous le nom de diazotrophes en utilisant l'azote moléculaire en le réduisant en NH<sub>3</sub> grâce à l'enzyme nitrogénase. La réaction est :  $N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3$ . (Aqua Portail 14/12/2007 (mise à jour le 13/11/2021)).

**Tableau.1 :** Les différents systèmes de fixation biologique de l'azote moléculaire et leur potentiel de fixation d'azote en kg/ha de sol. (Marschner, 1995).

Système fixateur	Fixation libre	Fixation associative	Fixation symbiotique
<p>N<sub>2</sub></p>  <p>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></p>			
<b>Localisation</b>	<b>Sol</b>	<b>Rhizosphère</b>	<b>Nodule</b>
<b>Organismes</b>	<i>Klebsiella</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Rhizobium</i>
<b>Energie</b>	<b>Résidus végétaux</b>	<b>Exsudats</b>	<b>Photosynthétas</b>
<b>Azote fixé</b>	<b>10-50</b>	<b>50-100</b>	<b>100-400</b>

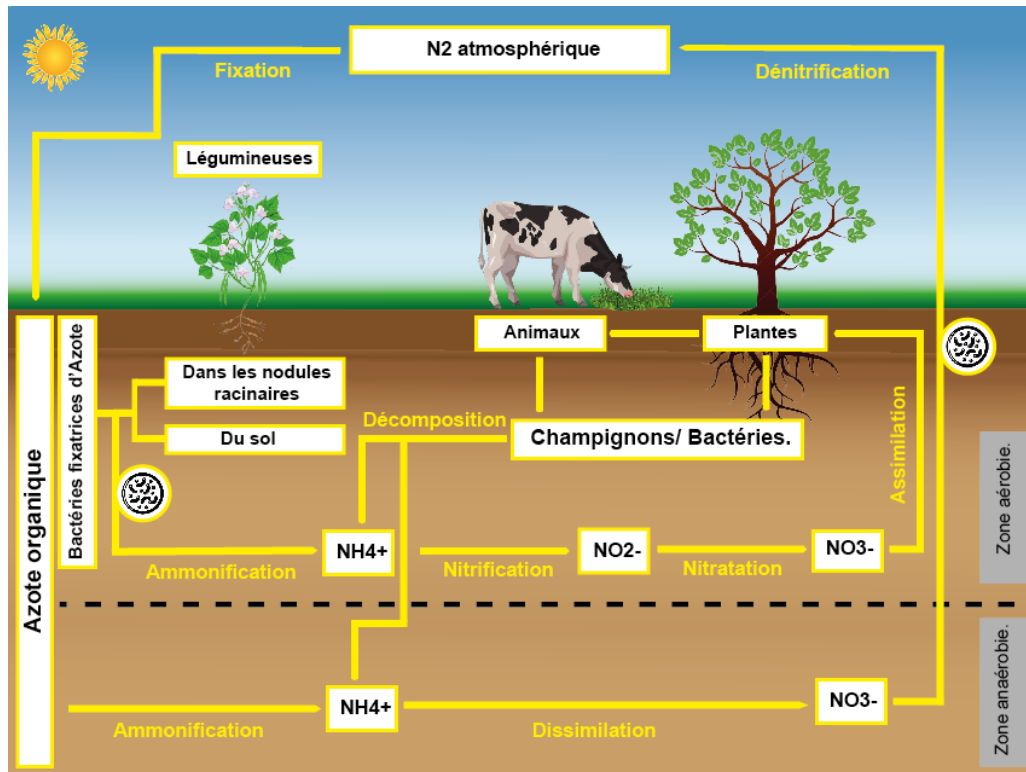


Figure.1 : Cycle d'azote (Adobe illustrator, 2022).

### 1.5. Bactérie fixatrice d'azote

Une bactérie fixatrice d'azote est un microorganisme capable de capter l'azote atmosphérique, le diazote et de le restituer à la plante sous une forme assimilable : l'ammoniaque (Deacon). Ces bactéries mesurent environ 1 micromètre de moyenne, ce qui est environ 60 000 fois plus petit qu'un homme

Il existe trois conditions à la fixation d'azote par les bactéries :

- Il faut un faible taux d'oxygène car la nitrogénase est inactive. Ainsi, ce sont les bactéries en conditions d'anaérobiose qui pourront permettre la fixation d'azote. Elles se situent dans les ports remplies d'eau ou dans les agrégats. Pour cela, l'oxygène est capté via mécanisme : la respiration et la lég'hémoglobine qui permet de fixer l'oxygène pour qu'il ne circule pas librement.
- La présence de ressource et énergie comme le Carbone est indispensable. Les bactéries doivent en avoir en grande quantité pour que la fixation d'azote soit efficace. Pour cela, elles peuvent s'associer aux bactéries qui décomposent la paille.
- En présence d'azote minérale, la fixation est inhibée. Pour que la fixation ait lieu, il doit y avoir peu voire pas du tout de fertilisation. (Clément, 2012).

## 2. Les macrosymbiontes (Légumineuses)

### 2.1. Généralités

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les Angiospermes (Sprent, 1995), qui représentent la troisième famille de plante par le nombre d'espèces (Schneider et al, 2015). Les Fabaceae constituent une famille de plantes comprenant 12 000 espèces différentes classées selon 400 genres distincts (Hordés, 2015). Cette famille produit des fruits en forme de gousses que l'on récolte desséchées. Ce sont : les lentilles, les fèves et haricots secs, les pois séchés ou encore les haricots mungo. Il y a d'autres fruits en forme de gousses qui sont eux récoltés avant leur maturité finale et qui ne sont pas classés dans les légumineuses. Cette différence dans leurs caractéristiques nutritionnelles fait que les légumineuses sont regroupées avec les « viandes et substituts » en raison de leurs fortes teneurs en protéines, soit deux fois plus que le blé et trois fois plus que le riz (Brillant, Besançon ,2017).

Les légumineuses constituent une importante composante d'aliments nutritifs, (Hassan, 2006), elles sont très riches en protéines et complètent les céréales dans la qualité nutritive sont relativement adaptées au climat méditerranéen. (Abdelaguerfi et Ramdane, 2003).

### 2.2. Intérêts des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin et al, 2001). Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet et al, 2006).

Beaucoup d'espèces de Légumineuses sont cultivées dans le monde entier comme espèces ornementales (dans les jardins, comme les arbres d'ombre), ou utilisées comme engrais verts, fourrage pour le bétail, fourrage pour les abeilles mellifères, nourriture pour l'homme, en agroforesterie et de reboisement (pour la fixation de l'azote), pâtes pour la production de papier, bois, ainsi que les sources de produits chimiques (ex : les teintures, les tanins), huiles (industrielles, de la nourriture, l'aromathérapie) et les médicaments.

En Algérie, la culture des légumineuses alimentaires fait partie du paysage agricole depuis des millénaires, et sont utilisées en rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumes secs ont une importance stratégique dans l'alimentation parce qu'ils constituent une importante source protéique, mais seul 1/3 de la consommation est couverte par la production nationale. (Faostat, 2011).

### 2.3. Taxonomie et caractéristique

Les légumineuses constituent une des familles les plus importantes du règne végétal avec environ 750 genres et 20 000 espèces. Ce sont des Angiospermes dicotylédones dont les fruits sont des gousses (Beunard, 1994). Elles sont implantées dans de nombreuses aires géographiques :

- **Pourtour méditerranéen et Moyen-Orient** : pour les pois, les fèves, la luzerne, la lentille et le trèfle violet lupin.
- **Sud de l'Inde** : pour le pois cajun.
- **Amérique australe** : pour certains Vigna.
- **Chine et Asie du Sud Est** pour les haricots mungo
- **Amérique latine et Amérique de l'Est** pour le haricot
- **Amérique occidentale (Sénégal) et Amérique centrale** pour l'arachide

Elles se développent en général dans des zones assez sèches et bien éclairées car elles ont besoin de lumière, c'est pourquoi elles sont très peu présentes dans les forêts équatoriales.

Les légumineuses sont représentées par trois sous-familles:

- **Les Mimosacées:** Acacia, Mimosa, Leucaena, Albizia ...
- **Les Césalpiaciées:** Tamarinier, Arbre de Judée, Caroubier ...
- **Les Papilionacées:** Genêt, Trèfle, Arachide, Haricot, Pois, Haricots mungo ...

Ainsi, la famille des légumineuses comprenant arbres, arbustes et plantes herbacées, est très diversifiée.

De plus, elles fixent fréquemment, mais non obligatoirement l'azote atmosphérique par symbiose avec les rhizobiums. Ces deux mécanismes sont complémentaires, avec malgré tout une préférence pour le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par rapport au N<sub>2</sub>, lorsqu'il est disponible en quantité suffisante dans le sol (S. Dayle, 1994).

### 2.3.1. Origine et historique de *Vicia faba* (Fève)

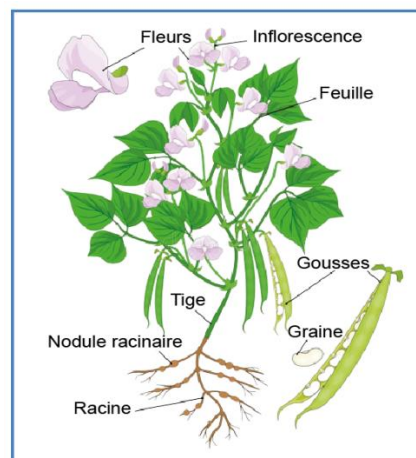
*Vicia faba* (Fève) a été domestiquée très tôt dans le monde. Bien que son origine ne soit pas encore claire, il a été longtemps pensé qu'elle était originaire de la méditerranée ou de l'Asie de l'Ouest. D'autres auteurs comme (Nuessly et al, 2004 ; Mikic 2011), la considèrent originaire d'Asie centrale. L'homme a probablement utilisé *Vicia faba*. Dans sa nourriture dès le néolithique (Boyeldieu, 1991). Elle est essentiellement cultivée dans le bassin méditerranéen, en Amérique du sud et en Asie du Sud-est, cultivée aussi en Europe occidentale et du nord (Gallais et Bannerol, 1992).

### 2.3.2. Description de l'espèce (*Vicia faba*)

*Vicia faba* (Fève) est une espèce végétale appartenant à la famille des Fabacées (sous-famille des Faboïdées, tribu des Fabées) originaire d'Afrique du nord et du sud-ouest asiatique. C'est elle qui a donné son nom à cette famille par l'intermédiaire du genre *Faba* auquel elle appartenait, genre qui n'existe plus depuis fort longtemps, ayant été absorbé par le genre actuel *Vicia*. Il semble que "faba" vienne de l'indo-européen "bhabha" signifiant "fruit sec", qui a donné "haba" en espagnol, "fava" en italien et "fève" en français.

*Vicia faba* (Fève) est une plante herbacée annuelle haute de 50 centimètres à plus d'un mètre. Le terme désigne aussi bien la plante que son fruit.

Les feuilles alternées de couleur vert glauque ou grisâtre composées de deux ou trois paires de folioles opposées de forme ovale, son système racinaire est développé et descend profondément dans le sol (Chaux et Foury, 1994)



**Figure.2 :** Schéma représentatif des différentes parties de *Vicia faba* (Luayana, 2022)



**Figure.3 :** Aspect morphologique de La *Vicia faba* (Fève) (2022).

a) Plante, b) tige, c) feuille, d) fleur, e) gousse, f) graine.

*Vicia faba* (Fève) possède des fleurs qui sont généralement blanches avec des ailes noires, par deux à cinq petites grappes pédonculées (Guinochet et De Vilmorin, 1984).

- La fève maraîchère ou grosse fève (*Vicia faba* L. Var. Faba).
- La fève fourragère ou fèverole (*Vicia faba* L. Var. Minuta (hort. Ex Alef.).
- La petite fève présente des gousses qui ne contiennent que trois graines, très bonnes pour la consommation.
- La fève d'Aguadulce, très cultivée dans les jardins, présente des gousses d'une trentaine de centimètres.
- Autres légumineuses : autres *Vicia* (Vescès), Pois, Gesces (*Lathyrus*).

### 2.3.3. Position systématique de La *Vicia faba* (Fève)

D'après ITIS (Integrated Taxonomic Information System – Report) database version 2011, la fève est classée comme suit:

## 2.3.3.1. Taxonomie et nomenclature

**Tableau.2** : Systématique de La *Vicia faba* (Fève) ITIS (database version 2011).

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i> – plantes, <b>Planta</b> , <b>Végétal</b> , plantes
<b>Sous-règne</b>	<i>Viridiplantae</i> - plantes vertes
<b>Infra-règne</b>	<i>Streptophyta</i> – plantes terrestres
<b>Super-division</b>	<i>Embryophyte</i>
<b>Division</b>	<i>Tracheophyta</i> - plantes vasculaires, trachéophytes
<b>Subdivision</b>	<i>Spermatophytina</i> - spermatophytes, plantes à graines, phanérogames
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Super-ordre</b>	<i>Rosanae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Fabales</i>
<b>Famille</b>	<i>Fabacées</i> (pois, Légumineuses)
<b>Genre</b>	<i>Vicia L.</i> – vesce
<b>Espèce</b>	<i>Vicia faba L.</i> féverole

## 2.3.4. Intérêt alimentaire

*Vicia faba* (Fève) constitue avec les autres légumineuses, la seconde source protéique pour l'alimentation humaine et animale après les céréales. Elle offre de grandes possibilités pour l'alimentation des animaux d'élevage grâce à son excellente valeur nutritive (Daines M, 2018). Elle renferme un taux élevé en protéine, tout en restant un aliment énergétique (55% de glucides; 340 cal/100g) et peut efficacement remplacer les protéines animales dans les pays pauvres (Fachmann et Kraut, 1995).

Cette légumineuse est également une excellente source de fibres, de vitamines de groupe B en particulier (B3, B5, B9 ou acide folique) et de vitamine C, 8 minéraux tel que : le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc (Mezani S, 2011). Elles sont considérées parmi les cultures les plus riches en matières nutritives (Mouafek A, 2010).

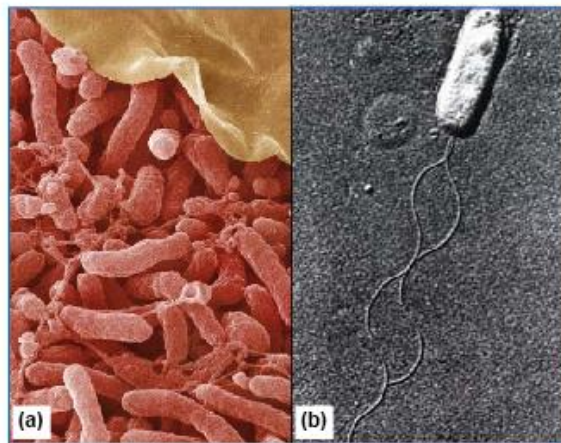
### 3. Les microsymbiontes

#### 3.1. *Rhizobium*

Le terme *Rhizobium* vient du grec *Rhiza*=racine et *bios*=vie et provient de la première appellation au XIXème siècle du premier genre bactérien vivant dans le sol et pouvant noduler les légumineuses. Par convention, on nomme « *Rhizobium* » toute bactérie, quel que soit son genre, capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse (Vincent, 1970).

Les *Rhizobia* sont d'abord définis par leur aptitude à induire la formation de nodosités fixatrices d'azote sur les racines ou les tiges des légumineuses et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante (Andrews M. et Andrews M. E, 2017).

Les *rhizobia* sont des bactéries du sol et de la rhizosphère capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses et de favoriser leur croissance dans les sols pauvres en azote (Sprenst, 1995). Ainsi, les *rhizobiums* sont utilisés comme engrais biologiques et en tant qu'inoculants dans l'agriculture depuis plus d'un siècle (Van et Hartley, 2000).



**Figure.4 :**a) *Rhizobium* sous microscope électronique à balayage (Power and Syred, 2010),

b) *Rhizobium* sous microscope électronique (Jordan, 1984).

#### 3.2. Caractérisation des *Rhizobium*

##### 3.2.1. Caractères généraux

Les *rhizobiums* sont des bactéries de la famille des *Rhizobiacées*, sont des bâtonnets mobiles (présentant un flagelle polaire ou subpolaire ou des flagelles péritriches qui lui

confèrent sa mobilité.) de 0,5 à 0,9 sur 1,2 à 3,0  $\mu\text{m}$  à Gram négatif aérobies, non sporulantes (Grama, 2008).

### 3.2.2. Caractère biochimique et physiologique

Rhizobium possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobiose ; alors que dans les conditions d'anaérobiose, les espèces rhizobium peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Werner, 1992 et Benguedouar, 2000). La voie d'Enter-Doudoroff est le mécanisme principal du métabolisme des carbohydrates (Werner, 1992).

### 3.3. Diversité et classification des Rhizobium

Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de la caractérisation des rhizobiums mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celle de la structure génomique (Krishnan et Bennet, 2007). Les recherches récentes indiquent que la diversité des rhizobiums, comme celle de tous les autres micro-organismes, est extrême (Amarger, 2001). La classification des rhizobiums a subi de nombreuses modifications ces dernières années et les propositions de remaniements futurs seront nombreuses. (Le tableau 3) tente simplement de refléter l'état des connaissances actuelles sur la taxonomie des rhizobiums (D'après Weir, 2016).

### 3.4. Systématique des Rhizobium

Les rhizobiums comprennent plus de 100 espèces, dont 11 genres appartenant à la sous classe d'alphaprotéobactéries (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Shinella*) et 2 genres appartenant à la sous classe des betaprotéobactéries qui sont *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Weir, 2016). Des études récentes ont signalé la présence d'autres sous classes dont  $\gamma$ -proteobactéries et Actinobactéries (Meyer et al, 2011).

**Tableau.3 :** Majeures familles et genres de bactéries capables de noduler les légumineuses. (Desiraju et al, 2018;Shamseldin et al, 2017).

Rhizobium		Plante hôte
Classe	$\alpha$ -Proteobacteries	
Order I	<i>Rhizobiales</i>	

<b>Famille 1</b>	<i>Rhizobiaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Rhizobium</i> (98)	Differentes planteshôtes : Peas, Clover, Lupin, Soybean, Lotus, Phaseolus, Astragalus, Chickpea, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Medicago, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mungbean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pongamia, Arachis, Pueraria
	<i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) (21)	Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopi, Kummerowia, Leucaena, Abrus, Lotus, Argyrolobium,
	<i>Allorhizobium</i> (1)	Neptunia
	<i>Shinella</i> (1)	Kummerowia
	<i>Pararhizobium</i> (5)	Tumor de fruits (non-symbiotic)
<b>Famille 2</b>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Mesorhizobium</i> (40)	Differentes planteshôtes, Chickpea, Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amorpha, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora
	<i>Phyllobacterium</i> (8)	Lathyrus, Argyrolobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora
	<i>Aminobacter</i> (1)	Anthyllis
<b>Famille 3</b>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Bradyrhizobium</i> (37)	Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeshynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaesolus, Cowpea, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus
	<i>Blastobacter</i> (2)	Aeschynomene
	<i>Photorhizobium</i> (1)	Aeschynomene
<b>Famille 4</b>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Devosia</i> (1)	Neptunia
	<i>Azorhizobium</i> (3)	Sesbania
<b>Famille 5</b>	<i>Methylobacteriaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Methylobacterium</i> (3)	Crotalaria, Trifolium phyllosphere
	<i>Microvirga</i> (4)	Lupinus, Listia, Cowpea
<b>Famille 6</b>	<i>Brucellaceae</i>	
<b>Genre</b>	<i>Ochrobacterium</i> (2)	Lupinus, Cytisi
<b>Order II</b>	<i>Burkholderiales</i>	
<b>Famille 1</b>	<i>Burkholderiales</i>	
<b>Genre</b>	<i>Burkholderia</i> (17)	Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid
	<i>Cupriavidus</i> ( <i>Ralstonia</i> ) (2)	Mimosa, Phaseolus, Leucaena

## 4. Association symbiotique *Rhizobium*- Légumineuse fixatrice d'azote

### 4.1. Généralités

En biologie, plusieurs définitions du terme « symbiose » existent. Au sens large, le terme « symbiose » définit une interaction entre deux espèces intimement liées sur le long terme, peu importe sa nature (Bary, 1879). Le sens premier de la symbiose se base donc simplement sur la coexistence de deux organismes et les effets de l'un sur l'autre, Les bénéfiques de ces symbioses sont souvent liés à l'exploitation, la disposition et le partage de ressources entre deux partenaires (Lefèvre et *al*, 2010).

Ce travail de mémoire est centré sur un type de plante en particulier : les légumineuses "fève ". Ces plantes ont la particularité de pouvoir subvenir à leurs besoins en azote par l'association à certaines bactéries « les rhizobiums» et de mettre en place un organe spécialisé sur les racines qualifié de nodule. C'est à l'intérieur de cet organe que les rhizobiums sont capables de transformer l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante (Graham et Vance, 2003).

### 4.2. La symbiose fixatrice d'azote

La fixation azotée symbiotique est le processus biologique qui permet de convertir l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en ammoniacque grâce à la présence d'une enzyme spécifique, la nitrogénase (De Bary, 1879) qui est alors assimilable par les organismes vivants pour constituer les molécules organiques (notamment les protéines).

Pour la légumineuse, tout part d'un dialogue moléculaire entre la plante hôte qui sécrète des flavonoïdes et des bactéries du sol, du genre *Rhizobium*. Dont les facteurs Nod sont reconnus par la plante, ce qui déclenche le processus d'infection et la formation de petites excroissances sur les racines : les nodosités. Puis la symbiose se traduit par des échanges réciproques de nutriments entre la plante et le *rhizobium* hébergé et transformé en bactéroïde dans la nodosité : la plante fournit sucres et énergie et elle bénéficie de l'azote minéral produit par le bactéroïde par fixation de l'air ambiant (Schneider et *al*, 2005).

### 4.3. Symbiose plante-microorganisme

Deux types de symbioses plantes/microorganismes peuvent être distingués. Tout d'abord, les symbioses dites associatives dont la plus connue fait intervenir des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Dobbelaere et *al*, 2001; Franche et *al*, 2009).

D'autres part, les symbioses dites mutualistes qui aboutissent à une différenciation morphologique chez l'un ou les deux partenaires (Bertrand *et al*, 2011). Les symbioses mutualistes plantes/microorganismes les plus étudiées sont les symbioses mycorhiziennes entre les plantes et les champignons (Hebeloma, Glomus, etc.), ainsi que les symbioses fixatrices d'azote impliquant des légumineuses (avec des Rhizobiums) ou des plantes actinorhiziennes (Marmeisse *et al*, 2004; Normand *et al*, 2007; Franche *et al*, 2009).

L'interaction symbiotique qui réunit les légumineuses et les rhizobiums permet à la plante d'utiliser les 78% de l'azote ( $N_2$ ) présent dans l'atmosphère, en utilisant la capacité de fixation du  $N_2$  de la bactérie (Berger, 2019)

#### 4.4. Enzyme nitrogénase

L'enzyme nitrogénase est extrêmement sensible à l' $O_2$ . La fixation des bactéries a besoin de mécanismes excluant  $O_2$  pour le  $N_2$  (ceci correspond à l'activité de nitrogénase). Beaucoup de bactéries comme Azotobacter excluent l' $O_2$  à travers une respiration rapide où la formation de polysaccharides extracellulaires. De plus, beaucoup de bactéries diazotrophes fixeront le  $N_2$  selon des conditions de microaerophilie ou anaérobie (M.M.Roper, 2018).

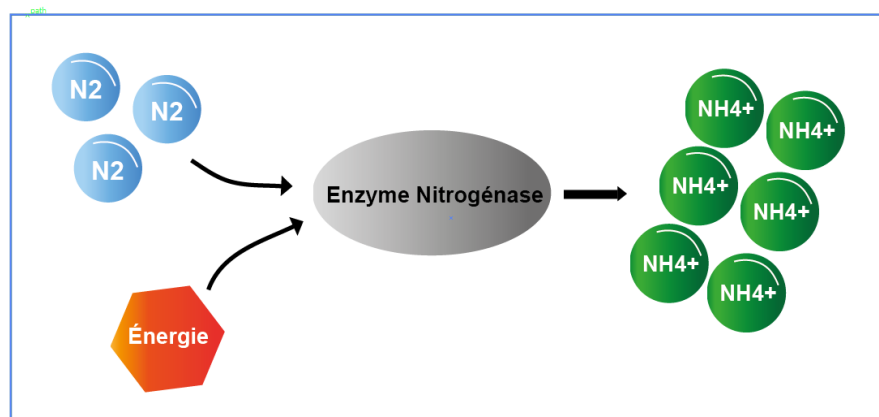


Figure.5 :Fonction du nitrogénase.

#### 4.5. Les facteurs de fixation symbiotique d'azote

De nombreux facteurs favorisent cette symbiose (FAO, 1992):

- Des conditions favorables au développement de la plante (climat...).
- Des souches de rhizobium spécifiques et en quantité suffisante.
- Un sol bien aéré pour la croissance des bactéries,

- Pas de carence en molybdate et bore qui sont les 2 cofacteurs de la nitrogénase,
- En fin, peu d'azote combiné au sol ce qui diminuerait la fixation d'azote atmosphérique.

Ainsi, la réunion de toutes les conditions optimales permet, par l'association rhizobiums-légumineuse, de fournir à la plante jusqu'à 90% de l'azote (Aabnf, 1990).

#### **4.6. Symbiose légumineuse-*Rhizobium***

La spécificité d'hôte est l'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobiums-légumineuse.

Chaque espèce bactérienne possède un spectre d'hôte bien défini dont l'amplitude est très variable (Broughton et *al*, 1984).

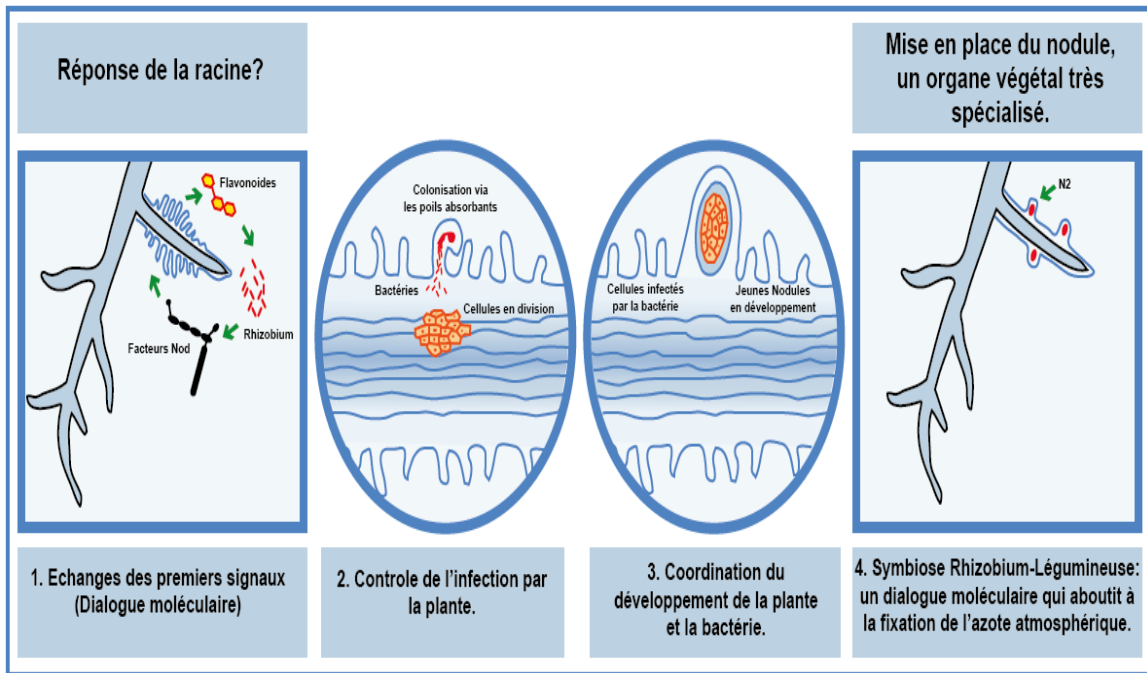
La symbiose légumineuse/Rhizobiums est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, et pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. La plante fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven et *al*, 2000). Et grâce à ce phénomène une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée

### **5. Nodulation**

#### **5.1. Formation et mécanisme des nodules**

Un système de dialogue a été mis en place entre la bactérie et la plante hôte basé sur un échange de molécules chimiques. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes attirent le rhizobium dans le voisinage de la racine et activent les gènes bactériens NOD, qui codent pour les facteurs de nodulation NOD (Downie, 1998; Ramos et Bisseling, 2004; Downie, 2005).

Ces facteurs, sécrétés par le rhizobia stimulent la division des cellules de la partie corticale des racines conduisant à la formation d'un méristème primaire (Heller et *al*, 2000; Macheix et *al*, 2005).

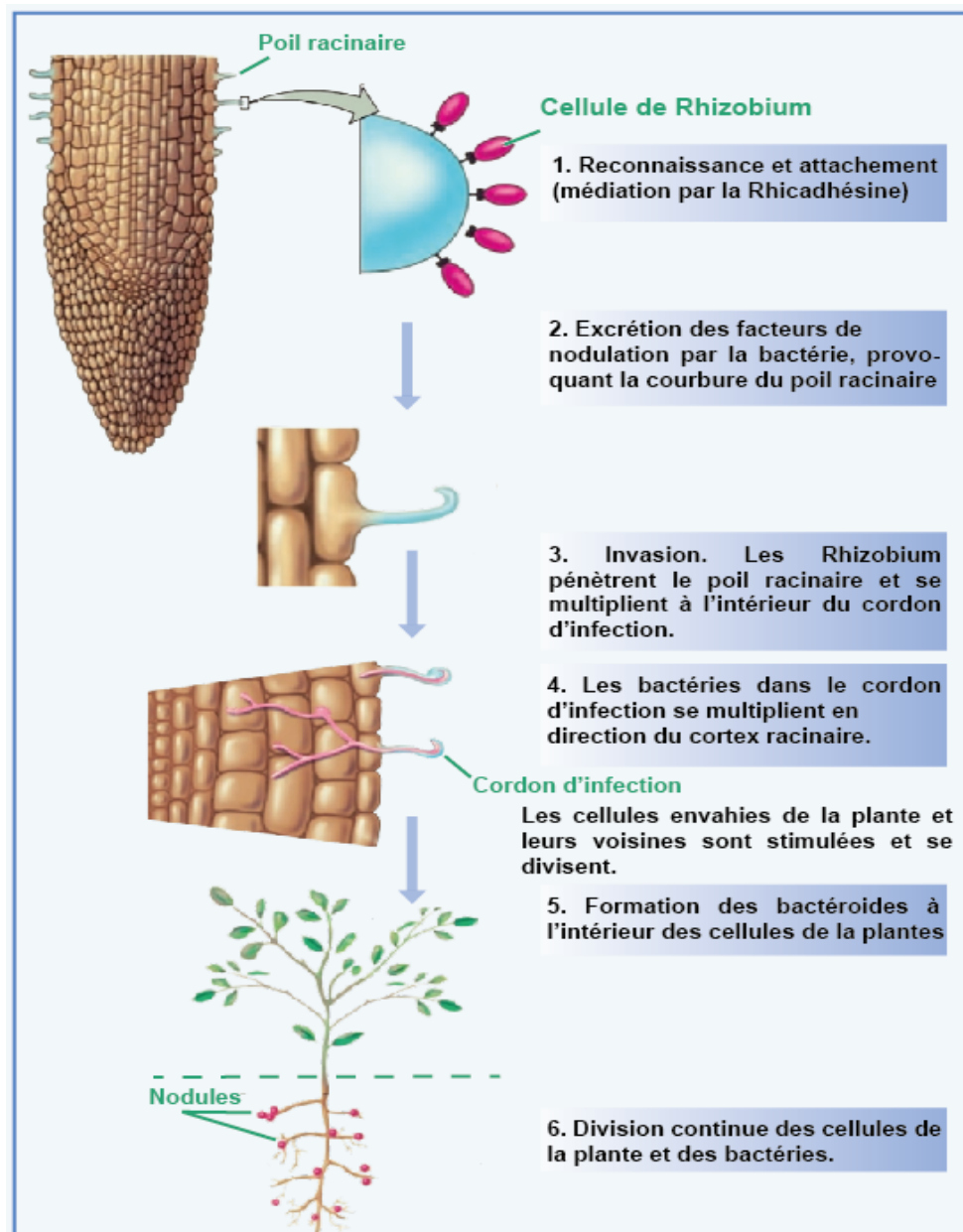


**Figure.6 :** Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004) (Adobe illustrator 2022).

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine (protéine liant le calcium), localisé à la surface des cellules de rhizobium. Elle permet l'adhésion en complexant le calcium présent à la surface des racines. D'autres substances comme les lectines, jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Krishnan et Bannett, 2007).

La croissance et le déplacement de la bactérie dans la racine entraînent la formation d'une excroissance ou filament infectieux (Panagiota et *al*, 1995; Gage, 2004). L'infection s'étend progressivement aux cellules situées à proximité du site d'infection.

Les bactéries prolifèrent rapidement à l'intérieur des cellules végétales ou elles prennent des formes plus ou moins globuleuses, boursoufflées parfois branchées, devenant ainsi des bacteroides. Ces derniers sont enfermés individuellement ou à plusieurs dans des vésicules limitées par une membrane péribactéroïdienne dérivant de la cellule végétale pour former un ensemble nommé symbiosome (Parniske, 2000; Werner, 2007).



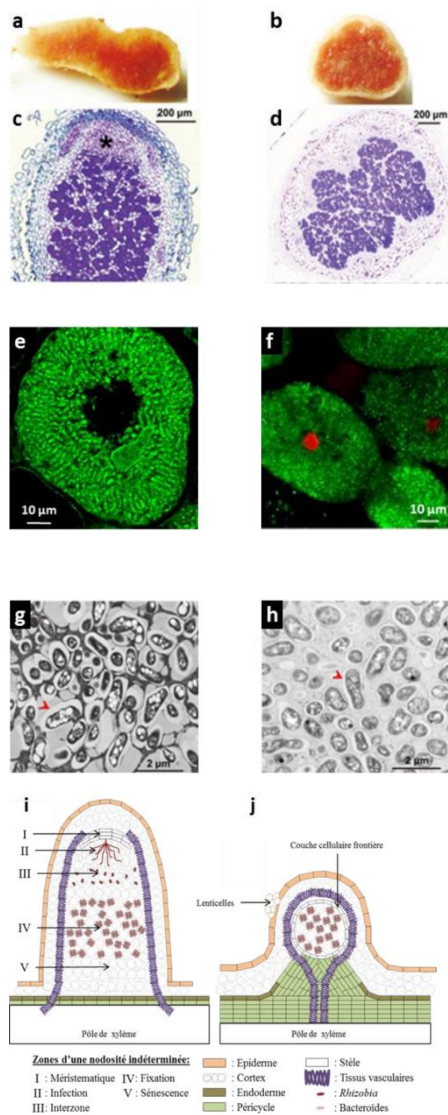
**Figure.7** : Processus de nodulation d'une plante légumineuse infectée par *Rhizobia* (Madigan et Martinko, 2007) (Adobe illustrator 2022).

## 5.2. Morphologie des nodules

Généralement le nodule des Légumineuses est constitué d'un simple lobe, il existe deux principaux types de nodules : déterminés et indéterminés (Allen O.N.et Allen, E.K, 1981).

- Les nodules indéterminés : allongés et cylindriques et se développent par croissance distale à partir d'un méristème apical persistant.

- Les nodules déterminés : Sphériques et se développent à partir d'un méristème hémisphérique non persistant.



**a et b :** Coupes longitudinales de nodosités. La zone rouge correspond à la zone de fixation du diazote, caractérisée par l'accumulation de légghémoglobine.

**c et d :** Coupes longitudinales colorées au bleu de toluidine.

**e et f :** Coloration Live-dead d'une cellule infectée de la zone de fixation (en vert les bactéroïdes, en rouge le noyau de la cellule végétale).

**g et h :** Observation au microscope électronique à transmission des bactéroïdes au sein des cellules infectées. Les flèches rouges représentent les membranes péri-bactéroïdiennes.

**i et j :** Schéma d'une nodosité indéterminée i) et une nodosité déterminée j).

**Figure.8 :** Nodosités indéterminées (à gauche) et déterminées (à droite) (Liu et al, 2015).

### 5.3. Génétique de la nodulation

Lors de l'étape de la reconnaissance entre les rhizobiums et les plantes hôtes, les flavonoïdes induisent l'activation des gènes nod et la synthèse des lipochitoooligosaccharides (LCOs) (Dénarié et al, 1996) émis par la bactérie qui sont à leur tour à l'origine de l'activation d'autres gènes végétaux ou bactériens (Bladrgroen et Spaink,1998).

Ces LCOs ont été nommés facteurs Nod et sont responsables de changements physique et physiologique chez la plante hôte, comme la déformation des racines, la division cellulaire et l'organisation du primordium nodulaire. Les gènes nod sont déterminants dans la spécificité de l'hôte (Denarié, 1992; Geurts et *al*, 2005; Mulder et *al*, 2005; Chen et *al*, 2006). En effet, la longueur et la saturation de la chaîne de l'acide gras ainsi que les différents substituants greffés sur le squelette du LCO jouent un rôle crucial dans la spécificité entre la bactérie et la plante (Perret et *al*, 2000).

#### 5.4. Facteurs limitant de la formation des nodules

Les facteurs du milieu pouvant limité la formation des nodules sont principalement: l'acidité du sol, l'humidité du sol, le déficit hydrique, la température et la lumière. Lorsque le pH du sol est inférieur à 4,5, la toxicité en ions aluminium augmente et dans ce cas les légumineuses à l'exception du niébé nodulent peu (Nwaga et Nkot, 1998). Un déficit hydrique entraîne une diminution très rapide de l'alimentation en oxygène des nodules et par conséquent une interruption de l'apport d'ATP à la nitrogénase (Obaton, 1992).

Des températures comprises entre 20 et 30°C permettent la croissance des Rhizobiums et leur habileté à former des nodules (Graham, 2000). La lumière est indispensable aux légumineuses pour la fixation de l'azote, car elle augmente l'approvisionnement en photo-synthétats. A l'obscurité la, l'hémoglobine s'altère et l'intensité de la fixation est réduite. (Mvondo Awono, 1997 cité par Guimbirké ,2011), avait observé que la nodulation et la fixation d'azote atmosphérique étaient fonction des techniques culturales, de l'itinéraire technique et des conditions pédoclimatiques.

Un pH inférieur à 5,5 est considéré comme préjudiciable aux cultures et tous les auteurs s'accordent sur le fait qu'en de çà de cette valeur de pH, une correction de l'acidité est nécessaire.

# *Chapitre 02*

## *Matériel et méthodes*

Notre étude appliquée fut menée au niveau du complexe des laboratoires pédagogiques de la Faculté des sciences de la nature et de vie à El Hamma, sous la direction de responsable du hall de technologie Mme : Chorfi. R

- 90 % des équipements nécessaires pour un travail bien organisé sont disponible au niveau de laboratoire microbiologique
  - Étuve bactériologique.
  - Four Pasteur et Autoclave.
  - Hotte Sorbonne microbiologique.



**Figure.9** : complexe des laboratoires pédagogiques de la Faculté des sciences de la nature et de vie à El Hamma (Khenchela).

## **1. Échantillonnage et sites d'échantillonnage**

### **1.1. Échantillonnage des nodules**

La collecte des échantillons à partir des racines de différentes plante de *Vicia faba* L est réalisée au niveau de deux sites d'échantillonnage : M'Toussa et Ain Djerboua. Ces sites se trouvent dans la wilaya de Khenchela (Est Algérien).

La sélection et l'échantillonnage des nodules racinaires doivent être réalisés durant une période bien précise pendant laquelle la plante est en phase de floraison cette dernière a été réalisée le 12 avril 2022 à partir des racines de la plante de fève dans la région de M'Toussa, et durant la période de 5/19 avril 2022 dans la région d'Ain Djerboua (2 zones différentes), à cette période les nodules sont bien visibles et développés présentent une couleur virant vers le rose qui indique la présence de la fixation d'azote.

La collecte est réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970) : il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur dans le sol pour extraire la plante et ses racines.

Manuellement, Nettoyer et rincer soigneusement les racines afin d'éviter d'endommager les nodules. Les racines sont ensuite placées dans des sacs Kraft et transportées vers le laboratoire.

### **1.2. Échantillonnage de sol**

L'échantillonnage de sol est réalisé à une profondeur de 15 à 20 cm dans les endroits dans lesquels les plantes trouvent la majeure partie de leur alimentation dans ce volume de terre. Pour qu'un échantillon soit représentatif, il faut :

- Prélever sur une zone homogène.
- Prélever toujours à la même saison.
- Transporter dans un sac du papier kraft au laboratoire.

### **1.3. Présentation générale de région de M'Toussa**

Le prélèvement fut extrait sur un champ privé d'une ferme de la commune de M'Toussa au nord de la wilaya de Khenchela.

**Tableau.4 :** Informations géographique concernant la ville de **M'Toussa**.

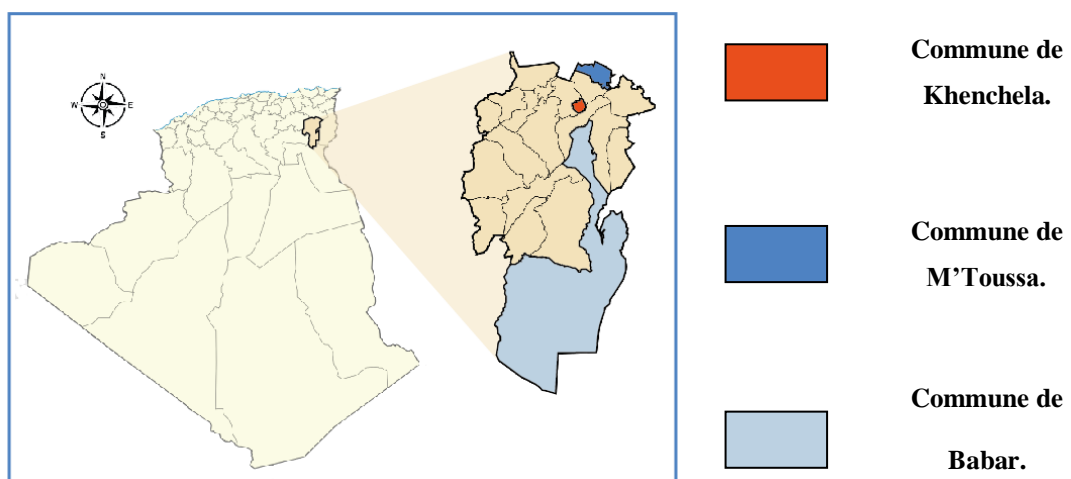
<b>Coordonnées géographiques</b>	<b>Latitude: 35.5994, Longitude: 7.24497</b> 35° 35' 58" Nord, 7° 14' 42" Est
<b>Altitude</b>	855 m
<b>Climat</b>	Climat méditerranéen avec été chaud (Classification de Köppen: Cs a)

#### 1.4. Présentation générale de région d'Ain Djerboua

Le prélèvement fut extrait sur un champ privé d'une ferme du village d'Ain Djerboua (Babar) au sud de la wilaya de Khenchela.

**Tableau.5 :** Informations géographique concernant la ville d'Ain **Djerboua**.

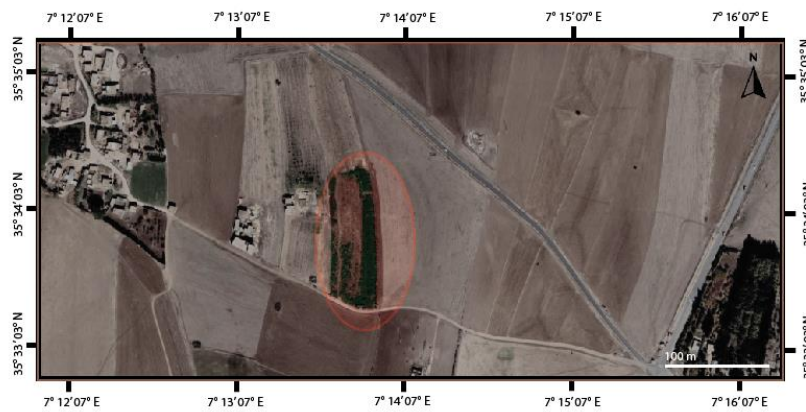
<b>Coordonnées géographiques.</b>	<b>Latitude: 35. 59287, Longitude: 5.27494.</b> 35° 10' 9" Nord, 7° 6' 5" Est
<b>Code région</b>	27
<b>Climat</b>	Climat semi-aride sec et froid (Classification de Köppen: BSk)



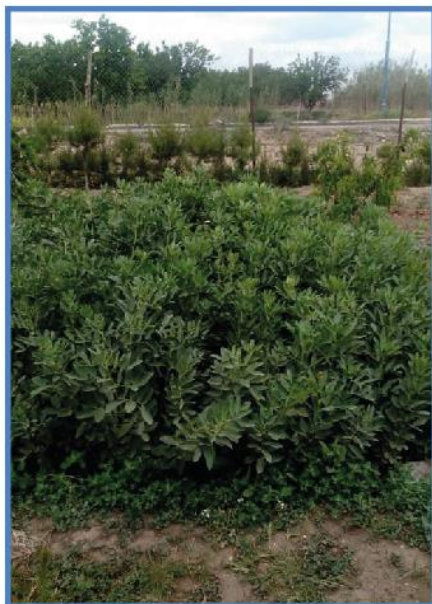
**Figure.10 :** Localisation géographique des communes d'échantillonnages (Ai 2022).



**Figure.11** : Image satellite de la zone de Ain Djerboua (Google maps, 2022).



**Figure.12** : Image satellite de la zone de M'Toussa (Google maps, 2022).



**Figure.13** : Zone de prélèvement M'Toussa.



**Figure.14** : Zone de prélèvement Ain Djerboua.

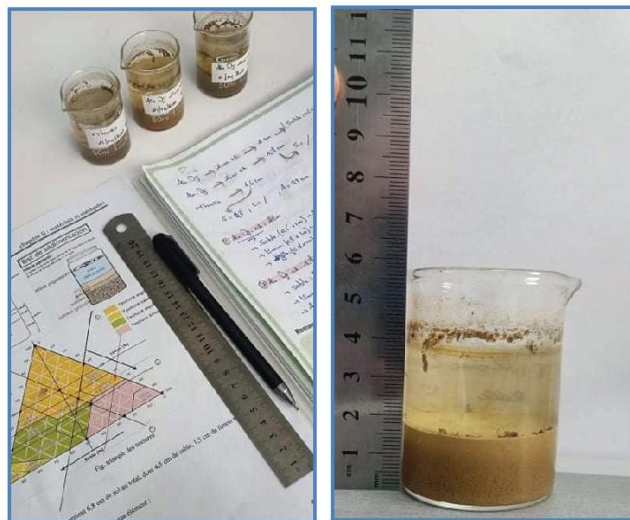
## 2. Analyse pédologique de l'échantillon de sol

L'analyse de sol est un outil d'aide à la décision pour conduire la fertilisation des sols agricoles. Cette fertilisation est nécessaire pour assurer un bon développement des plantes.

### 2.2. Analyse physique

#### 2.2.1. Granulométrie

Mise d'un échantillon de sol dans un bécher. Ajout d'eau jusqu'au 2/3. Ensuite laisser sédimenter quelques jours afin de laisser apparaître les strates permettant la mesure des différents éléments composants l'échantillon de terre (Annexe 02).



**Figure.15** : Test de sédimentation.

#### 2.1.2. Humidité

Un vase a pétri contenant notre échantillon a été pesé, puis placé dans un four pasteur à 105 °C pendant 48 heures pour sécher et ensuite repesé (Petard, 1993).

### 2.3. Analyse chimique

#### 2.3.1. pH

##### ➤ pH eau

Mise d'un échantillon de sol dans un bécher étiqueté. Ajout d'eau en proportion de 5 pour 1. Ensuite passé à l'agitateur pendant 30 secondes et laissé reposer durant une heure. Le pH de l'eau fut effectué à l'aide d'un pH-mètre.

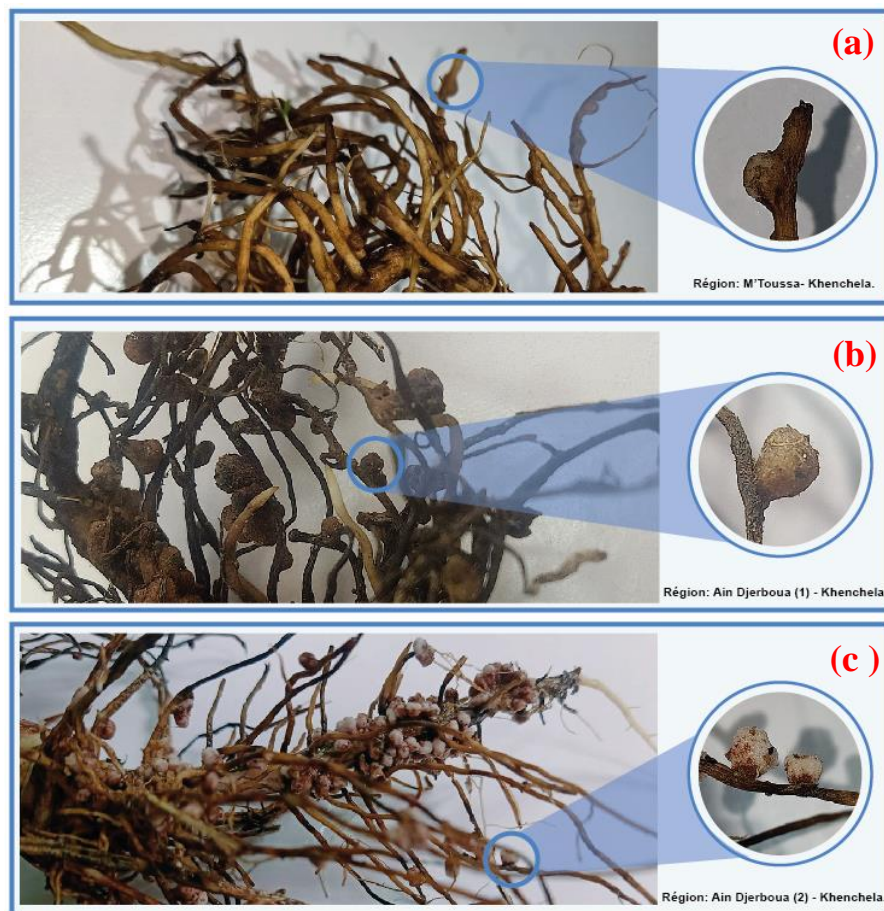
➤ pH Kcl

5 volumes de Kcl 1M (Annexe 01) ont été ajoutés à la suspension précédente, ensuite, le mélange secoué est laissé reposer pendant 1 heure. La lecture du pH se fait un pH mètre (Petard, 1993). Entre chaque mesure, l'électrode est rincée avec de l'eau distillée.

### 3. Collecte des nodules

Au laboratoire les racines sont rincées avec l'eau du robinet pour éliminer le reste du sol et séchées avec un papier absorbant. A l'aide d'un ciseau les nodules sont ensuite détachés à 2 mm de leur point d'attachement, une partie des nodules est utilisée directement pour l'isolement et l'autre partie subit une conservation.

Les nodules sont de différentes formes de types indéterminés, Bilobés et polylobés (Fig.16).

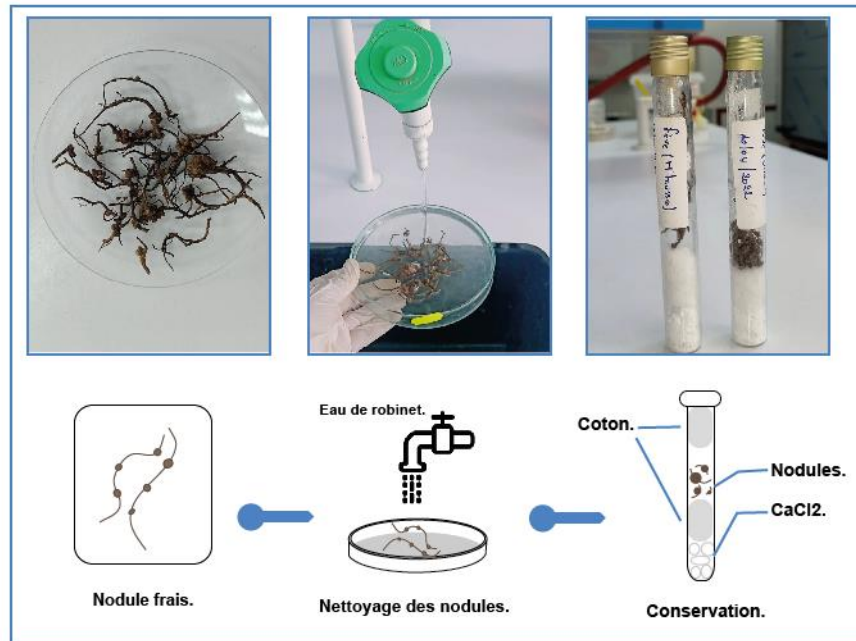


**Figure.16** : Aspects des nodules de *Vicia faba L* (Ai 2022).

(a) forme indéterminé, (b) polylobés, (c) Bilobés.

### 3.1. Conservation des nodules

Pour une conservation de longue durée (6 à 12 mois), le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) anhydre a été utilisé. La dessiccation fut réalisée dans des tubes à essai rempli au  $\frac{3}{4}$  de leur volume, par du  $\text{CaCl}_2$  recouvert d'une couche de 1 cm de coton cardé, sur lequel sont déposés les nodules, puis sont conservées au réfrigérateur.



**Figure.17 :** Conservation des nodules.

Des milieux de culture contenant les sources d'énergies nécessaires à la croissance des bactéries, ont été préparées (des milieux spécifiques) (Annexe 01) :

- Milieu liquide : YMB (Yeast Manitol Broth).
- Milieu solide: YMA (Yeast Manitol Agar).
- Milieu solide: YMA+ RC (Yeast Manitol Agar + Red congo).
- Milieux solides ; YMA+BTB (Yeast Manitol Agar + Blue de Bromothymol).
  - Autoclavage des milieux se fait à  $120^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes.

### 4. Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), habituellement les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés et placés dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis sont utilisés directement après une heure à température ambiante. Mais dans notre cas, nous avons travaillé directement avec des nodules frais grâce à la collecte saisonnière des fèves.

Sous la hotte Sorbonne microbiologique, les nodosités sont immergées dans l'éthanol 95% pendant 5 secondes, puis transférées rapidement dans de l'eau de javel pendant 4 minutes.

La stérilisation est suivie par un abondant rinçage à l'eau distillée stérile 10 fois. Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres micro-organismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules (Fig.18).

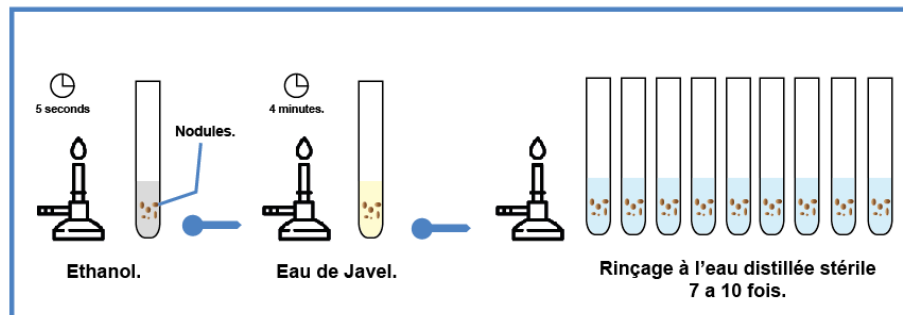


Figure.18 : Stérilisation des nodules.

L'un des nodules stérilisés estensemencé en le faisant passer sur le milieu YMA+RC, puis incubé à 28°C pendant 24 heures afin de confirmer la stérilisation (Fig.19).

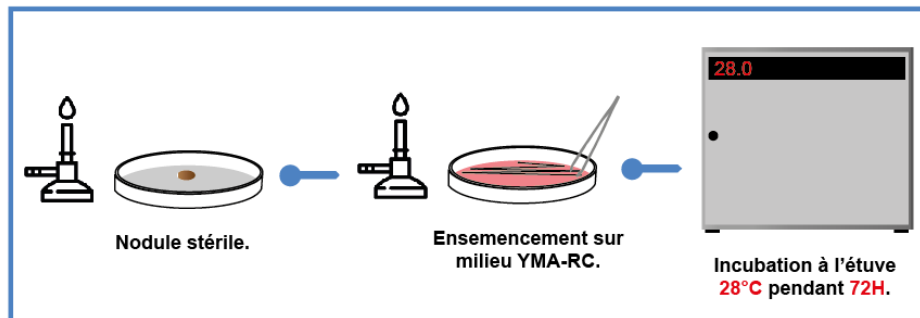
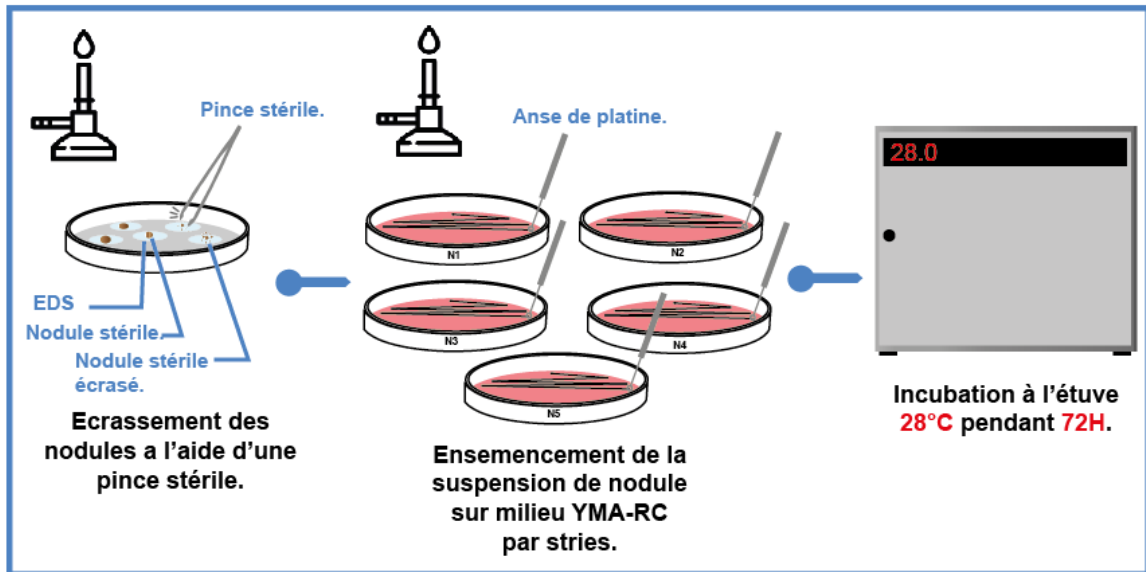


Figure.19 : Test de stérilisation.

Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile dans chacune d'elles est déposée un nodule stérilisé. Le nodule est écrasé à l'aide d'une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

A l'aide d'une anse de platine, la suspension de nodule est étalée selon la technique des stries sur le milieu YMA+RC de manière à isoler des simples colonies. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 jours avec une vérification périodique (Fig.20).

Les Rhizobiums absorbent faiblement le rouge Congo (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) par apport aux contaminants.



**Figure.20 :** Isolement des isolats selon la méthode des nodules écrasés.

#### 4.1. Purification des isolats

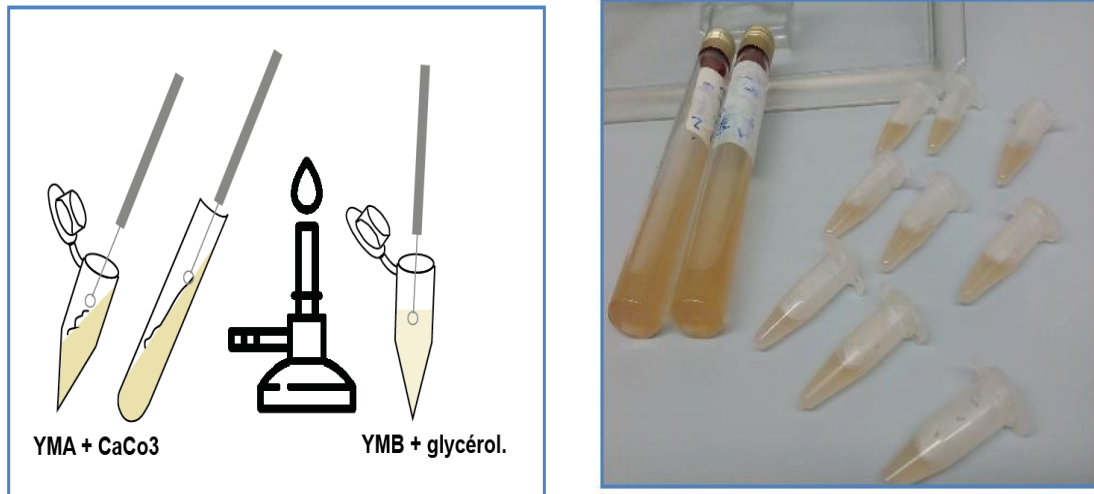
À partir des boîtes précédentes, des colonies sont prises et ensemencées selon la technique des trois cadrans sur un milieu YMA. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72h avec une vérification périodique.

La pureté des isolats a été vérifiée par le repiquage sur milieu YMA jusqu'à l'obtention des colonies pures isolées.

#### 4.2. Conservation des isolats

La conservation se fait sur un milieu YMA  $\text{CaCO}_3$  (3g /l) comme agent neutralisant l'acidité. Après l'autoclavage le milieu a été coulé dans des tubes d'Eppendorf incliné et ensemencé avec des isolats dans leur phase exponentielle par des stries régulières sur la surface de la gélose. Incubé pendant 3 jours à 28°C. Ensuite les tubes sont conservés dans un réfrigérateur à 4°C.

- Cette méthode est pour une conservation de longue durée (6 à 12 mois).



**Figure.21:** Conservation des isolats.

## 5. Caractérisation phénotypique des isolats

### 5.1. Caractérisation macroscopiques

Il est nécessaire de mettre en évidence des colonies développées d'une culture de 24 à 72 heures à 28°C sur le milieu YMA. Pour une caractérisation morphologique des isolats, Les principaux critères retenus sont : la taille des colonies, la forme et la couleur.

### 5.2. Caractérisation microscopiques

Deux techniques furent utilisées pour observer la morphologie cellulaire bactérienne au microscope optique:

#### 5.2.1. État frais

Un inoculum de colonies prélevé par une anse de platine se mélange dans une goutte d'eau distillée puis sous microscope optique se réalise une lecture. Ce test permet de déterminer la forme et la mobilité des bactéries.

#### 5.2.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de vérifier la pureté de la culture et de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. (Annexe 02)

### 5.3. Test de la mobilité

Sous la hotte Sorbonne microbiologique une colonie a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur, puis elle a été ensemencée par la technique de piqûre centrale dans des tubes à vis contenant un mannitol-mobilité incubation 28° pendant 48 h.

La lecture est effectuée par un virage de couleur du rouge au jaune si la bactérie fermente le mannitol. Et diffusion de la bactérie dans le milieu autour de la piqûre si elle est mobile.

### 5.4. Caractérisation nutritionnels

#### 5.4.1. Assimilation de la source de carbone

Le test fut réalisé dans des boîtes à pétries contenant le milieu YMA dans lequel l'extrait de levure est remplacé par 0.1% de NH<sub>4</sub>Cl et le mannitol est remplacé par 1% de l'un des sucres suivants: D-Saccharose, D-Glucose et Fructose, qui sont considérés comme source de carbone

L'assimilation des sucres est révélée par l'apparition de colonies sur le milieu après incubation pendant 24 à 48h à 28° C.

#### 5.4.2. Assimilation de la source d'azote

Le test est réalisé sur des boîtes à pétries ensemencé par des souches pures sur YMA ou l'extrait de levure est remplacé par des acides aminés considéré comme source d'azote : L-Asparagine, L-Leucine, D-Histidine.

L'assimilation des acides aminés est révélée par l'apparition de colonies sur le milieu après incubation pendant 24 à 48heures à 28°C.

### 5.5. Caractérisation physiologique

L'effet des facteurs environnementaux sur *Rhizobium* et la fixation de l'azote sont liés à des facteurs environnementaux comme le stress osmotique, stress acide et choc thermique.

Les paramètres témoins sont : pH (6.8), NaCl (0. 10%) et Température d'incubation (28°C).

#### 5.5.1. Effet de salinité

Les tests de tolérances au sel sont réalisés dans des tubes à vis, chaque tube ensemencé à partir de la suspension et contient le milieu YMB de différents

pourcentages de NaCl : 0.010%, 0.50% et 1%, puis ils sont incubés pendant 24 jusqu'au 48h à 28°C. Lecture avec un spectrophotomètre après 24h et 48h à une longueur d'onde de 630 nm. Les résultats sont comparés au témoin.

Le même test est réalisé sur des boîtes de pétris dans un milieu YMA avec des différents pourcentages d'NaCl: 0.010%, 0.50% et 1%,ensemencé après une incubation de 24 jusqu'au 48h à 28°C. La croissance des isolats est évaluée par l'apparition de colonies dans les boîtes de pétris.

### **5.5.2. Effet d'acidité**

Les tests de tolérances au pH sont réalisés dans des tubes à vis chaque tube contient le milieu YMB de différents pH :(3). (5) et (9) après incubation pendant 24 à 48h à 28°C. Lecture avec un spectrophotomètre après 24h et 48h à une longueur d'onde de 630 nm. Les résultats sont comparés au témoin.

Le même test est réalisé par des boîtes de pétri sur un milieu YMA avec des différents pourcentages pH : (5). (9)ensemencé après une incubation 24 à 48h à 28°C.

### **5.5.3. Effet de la Température**

Le test de température est réalisé dans des tubes à vis et dans des boîtes à pétriensemencé a partir des suspensions au même temps, ensuite sont déposés dans des différentes températures (4°C), (37°C) et (44.5°C) la lecture se réalisée après 24et 48 h.

La lecture par spectrophotomètre à 630 nm de longueur d'onde et les boîtes par l'apparition des colonies

## **5.6. Caractérisation biochimiques**

L'objectif est de retrouver la présence des différentes enzymes synthétisées par nos souches bactériennes, qui jouent un rôle dans le phénomène de symbiose.

### **5.6.1. Vitesse de croissance**

Après avoir obtenu les isolats pures et à partir de ces boîtes des colonies sont prises et ensemencées selon la technique des trois cadrans sur un milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB).Les boites sont incubées à 28° pendant 48h.

Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries à croissance rapide effectuent

une réaction acide qui change la couleur verte du milieu en jaune (Somasegaran et Hoben, 1994).

### **5.6.2. Étude des enzymes respiratoires**

#### **5.6.2.1. Test catalase**

En déposant une colonie de chaque souche à analyser sur une lame au contact d'une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction positive se traduit par la formation de bulles d'air (effervescent).

#### **5.6.2.2. Test oxydase**

Ce test se réalise à l'aide de disques sur lesquels une colonie est déposée. Le résultat positif se manifeste par l'apparence de la couleur rose-violet, si le disque reste incolore, il s'agit d'une réaction oxydase négative.

### **5.6.3. Recherche des enzymes spécifiques**

#### **5.6.3.1. Résistances aux antibiotiques**

L'essai est exécuté par des suspensions bactériennes préparées par de l'eau physiologique stérile dans leur phase exponentielle. Des disques d'antibiogrammes sont déposés dans des boîtes de pétri contenant du milieu YMAensemencé par ces dernières suspensions. L'ensemencement est réalisé sous forme de spots et les antibiotiques utilisés sont : pénicilline et la tétracycline. Deux répétitions sont réalisées pour chaque antibiotique.

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des rhizobiums comme un moyen d'identification (Beck *et al*, 1993).

#### **5.6.3.2. Hydrolyse d'urée**

L'urée est un composé organique qui peut être utilisé comme source unique d'azote pour les bactéries qui ont de l'uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcaline le milieu de culture (Delarras, 2007 ; Lanotte et al, 2007).

Les souches sont cultivées sur un milieu YMA qui contient 2% (p /v) d'urée et 0.012 % de rouge de phénol ce dernier joue un rôle d'indicateur de pH (Jarvis et al, 1977). Après autoclavage du milieu YMA-rouge de phénol et quand ce dernier est arrivé à atteindre 45°C, à l'aide d'un filtre de 0.22 µm la solution d'Urée a été rajoutée

au milieu, il a été coulé dans des boîtes à pétri qui par la suite ont été ensemencées et incubées pendant 3 jours à 28°C. La réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose violet (rose fuchsia).

#### **5.6.3.3. Activité cellulolytique**

L'enzyme carboxy-méthyl-cellulase appelée aussi  $\beta$ -1,4-D-glucanase ou CMCase est une enzyme qui joue un rôle dans la nodulation et la phase initiale du processus d'infection.

Le milieu CMC est préparé à partir de 0.25 % CMC (annexe 01) dans un milieu YMA. Sous la hotte Sorbonne microbiologique les boîtes à pétris sont coulées et ensemencées par les isolats et incubées pendant 5 jours à 28°C. Après l'incubation les boîtes sont rincées sous l'eau de robinet puis la prochaine étape consiste à ajouter la solution du rouge Congo (1 mg /ml) ensuite les boîtes sont placées dans l'étuve pour incubation pendant 30 min à 28°C. Après avoir retiré les boîtes de l'étuve, la solution RC est remplacée par une solution d'NaCl 1M (Annexe 01) et incubées à nouveau pendant 30 min à une température ambiante puis vidées.

La lecture montre un halo jaune-orange autour des colonies qui montre une activité d'une endoglucanase indique la présence d'une cellulase.

#### **5.6.3.4. Recherche de nitrate Réductase**

Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate (Annexe 01) est utilisé pour l'identification des bactéries basée sur la formation du mannitol. La mobilité de la souche et sur la recherche nitrate réductase.

Les isolats sont ensemencés par piqûre centrale et incubés pendant 72H à 28°C. La lecture se fait par l'ajout de gouttes du réactif nitrate 1 et 2. L'apparition d'un anneau brun rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites.

## *Chapitre 03*

### *Résultats et Discussions*

## 1. Échantillonnage de nodules et de sol

Avant de commencer à analyser les résultats obtenus, il faut noter que dans ce travail nous avons étudié des bactéries nodulant la légumineuse *vicia faba*, à partir des nodules de deux types différents provoqués par les Rhizobiums et dans notre cas les nodules prélevés ont été de types indéterminés, Bilobés surtout de la région de M'Toussa et polylobés sous forme en amas chez les fèves de la région de Ain Djerboua (voir Fig .16).

## 2. Analyse pédologique de l'échantillon de sol

La culture de *vicia faba* est peu exigeante en matière de qualité de sol, cependant, elle aime les sols frais, profonds, et neutres. Elle est sensible au compactage et à l'excès d'eau (Alaoui, 2005). Afin d'effectuer une série de tests pour déterminer sa texture et son niveau de fécondité (Gobat et al, 1995). Des échantillons de sol ont été prélevés à chaque site d'échantillonnage nodulaire. Les résultats obtenus aux paramètres d'analyse du sol sont résumés dans ce tableau :

**Tableau.6.** Les résultats d'analyses physico-chimiques de 3 zones d'études.

	Analyse physique		Analyse chimique	
	Texture	Humidité	pH eau	pH Kcl
<b>M'Toussa</b>	<b>Argile</b>	<b>22,69%</b>	<b>7.65</b>	<b>7.26</b>
<b>Ain Dj 1</b>	<b>Limon argileux</b>	<b>10,13%</b>	<b>7.45</b>	<b>7.39</b>
<b>Ain Dj 2</b>	<b>Limon argileux fin</b>	<b>11,11%</b>	<b>7.50</b>	<b>7.35</b>

### 2.1. Analyse physique

#### 2.1.1. Granulométrie

Permettre de déterminer la proportion de particules solides du sol. La distinction entre (argile, limon et le sable) se fait uniquement sur base de la taille des particules (Jamagne et al, 1998).

Le résultat des analyses granulométriques révèle un pourcentage d'argile et de limon supérieurs à 50%. D'après le triangle de texture (FAQ) qui permet de déterminer la classe texturale des sols, les zones d'études présentent : sol essentiellement argileux pour M'Toussa, sol limon argileux pour Ain Djerboua 1 et limon argileux fin pour Ain Djerboua 2. D'après la dénomination wolof (2014), cette composition en Argile et Limon (A + L) présente le variant texturale locale : Deck : A + L > 30%.



**Figure.22 :** Test de sédimentation.

Les sols argileux sont saturés en eau, peuvent être collants et très imperméables. A cause de la forte présence d'argile, la teneur en substances nutritives est très élevée. Les argiles lourdes, quand elles sont sèches, nécessitent une reconsolidation importante au semis mais pas si elles sont humides et malléables. Les travailler lorsqu'elles sont humides présente un risque de compaction du sol (Vaderstad, 01/06/2022).

Les sols limon argileux sont différents des sols sableux par leur facilité à former une croûte, souvent très dure. S'ils sont trop travaillés, ils peuvent devenir compacts ce qui réduit leur capacité d'infiltration d'eau lors des périodes humides. Par temps sec, ils peuvent durcir et être difficiles à travailler. Cependant, ils sont généralement plus faciles à travailler et peuvent stocker des volumes d'eau considérables. Ils exigent une bonne consolidation, mais il faut éviter de les travailler par temps humide (Vaderstad, 01/06/2022).

La fève préfère un sol argilo-calcaire, frais, profond, humifère et bien drainé. Elle n'aime pas les terrains secs (Vialard, 29/05/2022).

### **2.1.2. Humidité : méthode gravimétrique**

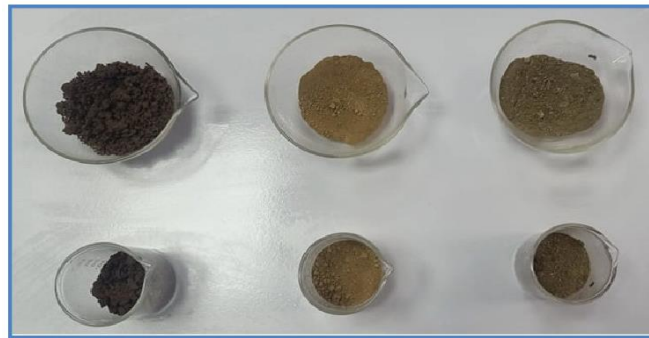
Le taux d'humidité d'un sol en particulier va déterminer les caractéristiques de diffusion ou de stockage de l'eau dans ce sol (Sdec, 02/06/ 2022). C'est le rapport de la quantité d'eau contenue dans le sol à la quantité de terre sèche ( $H_2O$  en g / Sol en g). La teneur en eau est exprimée en pourcentage (Organisation internationale de normalisation, 1982).

Valeurs indicatives en sols saturés : Sol minéraux :  $0,25 < H < 0,60$  kg. kg-1 :

$$H = \frac{\text{Masse initiale} - \text{Masse du sol sec}}{\text{Masse du sol sec}} \times 100 \dots (\%)$$

M'Toussa est humide mais Ain dj 1 et 2 sont un peu sec.

La végétation extrait l'eau du sol par les racines et l'émet dans l'atmosphère à travers ses stomates. La transpiration des plantes est donc déterminée par l'eau disponible pour la végétation sur l'ensemble de la zone racinaire. Par ailleurs, sur une grosse partie du globe, la disponibilité en eau est le facteur limitant pour la croissance des plantes et donc l'agriculture. Ainsi, la connaissance de l'humidité du sol est très précieuse pour détecter des périodes de stress hydrique (Escorihuela, 2007).



**Figure.23 :** Test d'humidité selon la méthode gravimétrique.

## 2.2. Analyse chimique

### 2.2.1. La mesure du pH

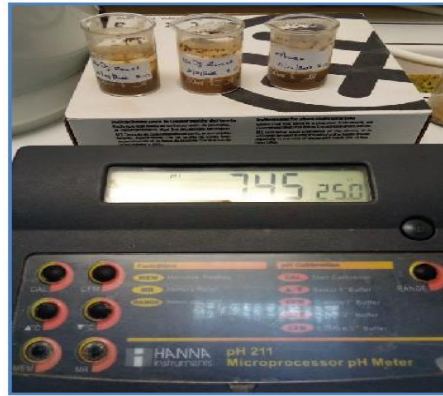
La mesure du pH (potentiel hydrique) d'un sol permet de définir son état d'acidité ou d'alcalinité (Aqua Portail, 2018)

Pour le sol et les plantes qui s'y développent, le pH a beaucoup d'importance, il influe notamment sur l'absorption des nutriments par les racines.

Dans cette étude le pH du sol a été mesuré de deux façons différentes : le pH à eau et le pH au KCL.

pH à eau : pour nos échantillons on note des valeurs entre 7.40 et 7.70. Les sols neutres (**Ain dj 1** et **Ain dj 2**) sont considérés comme étant de bonnes terres de jardin, la plupart des plantes s'acclimatent bien dans ces types de sol. Un Sol peu alcalin (**M'Toussa**) peut entraîner une solubilisation incomplète de certains éléments comme le fer et le Mg. Le pH au KCl indique une valeur inférieure à celle du pH à eau. En Effet, le KCl ajouté à la suspension de sol permet la libération des protons adsorbés sur les argiles ce qui conduit à la diminution des valeurs du pH (Zahran, 1999).

*Fabacée* préfère les sols profonds d'un pH compris entre 5,5 et 7, mais elle s'adapte assez bien à tous les terrains (Société Nationale d'Horticulture de France, 2018).



**Figure. 24 :** La mesure du pH des 3 échantillons.

### 3. Caractérisation phénotypique

La caractérisation phénotypique des différents isolats nodulant la fève, nous permettra de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les isolats.

#### 3.1. Étude morphologique des colonies

Les résultats de caractérisation morphologique et culturelle sur le milieu de culture sont équivalents à ceux trouvés par Vincent (1970), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1987). Par conséquent, nous avons sélectionné 3 isolats nodulants *Vicia faba L.* qui peuvent appartenir au genre *Rhizobium*. Ces isolats étaient désignés sous les noms de M'toussa, Ain Dj 1 et Ain Dj 2.

##### 3.1.1. Croissance sur milieu YMA + rouge Congo

La technique utilisée pour la stérilisation des nodules a été efficace, (absence de croissance de bactéries sur le milieu YMA+RC), ce qui a été le cas pour nos nodules (Fig.28a)

La culture par la méthode écrasement nodulaire sur le milieu YMA-RC a donné au bout de 48h à 72h, des colonies avec une couleur translucide elles n'absorbent pas le Rouge

Congo et restent blanches rarement rose, seule les colonies non absorbantes sont prise en considération lors de la manipulation ultérieure (Fig.28 b). Ce critère a été observé depuis longtemps chez la majorité des rhizobiums (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). Nos résultats correspondant bien avec ceux de (Sbihi, 2008).

### 3.1.2. Croissance sur milieu YMA

L'apparition des isolats purifiés sur le milieu YMA par une croissance rapide de 24 à 48 h forment des colonies homogènes à la longueur des stries. Elles ont blanchâtre à crème circulaires, lisses, bombés et visqueuses (muqueuse), mais la souche du M'toussa est rigide et avec le temps d'incubation sa mucosité augmente (Fig.29).

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Ouslim, 2016), Cette morphologie correspond à l'une des caractéristiques habituelles des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* à croissance rapide.

### 3.2. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais, montre des bâtonnets aux extrémités arrondies et mobiles. Après la coloration de Gram une forme coccobacille a Gram négatif de couleur rose a été observée (Fig.30), ces caractères morphologiques de nos résultats sont en accord avec ceux décrits pour des rhizobiums par (Jordan, 1984 ; Beck et al, 1993 ; Mellal, 2019).

### 3.3. Caractérisation nutritionnelle

#### 3.3.1. Assimilation de la Source de carbone

Le métabolisme glucidique est réalisé pour déterminer la source de carbone qui assure une bonne croissance aux diverses isolats étudiés. Stowers en 1985, rapporte que tous les *Rhizobium* à croissance rapide utilisent une grande variété de glucides comme source de carbone, dans la présente étude, la croissance des isolats a été testée sur un total de 3 substrats apportant les atomes de C pour le métabolisme cellulaire.

Les résultats indiqués dans (le tableau.7 et la Fig.31) a montrent que tous nos isolats utilisent les 3 sucres (D-Glucose- Fructose- D-Saccharose) testés en tant que source de carbone mais avec une fréquence variable de dégradation.

**Tableau.7 :** Croissance des isolats en présence de différents sucres.

Source de carbone			
Sucre	M'Toussa	Ain Dj 1	Ain Dj 2
D-Glucose	+++	+-	+++
Fructose	+++	+-	+-
D-Saccharose	+++	+-	+++

+++	+-	+-	---
Très bonne croissance	Bonne croissance	Faible croissance	Absence de croissance

Pour les isolats étudiés, une croissance parfaite en présence de mannitol (Témoin) a été observée suivie par le D-saccharose, D-Glucose et Fructose (Fig.31a) qui indique que le mannitol est le substrat le plus dégradé par nos isolats. Ce qui est confirmé par (Vincent, 1970), (Jordan, 1984) et (Somasegaran et Hoben, 1994), (Ouslim, 2016).

### 3.3.2. Assimilation de la Source de l'azote

La (fig.31b) et le (tableau.8) montrent les résultats de l'assimilation de divers acides aminés en tant que source unique d'azote. La croissance des isolats a été testée en présence de 3 acides aminés : Histidine, L-Asparagine, Leucine et tous ont été en mesure d'assimiler ces derniers.

Pour les acides aminés : L-Asparagine, Leucine et Histidine, une forte assimilation a été observée chez les deux isolats de M'Toussa et Ain Dj 2, par contre l'isolat de d'Ain Dj 1 n'a pas assimilé l'acide aminé d'Histidine. Pour cela nous avons constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir de source d'azote pour les rhizobiums. Ce qui est confirmé par (Jordan, 1984) et (Somasegaran et Hoben, 1994), (Khalfi et Smara, 2017), Alors qu'il existe certains acides aminés qui pouvant être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984).

**Tableau.8 :** Résultats de test Assimilation de source d'azote d'isolats.

Source d'azote			
Acide Aminé	M'Toussa	Ain Dj 1	Ain Dj 2
L-Asparagine	+++	++-	+++
Leucine	+++	++-	+++
Histidine	++-	---	+++

## 3.4. Caractérisation physiologique

### 3.4.1. Tolérance à la salinité

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des bactéries isolées de *V.faba* en évaluant leur croissance en présence de concentrations croissantes de NaCl (Fig.32), montre que tous les isolats présentent le même comportement vis-à-vis du NaCl. En effet les isolats étudiés sont capables de se croître dans un intervalle allant de 0.01% à 0.50% avec un optimum à 0.1% pour tous les isolats.

Ces résultats confirment ceux trouvés par (Jordan. 1982, Vinuesa et al, 2005; Bourebaba et al, 2016). En effet, la croissance de la plupart des rhizobia est affectée dans un milieu de culture contenant 1% ou plus de NaCl. Miller et Wood (1996) ont

rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Certains auteurs ont rapporté que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran, 1999, Swaraj et Bishnoi, 1999).

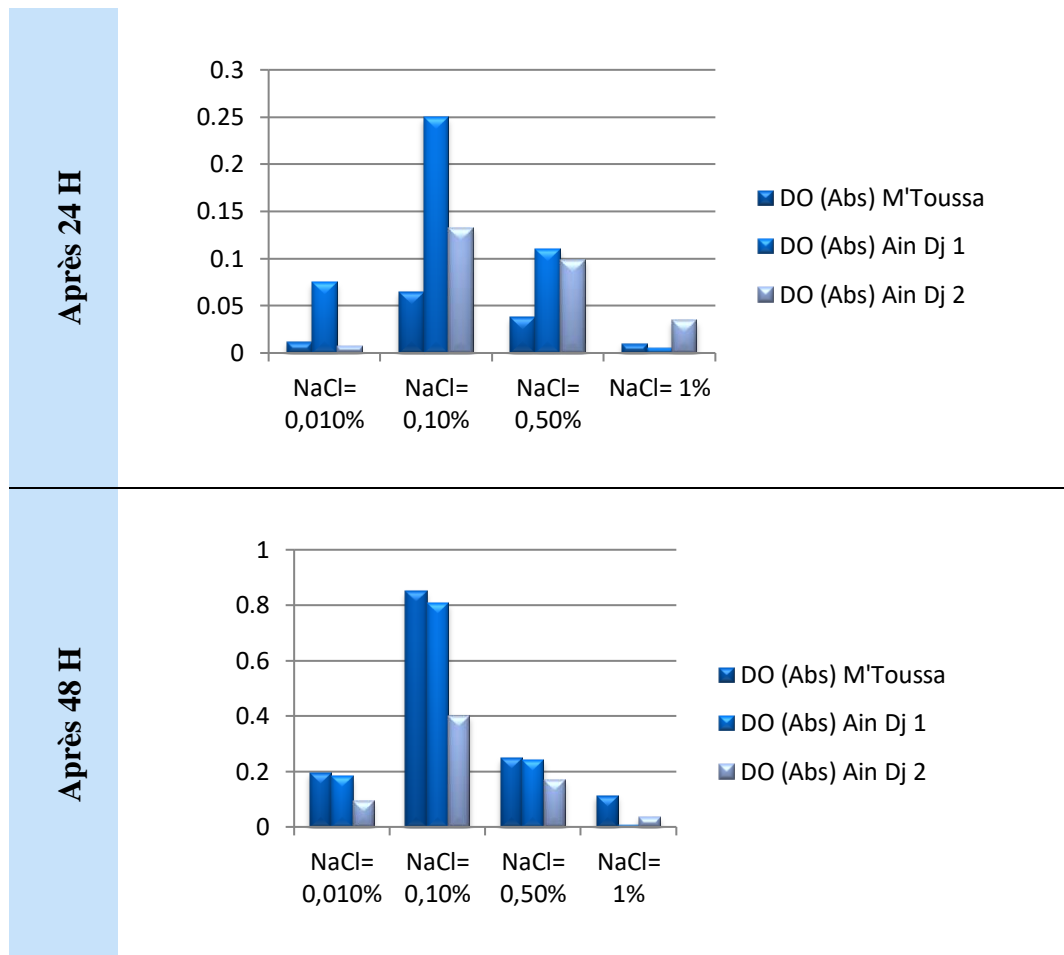


Figure. 25 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats après 24 et 48H

### 3.4.2. Tolérance au pH

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des isolats de la collection sont présentés dans la (Fig.32) et détaillés en (Annexe 03). D'après nos résultats tous les isolats étudiés présentent une large gamme de tolérance allant du pH 5 jusqu'à pH 9 avec un optimum à pH 6.8, ces résultats montrent que les isolats sont plus sensibles à l'alcalinité qu'à l'acidité. D'autre part, Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par (Sanchez-Canizares et al, 2011). Aussi Maatallah et al, (2002) qui ont détecté la croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0

et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza et *al*, (2001) et Jordan (1984) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

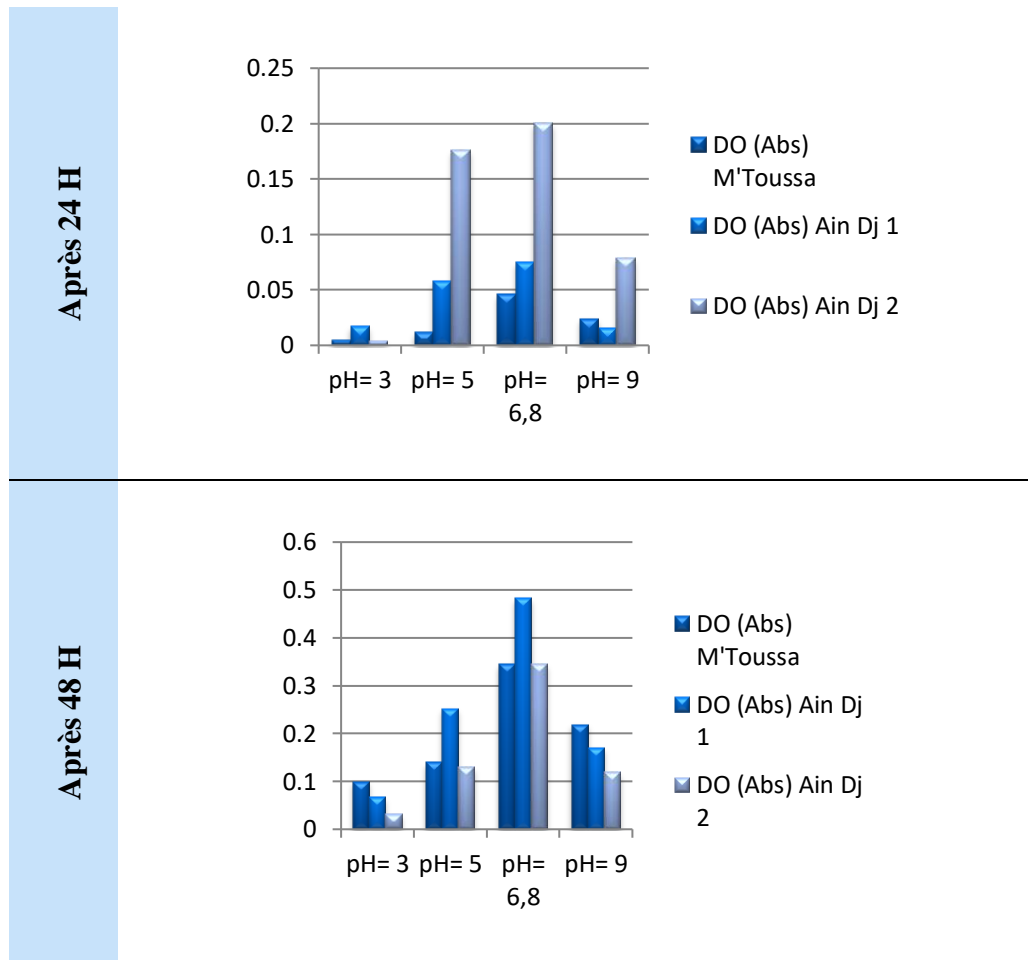
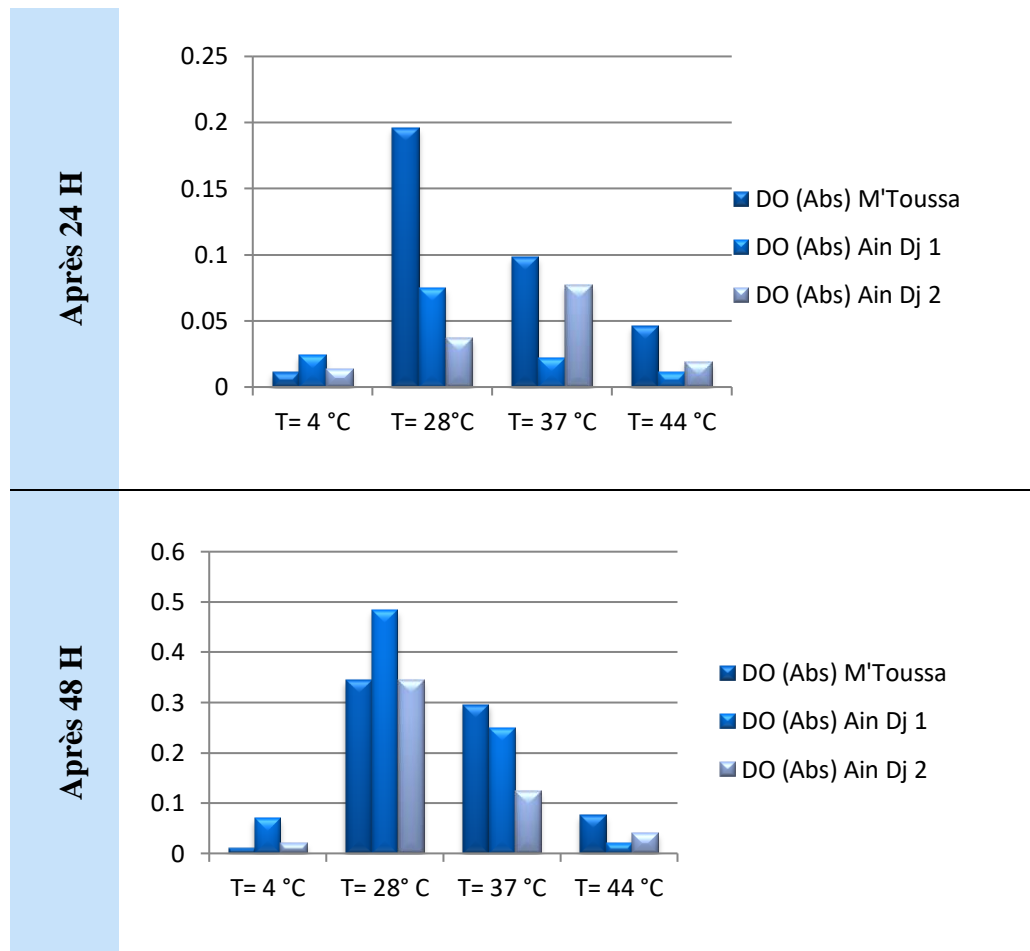


Figure. 26 : Effet du pH sur la croissance des isolats après 24 et 48H

### 3.4.3. Effet de la température

D'après les résultats obtenus après 24h et 48h de culture, et montrés dans la (Fig.32) et (Annexe 03), les isolats étudiés sont capables de se développer dans un intervalle allant de 28°C à 37°C avec un optimum à 28°C pour tous les isolats, alors que une croissance très faible a été observée dans les températures extrêmes 4°C et 44°C. Ceci a été souligné par Jordan (1984), qui a constaté que la croissance des rhizobiums est très rare à ces températures Pour la plupart des Rhizobiums, la température optimale de croissance est comprise entre 28°C et 30°C et de nombreuses rhizobiums sont incapables de croître à 39°C (Zahran, 2001; Thami et *al*, 2010). Notre résultat est en concordance avec celui de Wei et *al* (2008) qu'ont rapporté que leurs bactéries nodulant les légumineuses ne peuvent guère supporter la température 4°C.



**Figure. 27 :** Effet du T° sur la croissance des isolats après 24 et 48H

### 3.5. Caractérisation biochimiques

#### 3.5.1. Vitesse de Croissance sur BTB

En général on considère que les isolats à croissance rapide sont des bactéries acidifiantes. Par conséquent, on s'attend à ce qu'ils changent la coloration du BTB en jaune, contrairement aux souches à croissance lente dont on considère qu'elles alcalinisent le milieu de culture (ceci est traduit par le virage de la coloration du milieu au bleu foncé) (Jordan, 1984). Un virage de couleur du milieu vers le jaune, indiquant une production d'acide révélée par l'indicateur de pH chez les isolats.

Tous les isolats testés produisent des réactions acides (Fig.36) (ceci est traduit par le virage de couleur vers le jaune, orange) sur le milieu YMA + BTB. Cela indique que les isolats se développent rapidement et peuvent donc appartenir au genre *Rhizobium*.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Jordan, 1984), (vincent, 1970) et (Ouslim, 2016).

### 3.5.2. Recherche des enzymes respiratoires

#### 3.5.2.1. Test catalase

Ce test a permis de mettre en évidence la présence de la catalase, qui est une enzyme catalysant la libération d'O<sub>2</sub> du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selon l'équation:



Cette enzyme se trouve chez tous les organismes aérobies. Ce test est important pour la première orientation dans l'identification d'un isolat bactérien pure (Moges, 2022).

Les 3 isolats (M'Toussa, Ain Dj 1 et Ain Dj 2) sont des catalases positives (Fig.32), (produisent une effervescence) alors il y a un dégagement d'oxygène issu de la dégradation de l'eau oxygénée. Selon Vincent (1981), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principales des isolats de *Rhizobium*. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par (Kravchenko et al, 2004; Abdelhafid, 2011; Bumunang, Babalola, 2014; Boughaba, 2019; Zied, 2020).

#### 3.5.2.2. Test oxydase

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder (en présence d'O<sub>2</sub>) un réactif incolore par une enzyme : la phénylène diamine oxydase pour former un composé coloré en violet, l'indophénol (Bibirou, 2016).

L'activité oxydase est positive pour la totalité des isolats (M'Toussa, Ain Dj 1 et Ain Dj 2) suite à l'observation d'une teinte violette immédiate (Fig.34), cela indique qu'ils possèdent cette enzyme dans la chaîne respiratoire cytochromique bactérienne (Camille, 2006).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les *Rhizobium* sont des bactéries aérobies (Abdlhafid, 2011, Zied 2020).

### 3.6. Recherche des enzymes spécifiques

#### 3.6.1. Résistances aux antibiotiques

Les résultats obtenus par le test antibiogramme montrent une sensibilité des isolats, c'est-à-dire que la croissance est inhibée en présence de ces deux antibiotiques (la tétracycline et la pénicilline) (Fig.35). Ce qui est confirmé que les isolats ne sont pas

pathogènes et appartiennent au *Rhizobium*. Ces résultats s'accordent bien avec ce qui était montré par (Charchar, 2015).

**Tableau.9 :** Les résultats d'un teste antibiogramme chez les Rhizobiums.

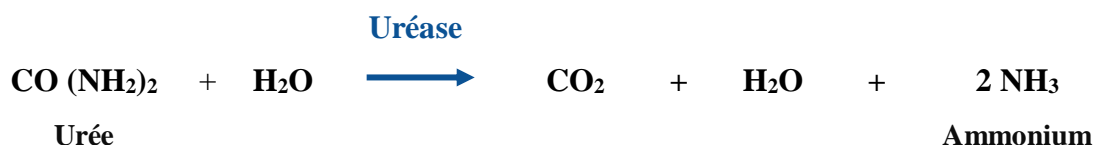
Antibiogramme	M'Toussa		Ain Dj 1		Ain Dj 2	
	Répétitions	Diamètre (cm)	Répétitions	Diamètre (cm)	Répétitions	Diamètre (cm)
Pénicilline	R1	39.95	R1	14.93	R1	09.95
	R2	40.35	R2	11.39	R2	10.80
Tétracycline	R1	31.66	R1	21.00	R1	17.13
	R2	31.65	R2	20.50	R2	15.12

### 3.6.2. Hydrolyse d'urée

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des Rhizobiums à hydrolyser l'urée en azote ammoniacal grâce à l'uréase, en utilisant le Rouge de Phénol comme indicateur de pH. La capacité de l'hydrolyse de l'urée par les Rhizobiums à été mis en évidence par les travaux de (Jarvis et *al*, 1977).

Le milieu contient de l'urée, et si la bactérie produit de l'uréase ceci va provoquer une alcalinisation du milieu (la transformation de l'urée entraine une augmentation temporaire du pH à plus de 8). L'alcalinisation va faire virer l'indicateur coloré vers le rose (Bibirou, 2016).

Les isolats: M'Toussa, Ain Dj 1 et Ain Dj 2 alcalinisent le milieu par un virage de sa couleur (Fig. 37) ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (uréase +). Comme s'est montré dans l'équation (Guiraud, 1998) :



D'un côté, cette propriété bactérienne joue également un rôle important dans assimilation des composés azotés issu de l'environnement et des engrais à base d'urée dans le monde agricole (Mobley, 1992) et d'un autre côté, cette enzyme constitue un système de défense et de survie contre le stress acide auquel les bactéries peuvent faire face dans les différents environnements (Cotter et Hill, 2003).

### 3.6.3. Activité cellulosique :

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose. L'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies indique la présence d'une endoglucanase (cellulase) (Lindeström et Lehtomaki, 1988).

Tous les isolats ont montré une réaction positive (Fig. 38). Ils sont donc capables d'hydrolyser le CMC. Cette enzyme est considérée comme une enzyme clé que les bactéries utilisent afin de décomposer la paroi cellulaire du poil racinaire des plantes permettant au *Rhizobium* de pénétrer et de déclencher la formation de fils d'infection (Martinus, 1984; Mateos et al, 1992).

Actuellement, la diversité connue des bactéries capables de former une symbiose racine-nodule fixatrice d'azote avec les légumineuses comprend 10 genres et > 50 espèces. Toutes les souches de type officielles de chacun de ces taxons ont été examinées pour l'activité cellulase, et toutes se sont révélées positives à des degrés divers (Robledo et al, 2008).

### 3.6.4. Réduction des nitrates, formation du mannitol et la mobilité :

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme du métabolisme énergétique : le nitrate réductase grâce à la présence de nitrate de potassium (KNO<sub>3</sub>) dans le milieu. (Guillaume, 2020).

Dans la respiration nitrate, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est utilisé comme accepteur final d'électrons provenant de l'oxydation d'un composé organique (ex : glucose). NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est réduit par la nitrate réductase (Hénault et Germon, 1995):



- Soit en nitrite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> :



- Soit en diazote N<sub>2</sub> :



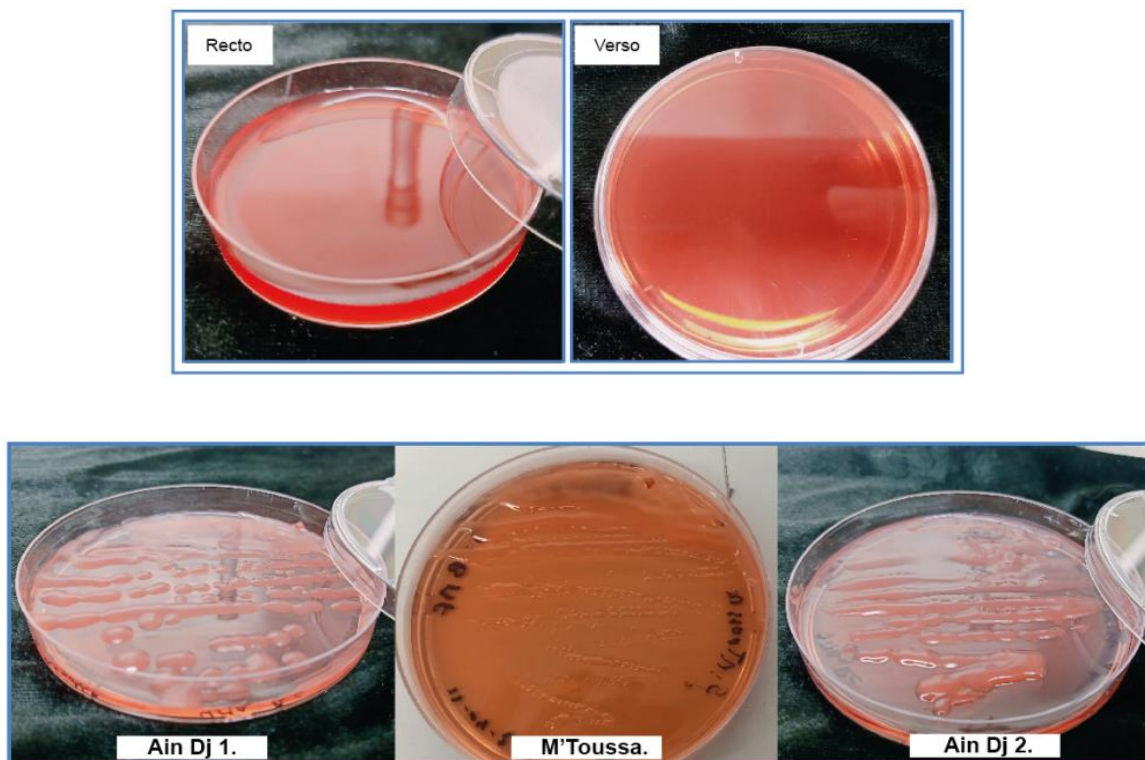
L'apparition d'un anneau brun rouge (Fig. 39a) dans le milieu signe la présence d'ions nitrites (M'Toussa et Ain Dj 1). Cela signifie que les isolats possèdent un nitrate réductase et que ces dernières sont capables de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites.

En revanche, l'absence de l'anneau rouge (Ain Dj 2) ne signifie pas que l'isolat étudié ne possède pas de nitrate réductase. En effet, la bactérie possède un nitrate réductase très active et capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote. Une bactérie possédant une telle enzyme consommera la totalité des nitrates du milieu (Etudier, 02/06/2022).

Toutes les espèces de *Rhizobium*, avaient une activité de nitrate réductase. Cependant, les conditions nécessaires à l'induction du nitrate réductase variaient selon les espèces de *Rhizobium* (R. Manhart et al, 1979).

L'apparition du virage de couleur du rouge au jaune indique que le mannitol a été dégradé dans les trois isolats (M'toussa, Ain Dj 1 et Ain Dj 2). (Fig.39a).

La mobilité se voit avec une toile (trouble) autour de la piqure centrale, ce test est confirmé par la caractérisation microscopique dans l'état frais. (Fig. 39b)



**Figure. 28:** a) Résultats de test de stérilisation, b) Croissance sur milieu YMA+RC.

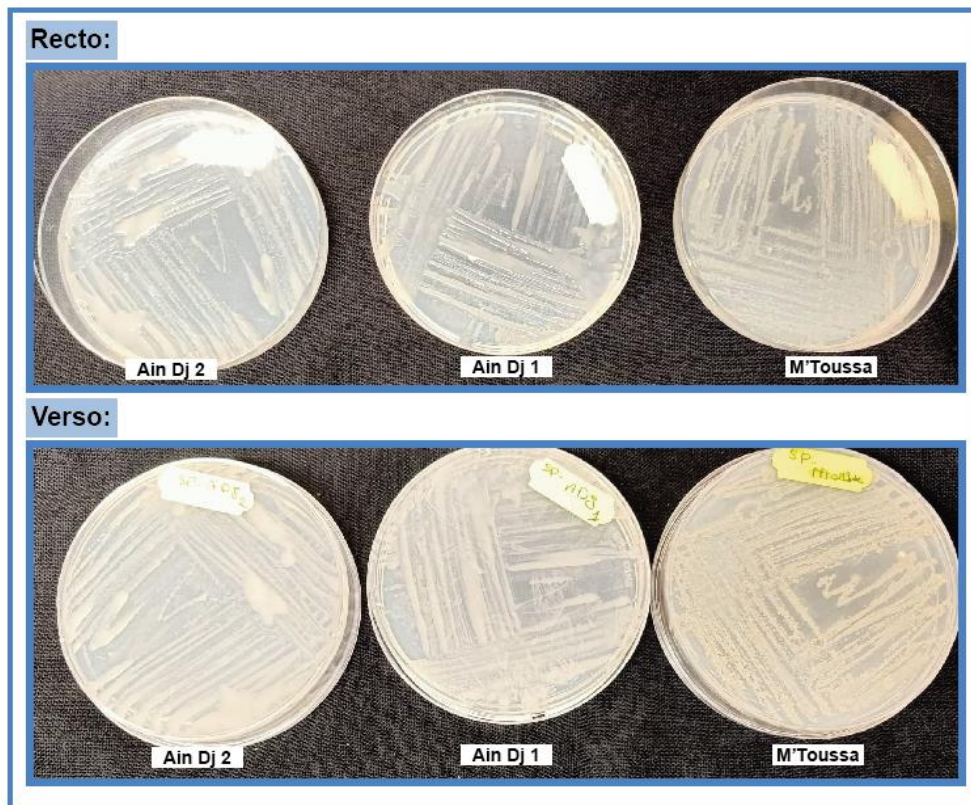


Figure.29 : Croissance sur milieu YMA.

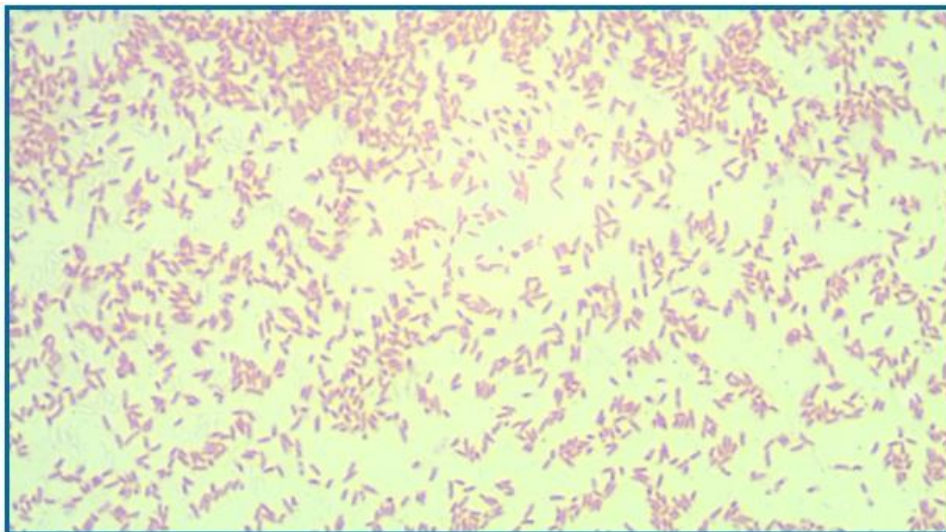


Figure. 30 : Observation microscopique de l'isolat (Ain Dj 2) (x 100) après coloration de Gram

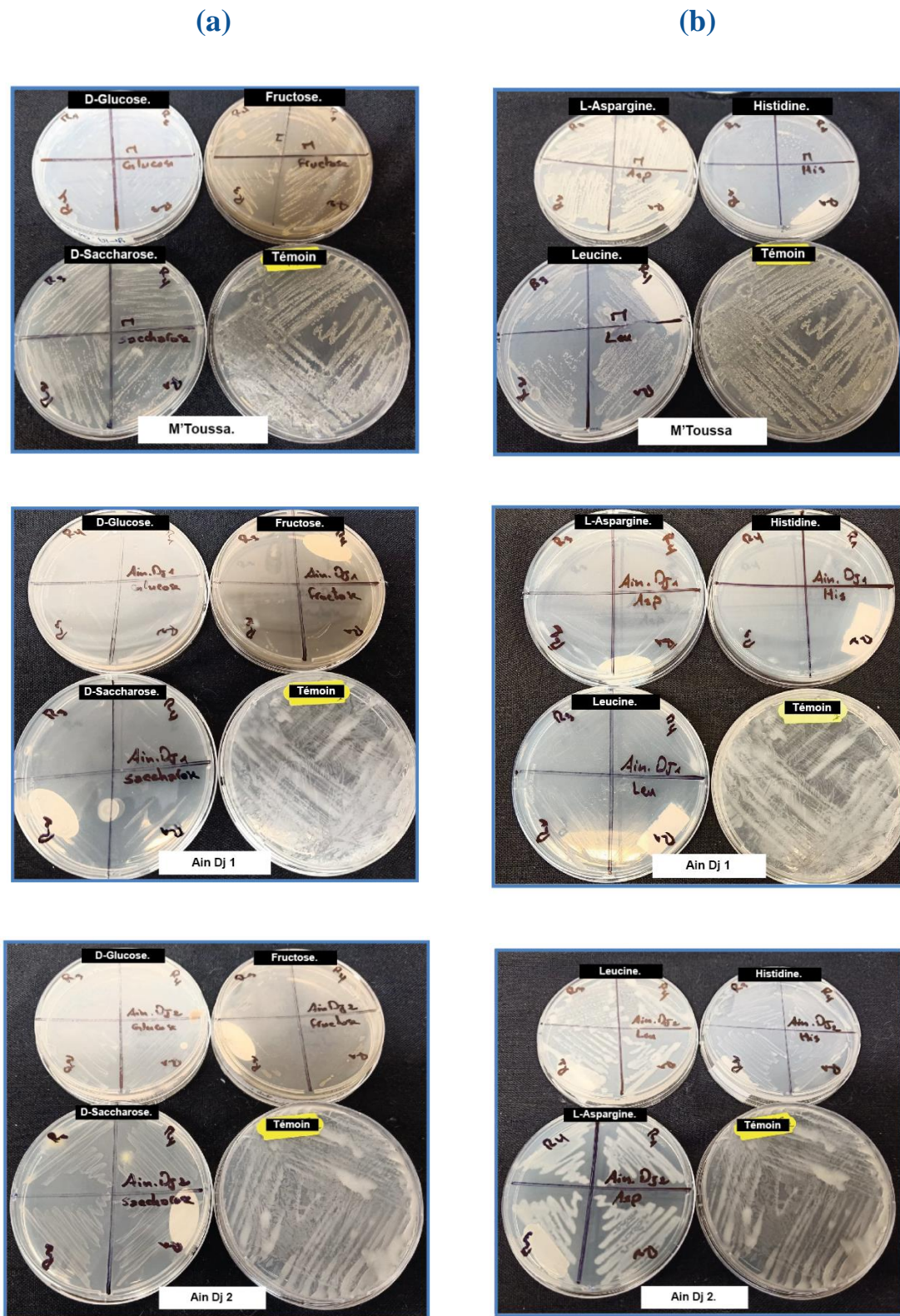
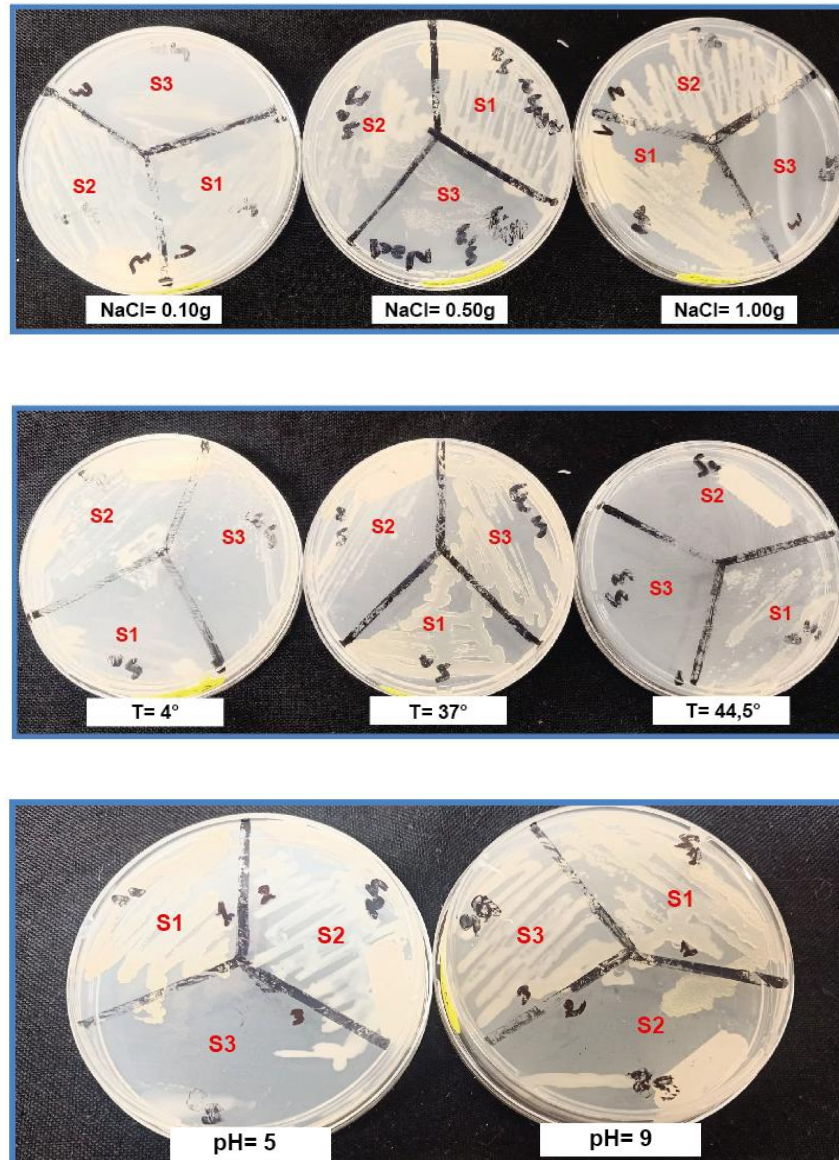
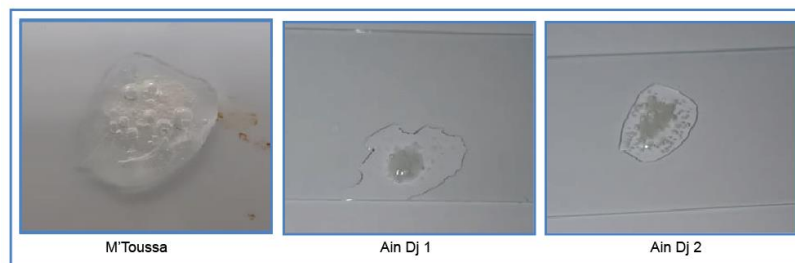


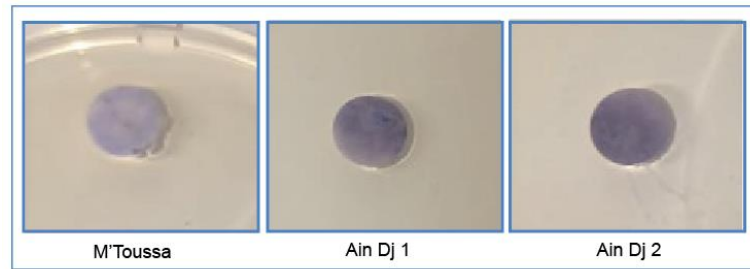
Figure. 31: Utilisation des différentes sources de carbone (a) d'azote (b) par les 3 isolats.



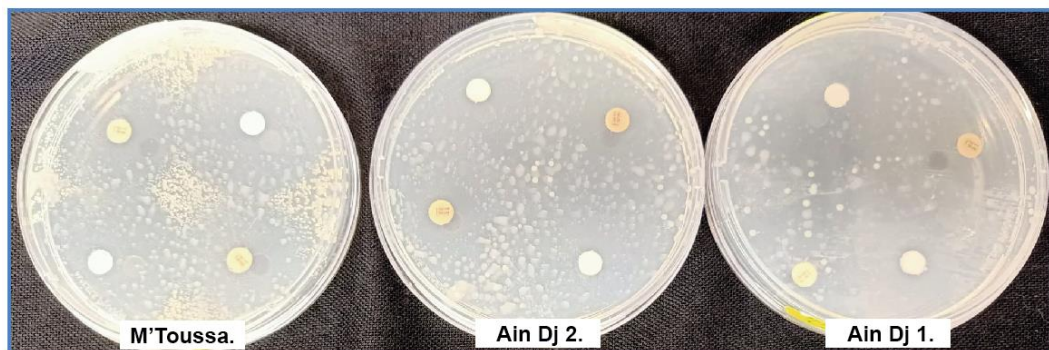
**Figure. 32 :** Résultats des tests physiologiques (NaCl, T° et pH).



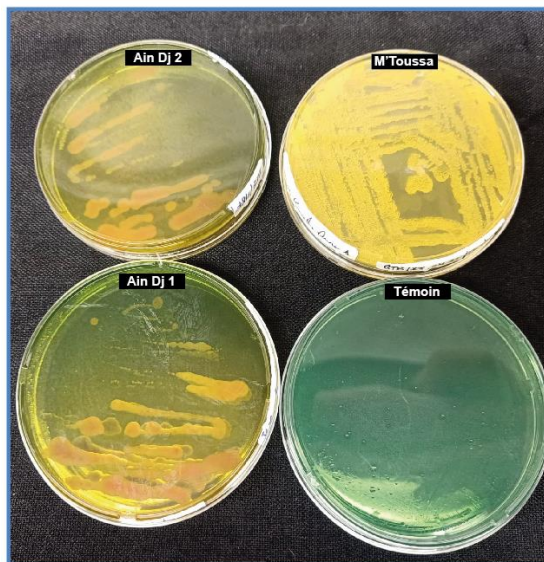
**Figure. 33 :** Les 3 isolats produisent des bulles d'air.



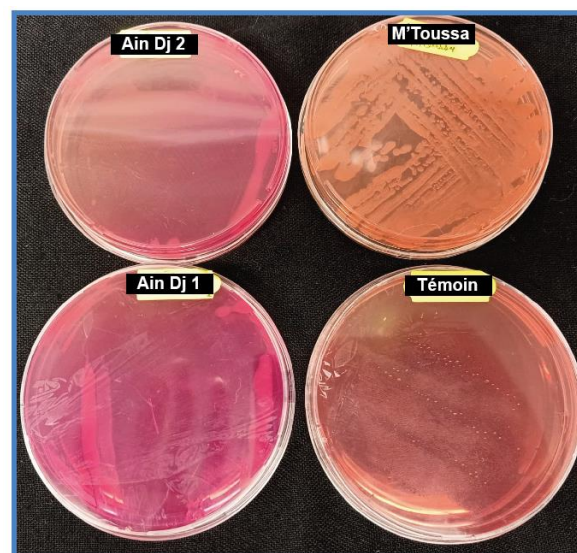
**Figure. 34:** Observation d'une teinte violette pour les 3 isolats.



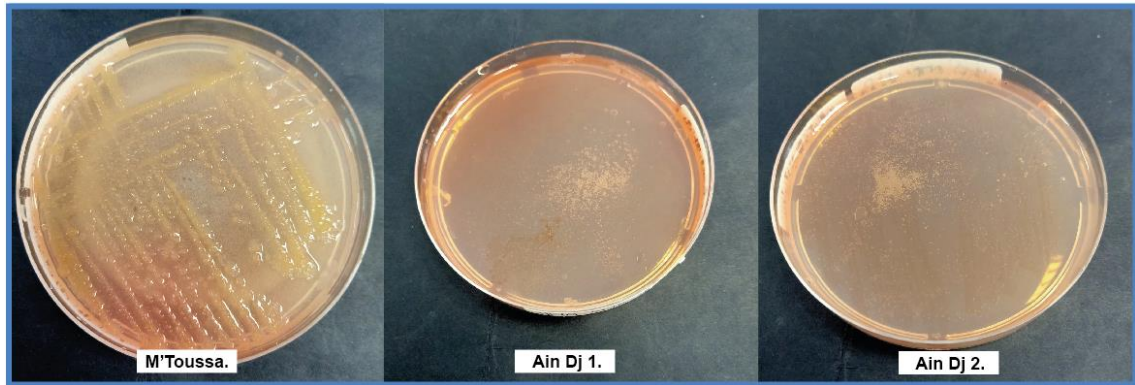
**Figure. 35:** Sensibilité des Rhizobiums aux antibiotiques.



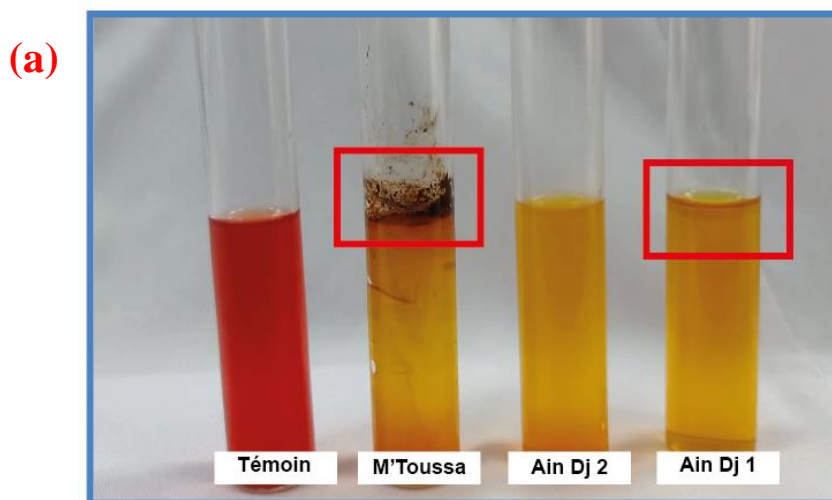
**Figure.36 :** Croissance sur YMA+ BTB.



**Figure.37:** Résultat de l'hydrolyse de l'urée



**Figure. 38:** Résultat de l'hydrolyse du CMC.



**Figure. 39 :** a) Résultat de la recherche du nitrate et Fermentation mannitol sur les 3 isolats.

b) Mobilité des Rhizobiums.

## *Conclusion et perspectives*

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des populations naturelles des bactéries symbiotiques du *vicia faba*. Provenant de la région Est d'Algérie.

En effet, ce travail a permis d'atteindre les objectifs que nous sommes fixés au début, à savoir la caractérisation phénotypique, des endosymbiotes isolés des nodules de la légumineuse *vicia faba*.

Dans ce travail, nous avons isolé et caractérisé les bactéries nodulants les racines de la légumineuse *vicia faba* (fève) cultivée dans 2 communes situées à Khenchela, à l'Est de l'Algérie. Cette méthode est pertinente pour l'identification des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*, tout en suivant la méthode classique appliquée par Vincent.

L'ensemble des résultats obtenus liés à la morphologie, l'aspect des colonies et à l'examen microscopique nous ont permis de sélectionner 3 isolats, de par les résultats obtenus, notamment les caractéristiques phénotypiques, le comportement des isolats était en fait similaire à *Rhizobium* (la morphologie des colonies sur YMA était similaire avec ou sans rouge Congo. le taux de croissance ainsi les tests enzymatiques respiratoires et spécifiques des bactéries associées aux racines de légumineuses).

L'évaluation de la tolérance de nos isolats aux facteurs de stress a montré que nos isolats étaient capables de se développer dans une large gamme de pH allant de 5,5 à 11. Et de supporter les concentrations 0.01% ,0.10%,0.50%, et 1% de l 'NaCl. Alors que pour la Température, les isolats ont montré une bonne croissance à 28°C.

A travers les résultats des tests biochimiques obtenus, ces isolats peuvent être classés comme bactéries à croissance rapide. Les 3 isolats ont présenté une activité cellulolytique, essentielle à l'infection des racines et à la formation de nodules. De plus, la plupart de ces isolats contenaient également du nitrate réductase et de l'uréase. Les tests nutritionnels montrent que l'isolat a tendance à utiliser une variété de sucres comme source de carbone. Cependant, le degré varie selon l'isolat.

A partir de ces données et résultats expérimentaux, ainsi sur des critères morphologiques de culture, nutritionnels et biochimiques, nous pouvons classer nos isolats dans la famille Rhizobiaceae ou B.N.L. (Bactéries nodulant légumineuses) seules les techniques moléculaires et phylogénétiques permettent de préciser le genre et l'espèce des bactéries.

Les points de vue envisagés pour compléter cette étude sont les suivants :

- Compléter les études taxonomiques des isolats en étudiant les caractéristiques génotypiques et en séquençant les gènes d'intérêt (ARNr 16S, gènes domestiques)
- Étudier la flore indigène du site de test

# *Références bibliographiques*

-A-

- **Aabnf.** (1990). Proceedings of International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF). (4. 1990/09/24-28. Ibadan, (NG))
- **Abdelguerfi A,** Ramdane SA. (2003). Evaluation Des Besoins En Matière De Renforcement Des Capacités Nécessaires A La Conservation Et L'utilisation Durable De La Biodiversité Importante Pour L'agriculture. Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATEGEF/PNUD : Projet ALG/97/G31. P11.
- **Abdlhafid L.** (2011). Effet de certains indicateurs de gènes nod (composé phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique .en vues de l'obtention du diplôme de doctorat –es- sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen. Page 43.
- **Alaoui Bennasseur.** (2005). Référentiel pour la Conduite Technique de la fève (*Vicia faba*).
- **Allen O.N.** and Allen, E.K. (1981). The Leguminosae: a Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation. University of Wisconsin Press/MacMillan Publishers Ltd. Madison/London, USA/UK.
- **Andrews, M,** & Andrews M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. International Journal of Molec Sci. 18(4): 705.
- **Amarger, N.** (2001). *Rhizobia* in the Field. Adv in Agro. 73, 109-168.
- **Amarger, N.** (2001). *Rhizobia* in the Field. Adv in Agro. 73, 109-168.
- **Asami, S.** Kiwamu, M. (2006). Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and Reverse Transcription-PCR Targeting the nif H Transcript and Ribosomal RNA. Microb. Environ. 21, 23–35.
- **Aqua Portail.** (2007). (mise à jour le 13/11/2021) [[https://www.aquaportail.com/definition-2236-fixation-de-l-azote.html#la\\_biologique](https://www.aquaportail.com/definition-2236-fixation-de-l-azote.html#la_biologique)]

-B-

- **Bado, B. V,** Sedogo M. P, Cescas, M. P, Lompo, F, and Bationo, A. (1997). Effet à long terme des fumures sur le sol et les rendements du maïs au Burkina Faso. Cah Agri. 6 (6): 571 – 575.
- **Bary.** (1879). De la symbiose, Revue internationale des sciences. 301-309.
- **Baudoin J-P.** (2001). Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 221-230.
- **Beck, D.P,** Materon, L.A, and Afandi, F. (1993). Practical Rhizobium–legumetechnology manual. ICARDA(Ed). Syria. 389pp.
- **Becking, J.** (2006). the family *Azotobacteraceae*. Prokar. 6, 759–783.
- **Benguedouar, A.** (2000). Étude de la symbiose (*Rhizobium*) *Hedysarum coronarium*. Essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium* « *hedysari* ». Thèse de doctorat de l'université de constantine. Algérie.
- **Berrada. H** et Fikri-Benbrahim K. (2014). Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. BMR Jour. 4(6): 616-639.
- **Bertrand R,** Lenoir J, Piedallu C, Riofrío-Dillon G, de Ruffray P, Vidal C, Pierrat J-C, Gégout J-C. (2011). Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland forests. Nature 479, 517–520.

- **Besançon S.** (2017). Les légumineuses, France.
- **Beunard p.** (1994). Appréciation de l'influence du taux de chlorure de sodium sur la croissance en milieu liquide et l'infectivité de diverses souches de rhizobiums. AABNF, Harare Septembre 1994.
- **Beunord,** (1994). La Fixation Symbiotique D'azote Atmosphérique pp20.
- **Bibirou.** (2016). Tests utilisés en bactériologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.
- **Bladergroen, M.R., Spaink, H.S.** (1998). Current Opinion in Plant Biology, 1, 353–359.
- **Bouraba, A.** (2019). Isolement et caractérisation des Rhizobia nodulant la fève (*Vicia faba*) dans trois régions de Constantine et étude de leurs mécanismes d'action en tant que PGPR. P90.
- **Bourebaba, Y, Durán, D, Boulila, F, Ahnia, H, Boulila, A, Temprano, F, Palacios, J.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T, Rey, L.** (2016). Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the western Mediterranean: Algeria and Spain. Syst. Appl. Microbiol. 39, 266–274.
- **Boyeldieu J.** (1991). Produire des grains oléagineux et protéagineux. Ed. Lavoisier IC et DOC. Paris, 228 p.
- **Broughton, W.J.** (1984). Nitrogen fixation: Legumes. The Journal of Chart & Win 2Td londress. 117.
- **Bumunang, E.W et Babalola, O.O.** (2014). Characterization of Rhizobacteria from field grown genetically modified GM and non-GM maizes. Braz. Arch. Biol. Technol. 57 : 1 - 8.

-C-

- **Camille D.** (2006). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 2<sup>ème</sup> édition, TEC et DOC, p.15
- **Chaux, C, and Foury, C.L.** (1994). Production légumière : légumineuses potagères, légumesfruits. Ed. TEC et DOC. Lavoisier, 563 pp.
- **Chelius, M.K, Triplett, E.W.** (2000). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Appl. Environ. Microbiol. 66, 783–787.
- **Chen, W.M, James, E.K, Coenye, T, Chou, J.H., Barrios, E, de Faria, S.M., Elliott, G.N., Sheu, S.Y., Sprent, J.I., et Vandamme, P.** (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov. Isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1847-1851
- **Clément Delamotte.** (2012). Les bactéries fixatrices d'azote libres du sol pp30
- **Cotter P. D. et Hill C.** (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews, sept 2003. P 429 – 453.

-D-

- **Daines, M.E.A.** (2018). Effet de l'uranium sur le comportement physiologique et chimique de la féverole (*Vicia faba L. minor*). Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P 40-46.
- **Delarras C.** (2007). Milieux de culture et tests pour l'identification bactérienne. In Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. TEC et DOC, EM inter. Pp 126-172. ISBN : 978-2-7430-0945-8
- **Dénarié, J.** Debelle, F. Promé, J. C. (1996) Rhizobium lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis.

Annu. Rev. Bioch.65, 503 – 535

- **Dobbelaere S**, Croonenborghs A, Amber T, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Shimon B, Burdman S, Kadouri D, Sarig S and Okon Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum. Austral J Plant Physiol 28:1–9.
- **Downie J.A.** (1998). Function of rhizobia nodulation genes. In: Spaink H.P. Kondorosi A. Hooykas P.J.J (Eds): the Rhizobiaceae. pp 387-402.
- **Downie J.A.** (2005). Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. Current Biology. 15: 196-198.

**-E-**

- **Escorihuela, M.J.** Y. Kerr, P. de Rosnay, J.P. Wigneron, J.C. Calvet, and F. Lemaître. (2006). A simple model of the bare soil microwave emission at l-band. IEEE Trans. Geosc. Remote Sens. 45(7) ,1978–1987.
- **Etudier.** (2022). La nitrate réductase, 257 mots 2 pages. [Etudier.com].

**-F-**

- **Fachman** and Kraut. (1995). « Composition des aliments d’après le répertoire général des aliments». Regal. Ed. Log Access. APRIFEL. 243
- **FAOstat.** (2011). base de données de l’organisation mondiale de l’agriculture et de l’alimentation [www.faostat.org/chickpea/stat.cal].
- **Foth,H.D.**(1990).Fundamentalssofsoilscience.Henry,D.Foth(ed),JohnWiley&sons, NewYork,336pp.
- **Franché, C.** Lindström, K, Elmerich, C. (2009). Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant. Soil. 321, 35–59.

**-G-**

- **Gage D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic: nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbio and Mol Bio Rev. 68: 280-300.
- **Gallais et bannerot.** (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection. Paris. Inra.
- **Gobat JM,** Aragno M, Matthey W. (1998). Le sol vivant. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Lausanne.
- **Grama, B.S.** (2008). Utilisation des techniques d’électrophorèse pour l’identification et l’étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Mémoire de Magister en Génétique et Amélioration des plantes.Université Mentouri. Constantine. Algérie. P 93.
- **Graham, P,** Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field. Crops.Res. 65, 93–106.
- **Graham P.H,** et Vance C.P. (2003). Legumes: importance et contraintes pour une utilisation accrue. Plant Physiol. 131 : 872-877.
- **Guinochet.M,** and De Vilmorin. R. (1984). Flore de France, Ed du CNRS. Paris. 1879pp
- **Guiraud J.P.** (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

**-H-**

- **Heller R,** Esnault R, Lance C. (2000). Physiologie végétale : Développement. Ed. Dunod. Paris. P580.
- **Hénault C,** Germon JC, Reau R. (1995). N<sub>2</sub>O emission from soils under fallow or cropped to rapeseed for producing biofuel. In : Proc. 8th Nitrogen Workshop (O

van Cleemput, ed), Kluwer, Amsterdam (sous presse).

### -I-

- **ISO** (Organisation internationale de normalisation). (1982). Produits dérivés des fruits et légumes. Détermination de la teneur en matière sèche par dessiccation sous pression réduite et détermination de la teneur en eau par distillation azéotrope.
- **IT IS**. (2011). [[http://eol.org/pages/703436/hierarchy\\_entries/52871969/overview](http://eol.org/pages/703436/hierarchy_entries/52871969/overview)].
- **IT IS**. (2011). [[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=26206](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26206)]

### -J-

- **Jarvis B. D. W**, Mc lean T. S, Robertson I. G. C, et Fanning G. R. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and Rhizobium strains from agricultural plants. New Zealand J. Agric. Res. 20. 42-52.
- **Jamagne M**, Bétrémieux R, Bégon J.C, Mori A. (1992). Quelques données sur la variabilité dans le milieu naturel de la réserve en eau des sols. Bull Tech d'Info. 324-325, 627-641.
- **James R**. Manhart et Peter P. Wong. (1979). Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. Canadian Jour of Microbio. vol 25v N°10.
- **Jean-Marc Sanchez**. (2017). Légumineuse + Bactérie Rhizobium = Symbiose. Agri de cons.
- **Jordan**, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov. a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32 (1), 136-139.
- **Jordan D.C.**(1984). Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): Bergey's man of sys bacterio. Williams et Wilkins. Baltimore. USA. pp 234- 244.

### -K-

- **Khalfi, C**, Smara, R. (2017). Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Lupinus angustifolius*. 57pp
- **Kravchenko, L.V**, Kamilova, F, Shaposhnikov, A.I, Azarova, T, Makarova, N, Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars and L-tryptophane exudate of soil bacteria growing on stone wool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. Mol. Plant Microbe Inter, 9: 250 - 256
- **Krishnan, H.B**, Bennett, J.O. (2007). *Rhizobium*-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) Plant-Asso Bact. Springer, Dordrecht.
- **Köppen**. Classification: Csa [<https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Khenchela--Ain-Touila--M%27Toussa>].
- **Köppen**. Classification: BSk [<https://mapcarta.com/fr/N5169299494>].

### -L-

- **Lefèvre T**, Renaud F, Selosse M-A, Thomas F, Bernstein C, Broennimann O, Charlat S, De Mazancourt C, De Meeüs T, Fleury F, et al. (2010). Evolution des interactions entre espèces. In : F. Thomas TL & MR, ed. Biol évo. De Boeck, 533–616.
- **Li chang, A**, Zurkowski, J, Shine, G, Rolfe, K. (2011). Sym plasmid transfer to

- various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J. Bacteriol.*
- **Li JH**, Wang ET, Chen WF, Chen WX. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Bio and Bioche* 40: 238–246.
  - **Liu, W.** et al. (2015). A Novel Sucrose-Regulatory MADS-Box Transcription Factor GmNMHC5 Promotes Root Development and Nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), (Ld), pp. 20657–20673. doi: 10.3390/ijms160920657.
  - **Lindström, K.** et Lehtomäki, S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: p: 277-287.
  - **Luayana**, 2022, Prats of plants. Morphology of bean plant with root system, flowers, pods and titles. Dreamstime.

**-M-**

- **Machieix J.J**, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Ed. PPUP presse. 192p.
- **Martinus Nijhoff**. (1984). Collection, isolation and maintenance of food legume rhizobia.
- **Manhart James R.** et Peter P. Wong. (1979). Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation, *Canadian Jour of Microbio.* vol 25v N°10.
- **Marschner H.** (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. second edition. 889pp.
- **Mateos P.F**, Jiménez-Zurdo J.L, Chen J.A.S, Squartini S.K, Haack E.M, Molina D.H., Hubbell F, et Dazzo B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. *Appl Env Microbiol.* 58 (6) : 1816- 1822.
- **Meyer B**, et al. (2011). The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of 1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acids Res* 39(4):1526-37
- **Mezani, S.** (2011). Bioécologies de la fève *Bruchus rufimanus* boh. (coleoptera:bruchidae) dans les parcelles de variétés de fève différentes et de féverole.
- **Mikic, A.** (2011). Words denoting faba bean (*Vicia faba*) in European languages. *Ratar.povrt./fieldveg. cropRes.* 48. P 233 - 238.
- **Miller, K. J.**, J.M Wood. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Review. Microbial.* 50, 101-136.
- **Mobley L.T.H.** (1992). Urease *Microbiol. J Lederberg* (ed). *Encyclopedia of microbiol.* 4: p: 327-346
- **Mouafek, A.** (2010). La symbiose à Rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. Mémoire de magister. P 08.

**-N-**

- **Nuessly, G.S**, Hentz, M.G, Beiriger, R, Scully, BT. (2004). Insects associated with faba bean, *Vicia faba* (fabales: Fabaceae) in southern Florida. *Florida entomol.* 87(2). P 204 - 211.
- **Nwaga D.** et Ngo Nkot L. (1998). Tolérance à l'acidité in vitro des rhizobia isolés du niébé (*Vigna unguiculata*) au Cameroun en comparaison avec *Bradyrhizobium japonicum*. *Cahiers agri.* 7: 407-410p.

**-O-**

- **Obaton M.** (1992). Facteurs pédoclimatiques limitant la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses. In K. Mulongoy, Gueye M. et D.S.K. Spencer (éds.) « Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture », John Wiley & sons. Chich. UK, 57-66p.
- **Ooreka**, jardinage, La fève est une excellente plante potagère facile à cultiver. Elle est riche en vitamines et en sels minéraux, mais aussi en protéines et en fibres. Ses graines se dégustent épluchées, crues à la croque-au-sel, au beurre ou cuites. [[dpo.ooreka@solocal.com](mailto:dpo.ooreka@solocal.com)].
- **Ouslim, S.** (2016). BNL associées aux légumineuses alimentaires (*Vicia faba L*) dans l'ouest Alg « caractérisation et importance ». 144 pp.

**-P-**

- **Panagiota M,** Kutharima P, Bisseling T. (1995). Symbiotic Nitrogen fixation. The Plant cell. 7: 869-885.
- **Pariniske M.** (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease?. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 320-328.
- **Perret, M.** Kondorosi, A. (2000). Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 32: 33-57
- **Petard J.** (1993). Les méthodes d'analyse Tome 1 Analyses de sols ORSTOM.

**-R-**

- **Raza,S.,** Jornsgard ,B, Abou-Taleb, H, & Christiansen J. L. (2001). Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. Lett. Appl. Microbiol. 32 (6), 379-383.
- **Ramos J** et Bisseling T. (2004). Symbiotic nitrogen fixation. In: Amancio S, Stulen (Eds). Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. Jour of Plant Physio. 161:1189-1202.
- **Raven P.H,** Evert R.F, Eichlorn S.E.(2000). Biologie végétale. 6ème Ed de boeck, Paris.
- **Robledo M,** Jiménez-Zurdo J.I, Velázquez E, Trujillo M.E, Zurdo-Pineiro J.L, Ramirez- Bahena M.H, Ramos B, Diaz-Minguez J.M., Dazzo F, Martinez-Molina E., et Mateos P.F. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 7064-7069
- **Roger.** (1996).La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement ? pp91.

**-S-**

- **Sánchez-Cañizares. C,** Rey. L, Duran. D, Temprano, F, Sánchez-Jiménez. P, Navarro. A, & Ruiz-Argüeso, T. (2011). Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst and app microbiol.* 34(3), 207-215.
- **Sebihi F. Z.** (2008). Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*.84pp
- **Sédogo, M. P.** (1981). Contribution à l'étude de la valorisation des résidus culturaux en sol ferrugineux et sous climat tropical semi-aride. Matière

- organique du sol, nutrition azotée descultures. Thèse de Docteur Ingénieur, INPL Nancy, 135 pp.
- **Schneider, A.**, & Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* (p. 512). édi Quae.
  - **SDEC.** (2022). Humidité du sol: les différentes techniques [www.SDEC-France.com].
  - **Société Nationale d'Horticulture de France.** (2018). fiche plante- En dépit de sa réputation sulfureuse, la fève occupe une place de choix au potager. On la sème en automne dans le Midi, en février-mars plus au nord. Jar.
  - **Somasegaran P,** Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in legume Rhizobia technology. Spr-Ver.new York. P450.
  - **Sprent J. I.** (1995). Legume trees and Shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. Soil Biol Biochem, 27: 401 – 407
  - **Steenhoudt, O,** Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS. Microbiol. Rev. 24, 487–506,
  - **Stowers, M.D.** (1985). Carbon metabolism in Rhizobium species. Annu. Rev. Microbiol, 39:89- 108.
  - **Swaraj. K,** Bishnoi, N.R. (1999). Effet of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Indian J. Exp. Biol. 37 (9), 843-848.

**-T-**

- **Thami-Alami, I,** Elboutahiri, N, Udupa, S.M. (2010). Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. In: Porqueddu C, Rios S (eds) The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Zaragoza. Ci-heam/cibio/fao/seep, pp 265–269.
- **Tortora G.J,** Funk B.R. et Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Ed du Renou Pédago Inc. Nb de pages 945

**-V-**

- **Väderstad.** Caractéristiques des différents types de sol. [infoFR@vaderstad.com].
- **Van Kessel, C.** and Hartley, C. (2000). Agricultural Management of Grain Legumes. Has It Led to An Increased in Nitrogen Fixation? Fie Crop Res. 65, 165-181.
- **Vincent, J.M.** (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxf, UK.
- **Vinuesa, P,** León-Barrios, M, Silva, C, Willems, A, Jarabo-Lorenzo, A, Pérez-Galdona, R, Werner, D, Martínez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov, an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteeae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 569–575.

**-W-**

- **Wang, H,** Noren, A. (2006). Metabolic regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. Soc. Trans. 34, 160-161.
- **Wei, G. H., X. Y,** Yang, Z. X, Zhang, Y. Z, Yang, and K., Lindstrom. (2008). Strain *Mesorhizobium* sp. CCNWGX035; A stress tolerant isolate from *Glycyrriza glabra* displaying a wide host range of nodulation. Ped. 18, 102-112.
- **Weir B.S.** (2016). The current taxonomy of Rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan.

- **Werber, D.** (1992). Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Acad Sin : 39.
- **Werner D.** (2007). Molecular biology and ecology of the rhizobia. Legume Symbiosis. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P (Eds) the rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press. pp 237-259.
- **WernerD.** (1992). Symbiosesofplantsand microbes. Philipps University Marburg Germany. Ed Chap & Hall.

### -Z-

- **Zahran HH.** (1999). *Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation Under Severe Conditions and in an Arid Climate*. Microbiol Molec Biol Rev 63 (4): 968-989.
- **Zahran, H. H,** Ahmad, M. S, Abdel-Fatteh, M, Zaki, A. Y. (1999). Phenotypic characteristics, cross nodulation and nitrogen fixation of root nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. Proc. Int. Symp. Biol. Nit. Fix. and Crop Prod. 77-90.
- **Zahran, H.H.** (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and Biotechnology. J Biotechnol. 91, 143-153.
- **Zied, A,** (2020). Caractérisation phénotypique et étude de la tolérance aux métaux lourds de quelques souches rhizobiennes. Université de Biskra p53.

# *Annexes*

## Annexe 01 :

### 1. Milieux de culture utilisés :

#### 1.1. Composition de milieu YMB (Yeast Manitol Broth) en g/l (Vincent, 1970) :

• Mannitol	10.00 g.
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50 g.
• NaCl	0.10 g.
• MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0.20 g.
• Extrait de levure	0.50 g.
• Eau distillée	1.00 L.
• pH	6.8.

##### 1.1.1. Préparation de milieu :

- Ajouter le mannitol et les sels à 1L d'eau distillée.
- Dissoudre le mélange avec un agitateur.
- Ajuster le pH à 6.8 avec le NaOH 0.1 N.
- Stériliser le tout dans un autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

#### 1.2. Composition de milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Vincent., 1970) :

• YMB	1.00 L.
• Agar	15.00 g.
• pH	6.8.

##### 1.2.1. Préparation de milieu :

- Préparer l'YMB comme décrit ci haut,
- Dissoudre le mélange avec un agitateur et une plaque chauffante,
- Ajouter l'agar agar et agiter.
- Stériliser à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes.
- Après stérilisation, agiter de nouveau pour assurer une mixture de l'agar avec l'YMA.

#### 1.3. Composition de milieu YMA+ RC (Rouge Congo) en g/l :

• YMA	1.00 L.
-------	---------

- **Solution Stock de RC      10 mL.**

### 1.3.1. Préparation de milieu :

- **Solution stock RC :**
  - ✓ Préparer une solution stock de 0.25g de RC/100ml eau distillée.
- **YMA-RC :**
  - ✓ Préparer l'YMA comme décrit ci haut,
  - ✓ Ajouter 10 ml solution stock de Rouge Congo à 1L de YMA.
  - ✓ Après stérilisation avec autoclave 120°C pendant 20 minutes, agiter de nouveau pour assurer une mixture de rouge Congo avec l'YMA.

### 1.4. Composition de milieu YMA+ BTB (bleu de Bromthymol) en g/l :

- **YMA                                      1.00 L.**
- **Solution Stock de BTB      5.00 mL.**

### 1.4.1. Préparation de milieu :

- **Solution stock BTB :**
  - ✓ Préparer une solution stock de 0.5 g de BTB/100 ml d'éthanol.
- **YMA-BTB :**
  - ✓ Préparer l'YMA comme décrit ci haut,
  - ✓ Ajouter 5 ml solution stock de bleu de Bromthymol à 1L de YMA.
  - ✓ Après stérilisation avec autoclave 120°C pendant 20 minutes, agiter de nouveau pour assurer une mixture de bleu de Bromthymol avec l'YMA.

### 1.5. Composition de milieu YMA (source de carbone) g/L :

- |   |   |                     |                |
|---|---|---------------------|----------------|
| • <b>Sucre :</b>                            | } | <b>D-Saccharose</b> | <b>10.00 g</b> |
|   |   | <b>D-Glucose</b>    | <b>10.00 g</b> |
|   |   | <b>Fructose</b>     | <b>10.00 g</b> |
| • <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>       |   |                     | <b>0.50 g</b>  |
| • <b>NaCl</b>                               |   |                     | <b>0.10 g</b>  |
| • <b>MgSO<sub>4</sub> 7(H<sub>2</sub>O)</b> |   |                     | <b>0.20 g</b>  |
| • <b>NH<sub>4</sub>Cl</b>                   |   |                     | <b>1.00 g</b>  |
| • <b>Eau distillée</b>                      |   |                     | <b>1.00 L</b>  |
| • <b>pH</b>                                 |   |                     | <b>6.8</b>     |

**1.5.1. Préparation de milieu :**

- Ajouter l'un des sucres et les autres composants à 1L d'eau distillée.
- Dissoudre le mélange avec un agitateur.
- Ajuster le pH à 6.8 avec le NaOH 0.1 N.
- Ajouter l'agar agar et agiter.
- Stériliser à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes.
- Après stérilisation, agiter de nouveau pour assurer une mixture de l'agar avec l'YMA.

**1.6. Composition de milieu YMA (source d'azote) g/L :**

• Mannitol		<b>10.00 g</b>
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		<b>0.50 g</b>
• NaCl		<b>0.10 g</b>
• MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)		<b>0.20 g</b>
• Acide aminé	}	• L-Asparagine <b>0.50 g</b>
		• L-Leucine <b>0.50 g</b>
		• D-Histidine <b>0.50 g</b>
• Eau distillée		<b>1.00 L</b>
• pH		<b>6.8</b>

**1.6.1. Préparation de milieu :**

- Ajouter le mannitol, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, MgSO<sub>4</sub> 7(H<sub>2</sub>O) et l'un des acides aminés à 1 L d'eau distillée.
- Dissoudre le mélange avec un agitateur.
- Ajuster le pH à 6.8 avec le NaOH 0.1 N.
- Ajouter l'agar agar et agiter.
- Stériliser à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes.
- Après stérilisation, agiter de nouveau pour assurer une mixture de l'agar avec l'YMA.

**1.7. Composition de milieu Mannitol-mobilité-nitrate :**

• Mannitol-mobilité-nitrate	<b>22 g</b>
• Eau distillé	<b>1.00L</b>

**1.7.1. Préparation de milieu :**

- Ajouter la poudre déshydratée de mannitol-mobilité-nitrate à 1L d'eau distillée.
- Dissoudre le mélange avec un agitateur.
- Verser le milieu dans des tubes à vis.
- Stériliser à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes.

**N.B 1 :**

- **Solution stock rouge de phénol 0.012%:**
  - ✓ Préparer une solution stock de 0.012 g de rouge de phénol/100ml eau distillée.
- **Solution stock Urée 2% :**
  - ✓ Préparer une solution stock de 2 g d'urée /100ml eau distillée.
- **Solution stock CMC 0.25%:**
  - ✓ Préparer une solution stock de 0.25 g de CMC /100ml YMA.

**N.B 2:**

- **NaCl : 1 M = 58.50g (NaCl) /1.00L (eau distillée).**
- **Kcl : 1 M = 74.55g (Kcl ) / 1.00L (eau distillée).**

## Annexe 02 :

### Méthodologie :

#### 1. Coloration de GRAM :

##### 1.1. Faire un frottis:

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une anse stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter l'anse dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

##### 1.2. Coloration et explications:

- Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** (cristal violet) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter l'excès de colorant dans un bécher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H<sub>2</sub>O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de **lugol** sur le frottis. .
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'H<sub>2</sub>O comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de **décoloration** sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).
- Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Contre-colorer en déposant la solution de **Fuchsine** (rose) pendant 1 minute.
- Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 100x).

## 2. Classification des textures :

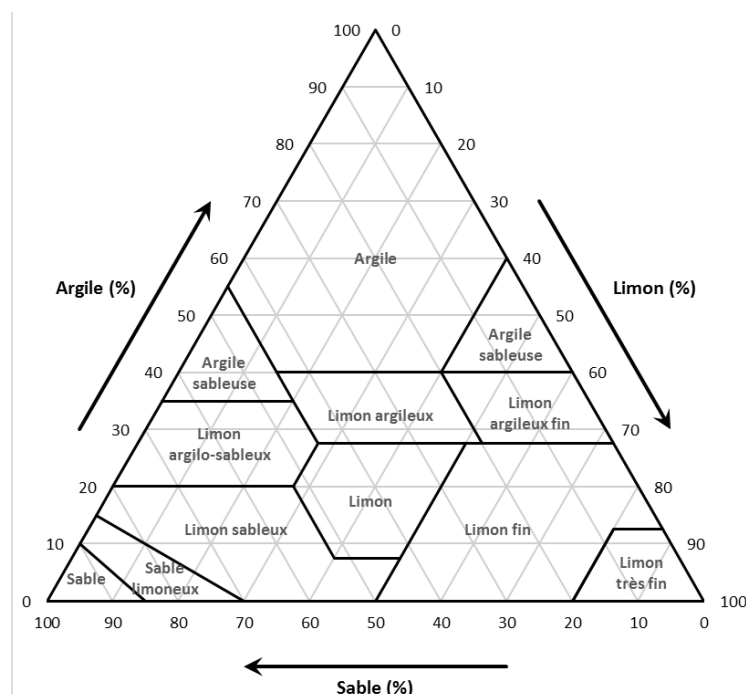
Cette classification est représentée à l'aide d'un triangle, appelé triangle des textures, dont les trois côtés correspondent respectivement aux pourcentages de sable, de limon et d'argile.

Il existe de nombreux triangles de texture. Celui-ci représente la classification adoptée par le département de l'Agriculture américain (USDA). Il est possible de regrouper les textures en quatre classes fondamentales, qui permettent de définir les principales propriétés du sol :

- texture sableuse, texture limoneuse, texture argileuse, texture équilibrée

**Ex :** La bouteille contient 6,8 cm de sol au total, dont 4,5 cm de sable, 1,5 cm de limon et 0,8 cm d'argile

- Les calculs :
  - % de sable :  $(4,5 \times 100) / 6,8 = 66,2\%$
  - % de limon :  $(1,5 \times 100) / 6,8 = 22\%$
  - % d'argile :  $(0,8 \times 100) / 6,8 = 11,8\%$



**Figure :** Triangle des textures.

## Annexe 03 :

**Tableau.1** : Résultats des tests physiologiques sur le milieu YMA :

Après 24H																										
pH						NaCl (g)						T (°C)														
3			5			9			0.10		0.50		1.00		4			37			44,5					
S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
/	/	/	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	..	+-	+-	+-	++	++	+-	..	..	..	+-	+-	+-	..	..	..
Après 48H																										
pH						NaCl (g)						T (°C)														
3			5			9			0.10		0.50		1.00		4			37			44					
S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
/	/	/	+++	+++	+-	+++	+-	+++	+++	+++	..	++	++	++	++	++	++	+-	+-	..	+++	+-	+++	+++	..	..

S1	S2	S3
Souche 1 : M'Toussa	Souche 2 : Ain. Dj (1)	Souche 3 : Ain.Dj (2)

+++	++-	+--	---
Très bonne croissance	Bonne croissance	Faible croissance	Absence de croissance

Tableau.2 : Résultats des tests physiologiques sur le milieu YMP (DO)

M'Toussa											
Après 24H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,005	0,012	0,046	0,024	0,012	0,065	0,038	0,010	0,011	0,196	0,098	0,046
Après 48H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,100	0,139	0,345	0,219	0,196	0,850	0,250	0,114	0,010	0,345	0,296	0,076
Ain Dj 1											
Après 24H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,017	0,058	0,075	0,016	0,075	0,250	0,110	0,005	0,024	0,075	0,022	0,011
Après 48H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,067	0,252	0,484	0,170	0,184	0,807	0,242	0,006	0,070	0,484	0,250	0,020
Ain Dj 2											
Après 24H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,004	0,176	0,200	0,079	0,007	0,133	0,099	0,035	0,014	0,037	0,077	0,019
Après 48H											
pH				NaCl (g)				T (°C)			
3	5	6.8	9	0.010	0.10	0.50	1.00	4	28	37	44.5
0,031	0,130	0,345	0,119	0,095	0,401	0,170	0,036	0,020	0,345	0,124	0,041

## Annexe 04 :

Les protocoles schématisés :

Logiciel utilisé : Adobe illustrator.

### 1. Echantillonnage :

#### 1.1. Isolement des souches à partir des nodules :

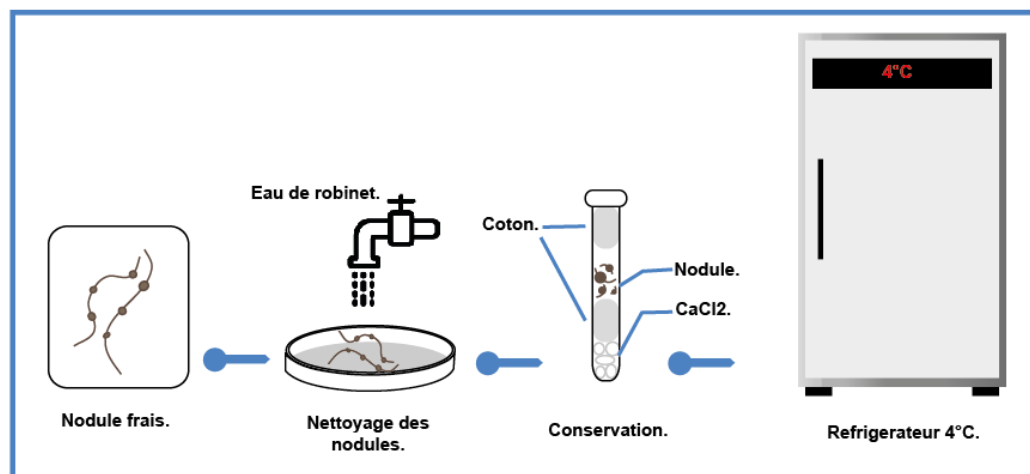


Fig. 1 : Conservation des nodules.

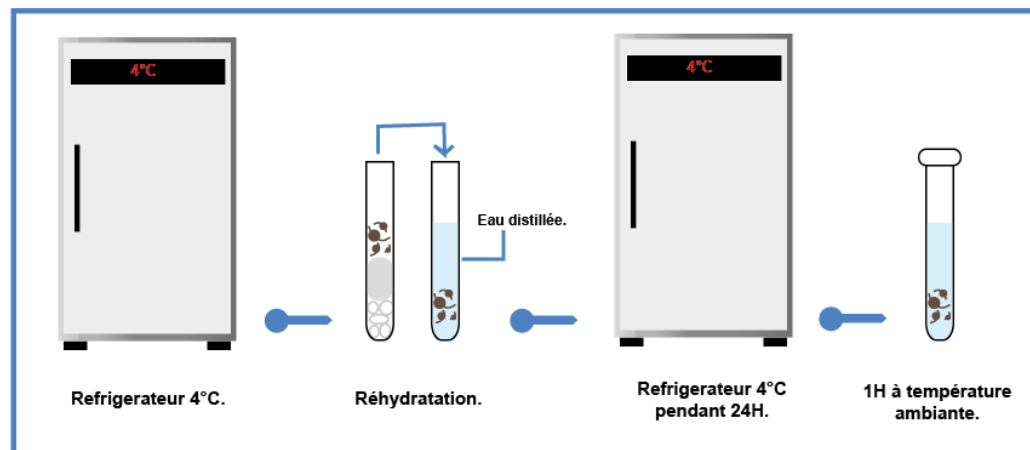
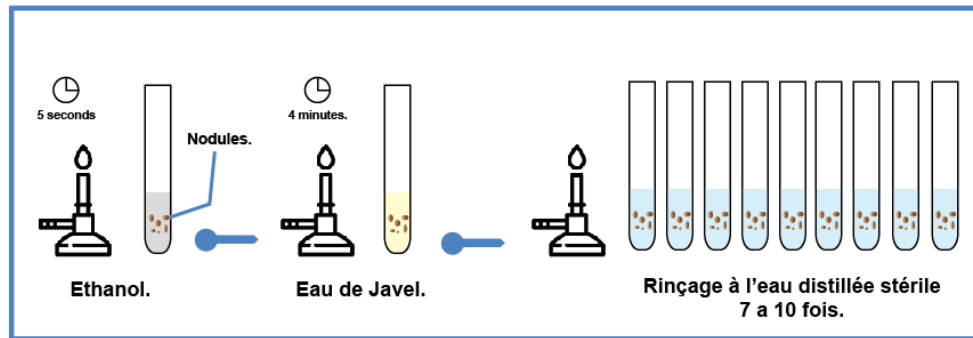
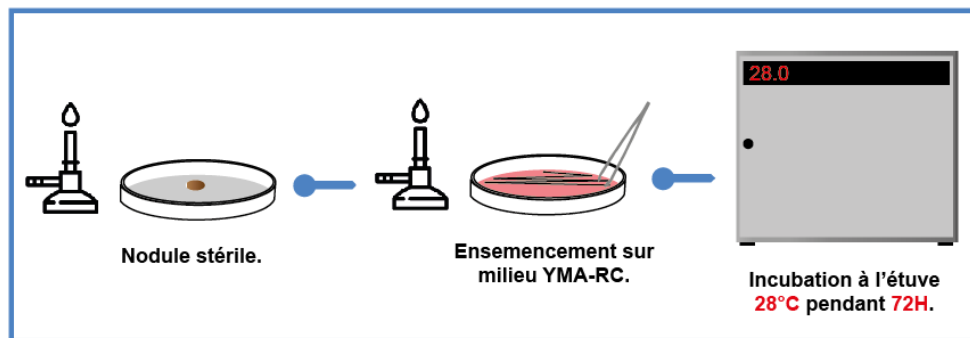


Fig. 2 : Réhydratation des nodules conservés.

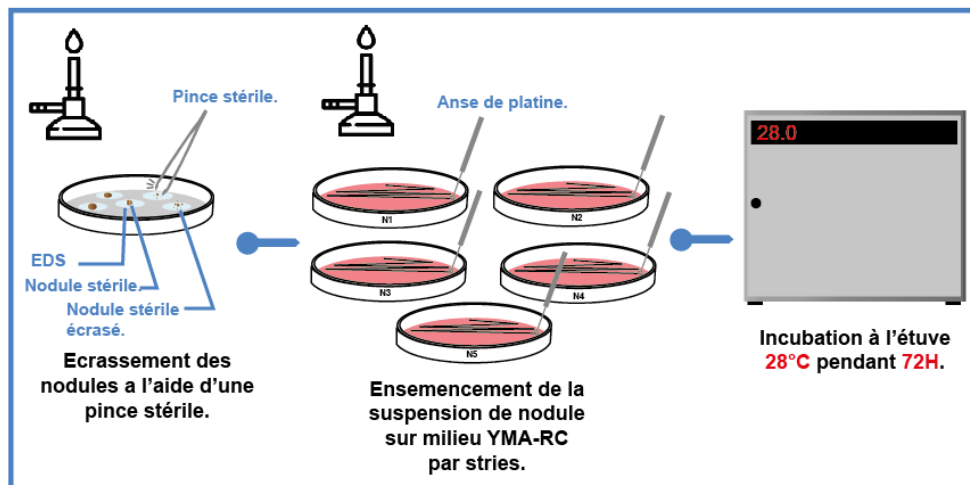
#### 1.1.1. Stérilisation des nodules :



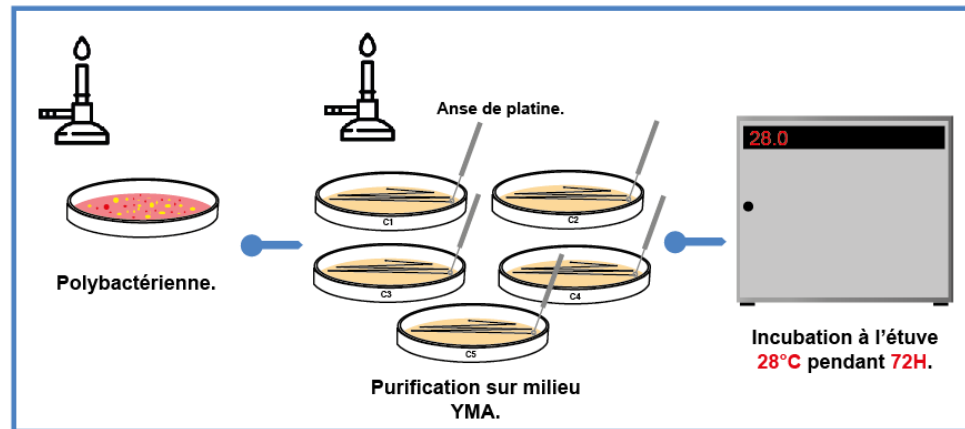
### 1.1.2. Test de stérilisation :



### 1.2. Isolement selon la méthode des nodules écrasés :



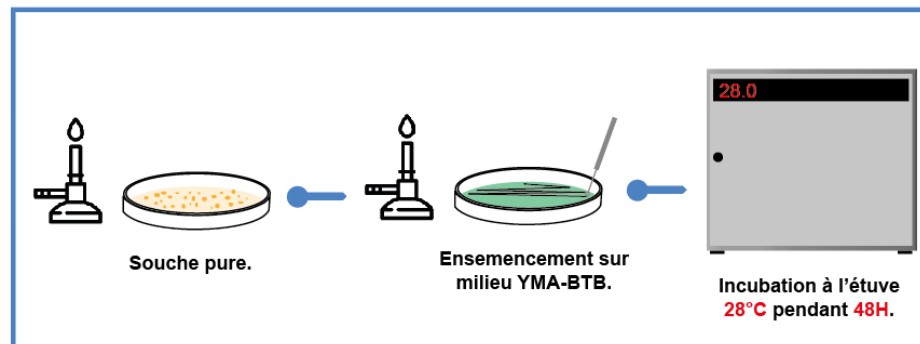
### 1.3. Purification des isolats :



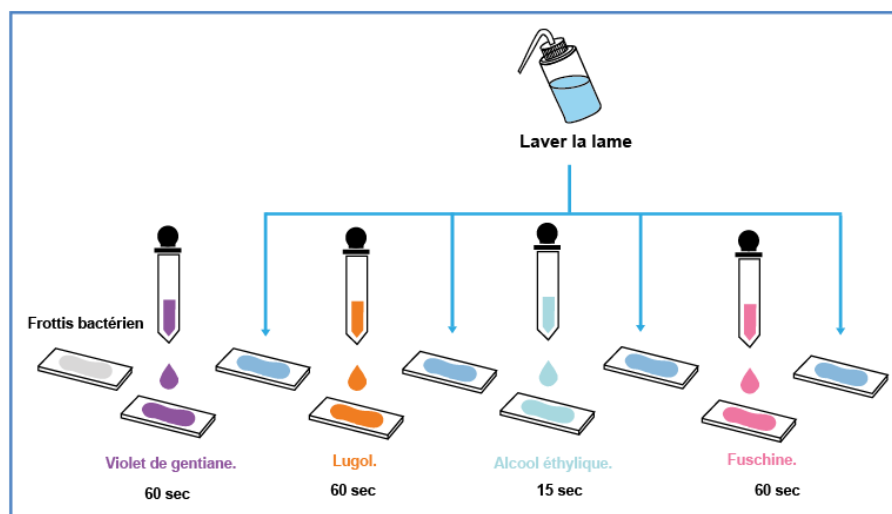
## 2. Caractérisation phénotypiques des isolats :

### 2.1. Caractères culturels des isolats et examen microscopique :

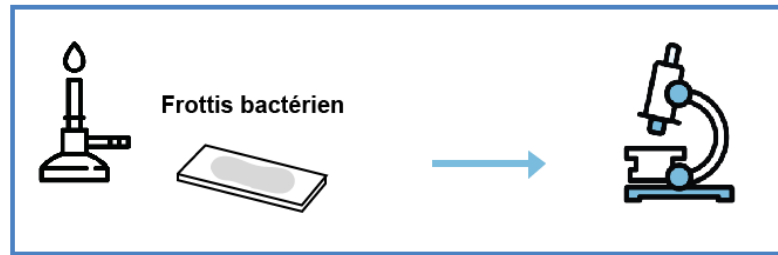
#### 2.1.1. Test de BTB :



#### 2.1.2. Coloration de GRAM :

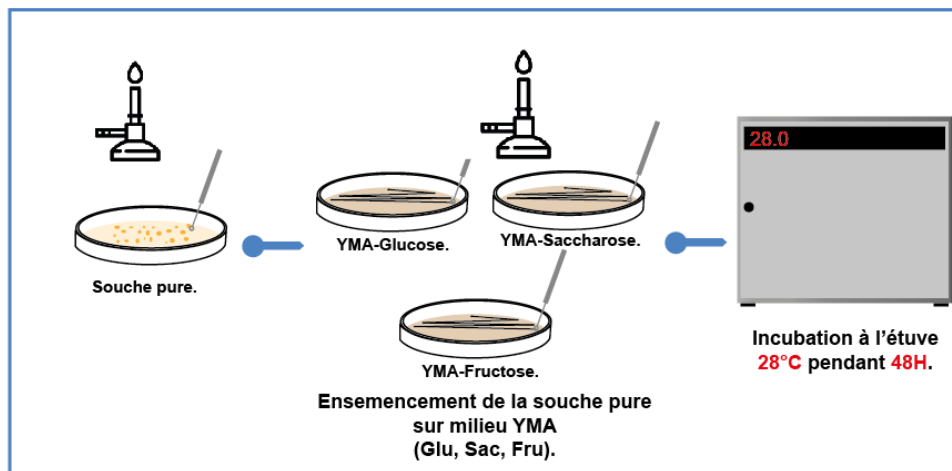


#### 2.1.3. Etat frais (test de mobilité) :

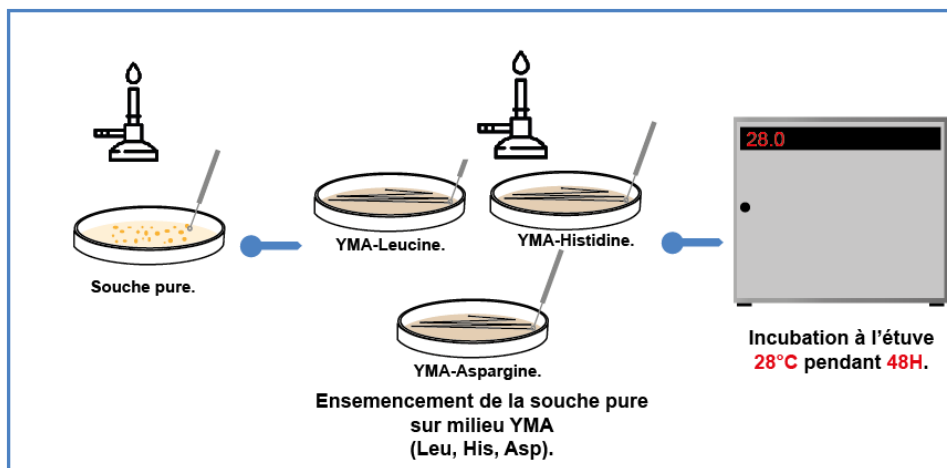


## 2.2. Tests nutritionnels :

### 2.2.1. Assimilation de la source de carbone :

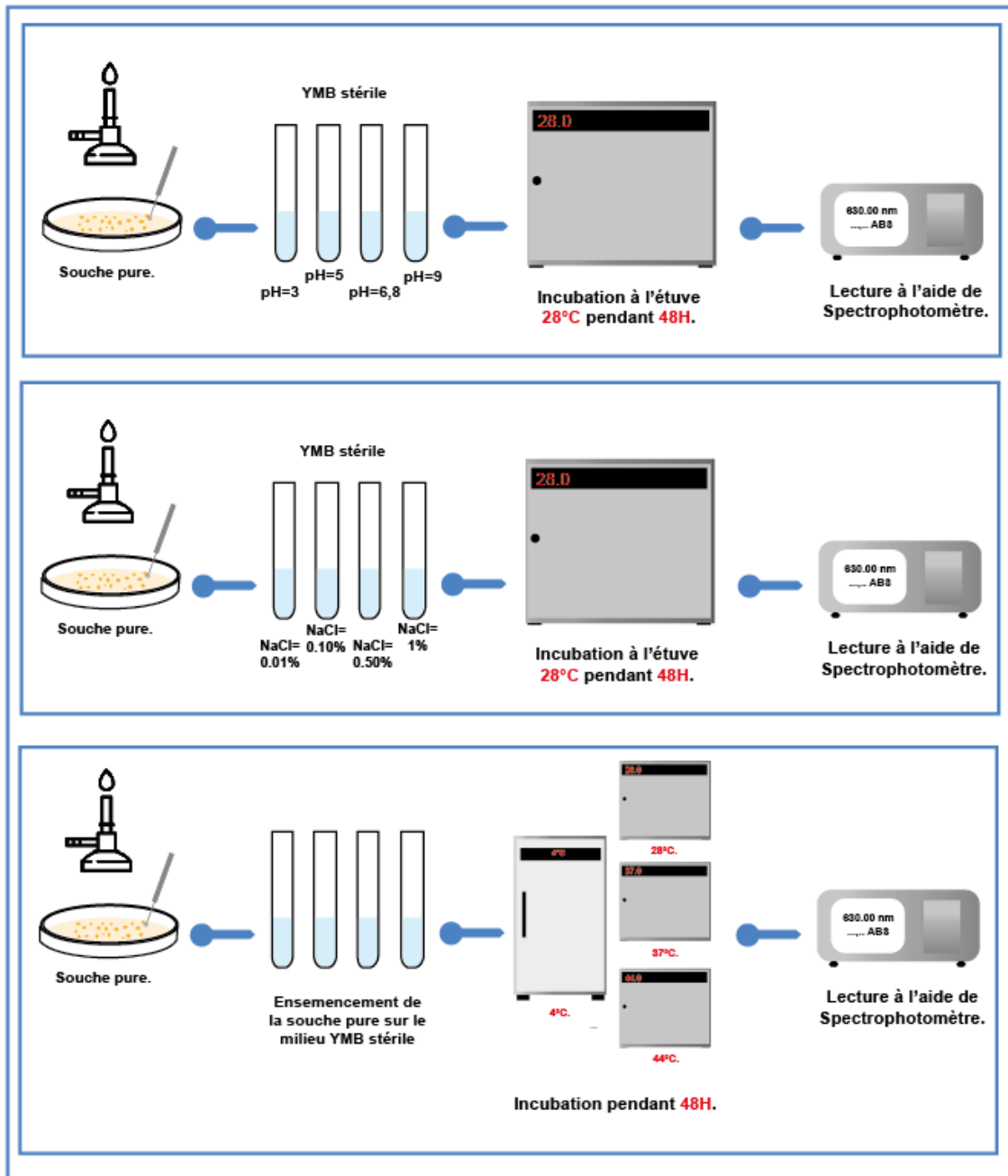


### 2.2.2. Assimilation de la source d'azote :



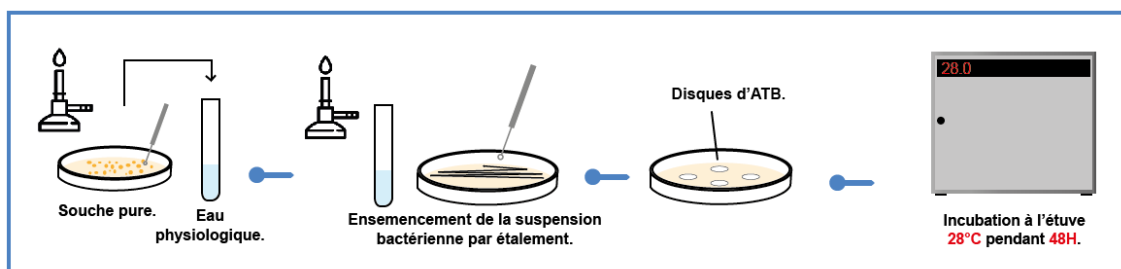
## 2.3. Test physiologiques :

### 2.3.1. Effet de pH, NaCl et Température :



## 2.4. Test biochimiques :

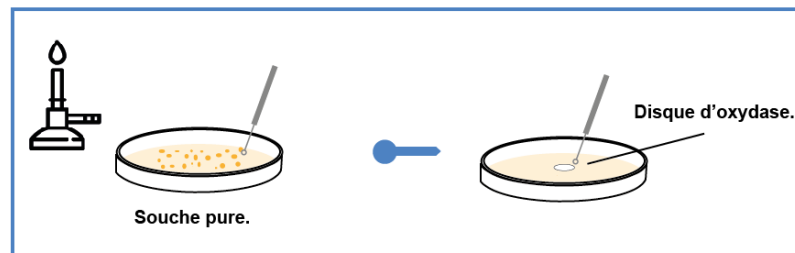
### 2.4.1. Test Antibiogramme :



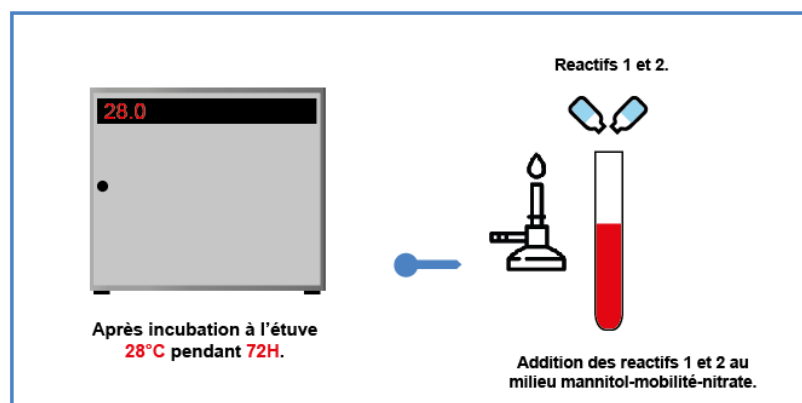
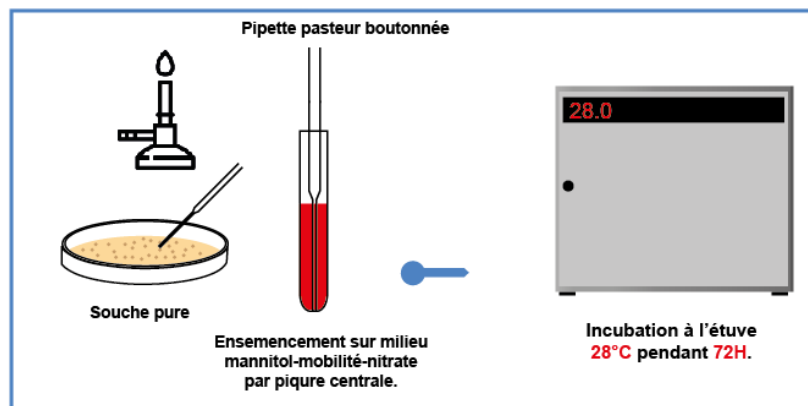
## 2.4.2. Test catalase :



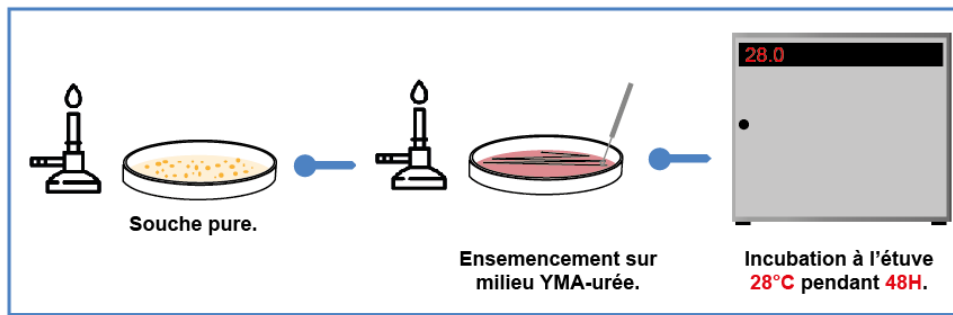
## 2.4.3. Test oxydase :



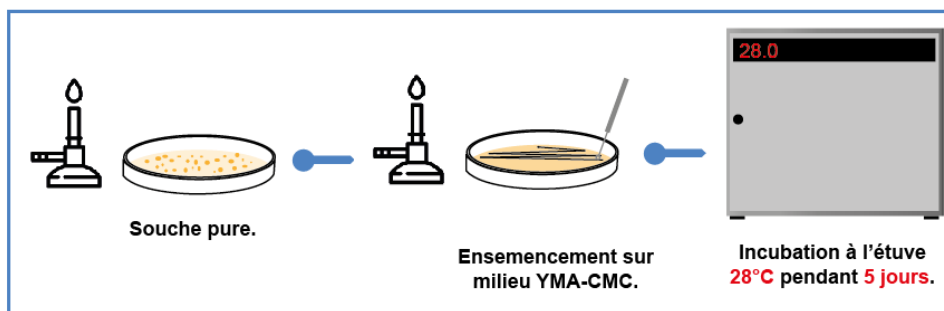
## 2.4.4. Recherche de nitrate réductase :



### 2.4.5. Hydrolyse de l'urée :



### 2.4.6. Activité cellulolytique :



## Phenotypic characterization of microsymbionts isolated from root nodules of the legume *Vicia faba*

### Abstract

In this research, 3 bacteria were isolated from the root nodules of *vicia faba* (broad bean) grown in 2 communes in Khenchela which is located in the east of Algeria; and in our case the nodules taken were of the indeterminate, bilobed and polylobed types in the form of a cluster.

The isolates were subjected to: phenotypic characterization whatever macroscopic and microscopic, physiological characterization by the effect of pH/NaCl and temperature, also by a collection of nutritional tests and biochemical tests such as growth rate , respiratory or specific enzyme tests for the bacteria associated with the root of this legume.

The morphological and cultural study, as well as the biochemical tests classify these isolates as being bacteria with rapid growth, presenting the features of the bacteria of the genus *Rhizobium* and the physicochemical properties of the soils shows that the symbiotic fixation in the *vicia faba*. *L* is strongly related to the edaphic conditions of the soil.

**Keywords:** Symbiosis, *Rhizobium*, Nodules, *Viciafabab L*, phenotypic characterization.

## الخصائص المظهرية للبكتيريا التعايشية المعزولة من العقيدات الجذرية للبقوليات *Vicia faba*

### ملخص

في هذه الدراسة ، تم عزل 3 بكتيريا من العقيدات الجذرية للبقوليات فيسيا فابا *vicia faba* (الفاول) ، المزروعة في بلديتين مختلفتين من ولاية خنشلة التي تقع شرق الجزائر. وفي الحالة التي قمنا بدراستها ، كانت العقيدات المأخوذة من الأنواع غير المحددة ، والمزدوجة الفصوص ، والمتعددة الفصوص في شكل كتلة.

تم إخضاع العزلات البكتيرية إلى : دراسة الخصائص الظاهرية على المستوى العيني و المجهرى ، كما دراسة الخصائص الفسيولوجية بتأثير درجتي pH/ Nacl ودرجة الحرارة T ، وكذلك من خلال مجموعة من اختبارات خصائص التعايش الغذائية والاختبارات البيوكيميائية مثل معدل النمو ، واختبارات التنفس كما اختبارات الإنزيمات النوعية للبكتيريا المصاحبة لجذور هاته البقوليات .

الدراسة المورفولوجية والزراعية وكذلك الاختبارات البيوكيميائية التي تمت تصنف هذه العزلات على أنها بكتيريا ذات نمو سريع ، وتمثل خصائص بكتيريا من نوع ريزوبيوم (*Rhizobium*) ، كما أن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للتربة ، دلت على أن التثبيت التكافلي أو التعايشي لفيسيا فابا ل (*vicia faba.L*) يرتبط بقوة بالظروف التكوينية للتربة.

**الكلمات المفتاحية :** التعايش، *Rhizobium* ، العقيدات الجذرية ، *Vicia faba L* الفول ، الخصائص الظاهرية

**MERKICHE Besma**

**FALEK Hidayat**

**BOUSSEKKINE Iman**

## *Diplôme master académique*

**Thème :** Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Vicia faba*

### **Résumé**

Dans cette étude, 3 bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires du *vicia faba* (fève), cultivés en 2 communes à la wilaya de Khenchela qui située à l'Est de l'Algérie; et dans notre cas les nodules prélevés été du types indéterminés, Bilobés et polylobés sous forme d'un amas.

Les isolats ont fait l'objet d'une : caractérisation phénotypique quelque soit macroscopique et microscopique, une caractérisation physiologique par l'effet de pH/NaCl et Température, aussi par une collection des tests nutritionnels et des tests biochimiques telle que la vitesse de croissance, tests enzymatiques respiratoires et spécifiques de la bactérie associée à la racine de cette légumineuse.

L'étude morphologique et culturale, ainsi que les tests biochimiques classent ces isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium* et les propriétés physico-chimiques des sols, montre que la fixation symbiotique chez la *vicia faba.L* est fortement liée aux conditions édaphiques du sol.

**Mots clés :** Symbiose, *Rhizobium*, Nodules, *Vicia faba L*, caractérisation phénotypique.

**Président :** Dr. SEDRATI Abdenour

**MCB**

Université de Khenchela

**Examinatrice :** Dr. BENRDJAM Lamia

**MAA**

Université de Khenchela

**Promotrice :** Dr. MELLAL Hanane

**MAB**

Université de Khenchela

**MERKICHE Besma**

**FALEK Hidayat**

**BOUSSEKKINE Iman**

***Diplôme master académique***

**Thème :** Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Vicia faba*

**Résumé**

Dans cette étude, 3 bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires du *vicia faba* (fève), cultivés en 2 communes à la wilaya de Khenchela qui située à l'Est de l'Algérie; et dans notre cas les nodules prélevés été du types indéterminés, Bilobés et polylobés sous forme d'un amas.

Les isolats ont fait l'objet d'une : caractérisation phénotypique quelque soit macroscopique et microscopique, une caractérisation physiologique par l'effet de pH/NaCl et Température, aussi par une collection des tests nutritionnels et des tests biochimiques telle que la vitesse de croissance, tests enzymatiques respiratoires et spécifiques de la bactérie associée à la racine de cette légumineuse.

L'étude morphologique et culturale, ainsi que les tests biochimiques classent ces isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium* et les propriétés physico-chimiques des sols, montre que la fixation symbiotique chez la *vicia faba.L* est fortement liée aux conditions édaphiques du sol.

**Mots clés :** Symbiose, *Rhizobium*, Nodules, *Vicia faba L*, caractérisation phénotypique.

**Président :** Dr. SEDRATI Abdenour

**MCB**

Université de Khenchela

**Examinatrice :** Dr. BENRDJAM Lamia

**MAA**

Université de Khenchela

**Promotrice :** Dr. MELLAL Hanane

**MAB**

Université de Khenchela

