



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et
à l'Environnement « LAMAABE »

Mémoire

Présentée par :

Elmamoune Meriem et Chebbab Hanene

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

Option : Microbiologie et Contrôle de qualité

Thème

Isolement, Identification des souches de Rhizobium et recherche des activités enzymatiques

Soutenu le : 23/06/2024

Devant le jury :

| | | |
|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Président | Pr. Rebiahi Sidahmed | Université de Tlemcen |
| Encadrant | Dr. Rahmoun Malika | Université de Tlemcen |
| Examinatrice | Dr Nas Fatima | Université de Tlemcen |

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement :

Tout d'abord, le grand merci est pour ALLAH qui nous donne la capacité suffisante et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nos sincères remerciements s'adressent à notre promotrice Mme Rahmoun Malika de nous avoir suivi et dirigé tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous avons été extrêmement chanceuses pour sa disponibilité, ses encouragements, ses conseils et surtout sa gentillesse.

Nous remercions également les membres de jury, le professeur Rebiahi Sid Ahmed pour accepter de présider le jury et Mme Nas Fatima d'accepter de consacrer son précieux temps et examiner notre travail.

Un grand merci aussi au équipe de Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE » et aux membres de département de Physique, Faculté des sciences, Université de Tlemcen pour nous donner la chance à utiliser le microscope électronique pour observer notre isolats.

Sans oublier de remercier tous nos enseignants qui ont enrichi et de nous avoir guidées durant toutes ces années.

Finalement, nous tenons également à remercier tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou loin pour terminer ce travail.

Dédicace

Mes chers parents, Je veux remercier mon père **Hadj**, mon héros et mon soutien dans cette vie. Merci pour tous ce que vous avez fait et donné pour mon instruction et mon éducation et pour que j'atteigne les plus hauts niveaux de vie.

Ma mère **Anissa**, la lumière de ma vie et la source de tendresse. Merci pour votre patience, votre encouragement et vos prières qui ont toujours accompagnée à chaque étape de mon parcours académique.

Merci, qu'ALLAH prolonge votre vie et maintienne votre santé et vous serez fiers de moi. Je vous aime beaucoup « mon cœur et sons pouls ».

A mes chers frères : **Mohamed** pour me donner la force à continuer

,**kamel** pour son encouragement et leurs blagues qui me fait sentir bien et sans oublier sa gentille fiancée **Sirine**, je vous aime beaucoup. .

A mes adorables sœurs : **Somia** pour ses conseils précieux et son mari

Mohamed, et **Farah** d'être toujours avec moi malgré sa bêtise.

A la joie de notre famille ma petite nièce **Assil et** sans oublier ma petite chatte **Lina**.

A toute ma famille : mon grand-père **Abderrahmane**, mes ancles, mes tantes, mes cousin et ma cousines.

A mes meilleures amies :**Meriem** ma binôme avec qui je partage avec elles les belles souvenirs qui vont reste toujours inoubliables. Aussi pour **RymAmina** et **Bouchra**.

Et enfin sans oublier la promo Master 2 microbiologie et contrôle de qualité .

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédie ce modeste travail à mes chères parents **Ali** et **Hadja** qui me donnent toujours l'espérance de vivre ,pour leur sacrifices et leurs conseils précieux tout au long de mes études .

À mes sœurs et ses mari pour leur encouragement ,sans oublier mes neveux et nièces que votre vie soit remplie de joie et de bonheur, je vous aime beaucoup.

Un grand merci a ma plus proche sœur **Zineb** qui m'a chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

Tout spécialement, je remercie ma grande mère **Zahra** que dieu la garder pour nous.

À tout ma famille oncles et cousins chacun par son nom, grand et petit.

Un grand dédicace à ma deuxième famille, y compris mon beau-père

Mohammed et ma belle-mère **Houria**.

À l'homme de ma vie **Zakaria** ,pour sa présence dans mes moments les plus difficiles ,aussi pour son soutien moral et ses encouragements.

À ma chère binôme qui a partagé avec moi les moments heureux et pénibles durant cette année.

Enfin à toutes personnes que j'aime.

Meriem

Résumé

Notre travail avait pour objectif d'isoler et de purifier des bactéries *Rhizobium* à partir de plantes *Vicia faba* récoltées de trois sites différents de la wilaya de Tlemcen. Les résultats d'isolement et purification des bactéries sur les différents milieux de cultures (YMA , YMA +BTB et YMA+RC) ont permis d'obtenir 14 souches ayant les caractères morphologiques microscopiques et macroscopiques des *Rhizobium* dont la plupart des souches acidifient le milieu YMA+BTB. Afin de confirmer notre identification, nous avons utilisé les différents tests qui ont montré tous les caractéristiques biochimiques chez les autres *Rhizobium*. Neuf souches ont été orientées pour la recherche de leurs activités enzymatiques. Les résultats ont montré la présence d'une activité amylolytique et cellulosique et l'absence de l'activité lipolytique et gélatinase. Concernant l'activité protéolytique, les souches présentaient une faible hydrolyse de la caséine.

Mots-clés : *Rhizobium*, *Vicia faba* , fixation d'azote, légumineuse, PGPR , nodulation, activité enzymatique , symbiose.

ملخص

يهدف عملنا إلى عزل وتنقية بكتيريا الرايزوبيوم من نباتات الفول التي تم جمعها من ثلاثة مواقع مختلفة في ولاية تلمسان. مكنت نتائج عزل وتنقية البكتيريا على أوساط الاستنبات المختلفة من الحصول على 14 سلالة ذات الخصائص المورفولوجية المجهرية والعيانية للريزوبيوم، معظم سلالاتها تعمل على تحميض وسط YMA +BTB مما يسمح لنا بوصفها بأنها بكتيريا سريعة النمو. ومن أجل تأكيد هويتنا استخدمنا الاختبارات المختلفة التي أظهرت جميع الخصائص البيوكيميائية في الريزوبيوم الآخر، ليتم توجيه 9 السلالات للبحث عن نشاطاتها الأنزيمية. أظهرت النتائج وجود نشاط الأميلازي والسليلوز وغياب نشاط الليباز والجيلاتيني. أما بالنسبة للنشاط البروتيني فقد أظهرت السلالات انخفاض التحلل المائي للكازين.

الكلمات المفتاحية: الكلمات المفتاحية: الريزوبيوم، فيسيا فابا، تثبيت النيتروجين، البقوليات، عقيدات

PGPR. النشاط الأنزيمي، والتعايش

Abstract

Our work aims to isolate and purify *Rhizobium* bacteria from *Vicia faba* plants collected from three different sites in the wilaya of Tlemcen. The results of isolation and purification of bacteria on the different culture media (YMA, YMA +BTB and YMA+RC) made it possible to obtain 14 strains having the microscopic and macroscopic morphological characteristics of *Rhizobium*, most of the strains of which acidify the YMA medium +BTB, which allows us to characterize them as fast-growing bacteria. In order to confirm our identification we used the different tests, which showed all the biochemical characteristics in the other *Rhizobium*, nine strains were oriented for the research of their enzymatic activities. The results showed the presence of amylolytic and cellulose activity and absence of lipolytic and gelatinase activity. Concerning the proteolytic activity, the strains presented a low hydrolysis of casein.

Keywords: *Rhizobium*, *Vicia faba*, nitrogen fixation, legume, PGPR nodulation. Enzymatic activity, symbiosis.

Tables des matières :

| | |
|---|----------|
| Liste des abréviations | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Introduction | 1 |
|Chapitre I : Symbiose Rhizobium-légumineuse | |
| I. La rhizosphère | 3 |
| I.1 Définition | 3 |
| I.2 <i>Rhizobium</i> | 3 |
| I.2.1 Taxonomie de <i>Rhizobium</i> | 3 |
| I.2.2 Les caractères morphologiques | 4 |
| I.2.3 Les caractères cultureux | 5 |
| I.2.4 Les caractères biochimiques | 5 |
| I.2.5 Les caractères physiologiques | 6 |
| I.3 Les PGPR | 6 |
| I.3.1 Définition | 6 |
| I.3.2 Le rôle des PGPR | 7 |
| II. Les légumineuses | 9 |

| | |
|--|-----------|
| II.1 Généralités | 9 |
| II.2 Intérêt des légumineuses | 9 |
| II.3 La fève | 9 |
| II.3.1 Description de fève | 9 |
| III. Fixation biologique de l'azote | 11 |
| III.1 Définition | 11 |
| III.2 Fixation symbiotique de fève | 11 |
| III.3 La nodulation | 13 |
| III.3.1 Définition | 13 |
| III.3.2 Les étapes de nodulation | 13 |
|Chapitre II : Les activités enzymatiques | |
| I. Généralité | 16 |
| II. Classification des enzymes | 16 |
| III. Production des enzymes | 17 |
| III.1 Activité amylasique | 17 |
| III.2 Activité protéolytique | 18 |
| III.3 Activité cellulosique | 19 |
| III.4 Activité uréasique | 19 |
|Matériel et méthode..... | |
| 1. Isolement des bactéries à partir des nodules | 21 |
| 1.1 Description de la zone d'étude | 21 |
| 1.2 Collecte des nodules | 21 |
| 1.3 Prélèvement des nodules | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4 Stérilisation des nodules | 22 |
| 1.5 Écrasement des nodules | 23 |
| 1.6 Les milieux de cultures utilisés | 23 |
| 1.7 Isolement et purification des isolats | 24 |
| 2. Caractères morphologiques | 24 |
| 2.1 Examen macroscopique | 24 |
| 2.2 Examen microscopique | 24 |
| 2.2.1 État frais | 24 |
| 2.2.2 Coloration de Gram | 25 |
| 2.2.3 Observation au microscope électronique à balayage | 25 |
| 3. Caractères biochimiques | 25 |
| 3.1 Test du catalase | 25 |
| 3.2 Test d'oxydase | 26 |
| 3.3 Citrate de Simmons | 26 |
| 3.4 Test de Bleu de Bromothymol (BTB) | 27 |
| 3.5 Test de rouge de Congo (RC) | 27 |
| 3.6 Test GPA | 27 |
| 3.7 Recherche de la nitrate réductase | 27 |
| 4. Conservation des souches | 28 |
| 4.1 Conservation à court terme | 28 |
| 4.2 Conservation à long terme | 28 |
| 5. Recherche des activités enzymatiques | 29 |
| 5.1 Activité amylolytique | 29 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 5.2 | Activité cellulosique | 29 |
| 5.3 | Activité protéolytique | 29 |
| 5.3.1 | Hydrolyse de la caséine | 29 |
| 5.3.2 | Recherche de la gélatine | 30 |
| 5.4 | Activité lipolytique | 30 |
| 5.4.1 | Hydrolyse de tween 80 | 30 |
| Résultats et discussion | | |
| 1. | Isolement et purification des isolats | 31 |
| 2. | Caractères morphologiques | 31 |
| 2.1 | Examen macroscopique | 31 |
| 2.2 | Examen microscopique | 32 |
| 2.2.1 | État frais | 32 |
| 2.2.2 | Coloration de Gram | 32 |
| 2.2.3 | Observation au microscope électronique à balayage | 33 |
| 3. | Caractères biochimiques | 33 |
| 3.1 | Test du catalase | 33 |
| 3.2 | Test d'oxydase | 34 |
| 3.3 | Citrate de simmons | 34 |
| 3.4 | Test de Bleu de Bromothymol (BTB) | 35 |
| 3.5 | Test de rouge de Congo (RC) | 36 |
| 3.6 | Test GPA | 36 |
| 3.7 | Recherche de nitrate réductase | 37 |
| 4. | Recherche des activités enzymatiques | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Activité amylolytique | 39 |
| 4.2 Activité protéolytique | 39 |
| 4.3 Activité cellulosique..... | 39 |
| 4.4 Activité lipolytique | 41 |
| Conclusion | 43 |
| Références bibliographiques..... | 44 |
| Annexe..... | 53 |

Liste des tableaux :

- **Tableau 1** : Caractères biochimiques des *Rhizobium*6
- **Tableau 2** : Classification des enzymes17
- **Tableau 3** : Résultats d'isolement31
- **Tableau 4** : Les résultats des activités enzymatiques38

Liste des figures :

| | |
|--|----|
| • Figure 01 : Observation microscopique des <i>Rhizobium</i> | 4 |
| • Figure 02 : Association des PGPR sur les racines de plantes | 7 |
| • Figure 03 : Mécanisme d'interaction des PGPR avec leurs plante hôte | 8 |
| • Figure 04 : Présentation schématique des différents composants de fève | 10 |
| • Figure 05 : La partie aérienne de la fève | 11 |
| • Figure 06 : Le dialogue moléculaire entre les <i>Rhizobiums</i> et légumineuses..... | 12 |
| • Figure 07 : Nodosités sur les racines de trèfle | 13 |
| • Figure 08 : Les différentes étapes de l'établissement de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse. | 15 |
| • Figure 09 : Structure tridimensionnelle de alpha-amylase | 18 |
| • Figure 10 : Localisations géographiques des sites de prélèvement | 21 |
| • Figure 11 : La zone de prélèvement | 22 |
| • Figure 12 : La stérilisation des nodules | 23 |
| • Figure 13 : Les milieux de cultures utilisées | 24 |
| • Figure 14 : Test de citrate de Simmons | 26 |
| • Figure 15 : Résultat des <i>Rhizobium</i> sur YMA..... | 31 |
| • Figure 16 : Résultat de coloration de Gram..... | 32 |
| • Figure 17 : Observation sur MEB | 33 |

| | |
|---|-----------|
| • Figure 18 : Résultat de catalase | 34 |
| • Figure 19 : Résultat de test d'oxydase..... | 34 |
| • Figure 20 : Résultat de culture sur YMA+BTB..... | 35 |
| • Figure 21 : Résultat de croissance sur YMA+RC..... | 36 |
| • Figure 22 : La turbidité sur bouillon nitraté..... | 37 |
| • Figure 23 : Résultat de nitrate réductase..... | 38 |
| • Figure 24 : Activité amylolytique chez les souches P3.2 et P1.1..... | 39 |
| • Figure 25 : Résultat l'hydrolyse de la gélatine..... | 40 |
| • Figure 26 : L'hydrolyse de caséine..... | 41 |
| • Figure 27 : Résultat de l'activité cellulosique..... | 42 |
| • Figure 28 : Résultat de l'activité lipolytique..... | 42 |

Liste des abréviations :

- **ATP** : Adénosine triphosphate
- **BTB** : Blue de Bromothymol
- **°C** : Celsius
- **g** : Gramme
- **MEB** : Microscope électronique à balayage
- **mL** : millilitre
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **N₂** : Azote atmosphérique
- **RC** : Rouge de Congo
- **µm** : Micromètre
- **YMA** : Yeast mannitol agar
- **YMB** : Yeast mannitol broth
- **GPA** : Glucose peptone agar
- **PGPR** : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Introduction

Introduction

La rhizosphère est une partie de sol influencée par des microorganismes et des exsudats racinaires. Dans cette région se trouvent des communautés microbiennes telles que les rhizobactéries qui présentent un groupe de bactéries du sol favorisant la croissance des plantes (PGPR) (**kaur et al., 2016**). Ces dernières ont la capacité de coloniser la surface racinaire jouant un rôle crucial pour la plante par l'augmentation de la fertilité du sol, la stimulation de la croissance et l'inhibition des organismes pathogènes. Il s'agit par exemple de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, et *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (**Banerjee et Heidjan, 2022**).

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones connues par leur haute teneur en protéines. Elles constituent la troisième plus grande famille des plantes à fleurs (**Caroline, 2017**). La relation symbiotique entre la fève et le genre *Rhizobium* est un exemple classique du mutualisme dans le monde végétal (**Boyardieu, 1991**). Cette symbiose aboutit à la formation de petites vésicules appelées les nodules qui apparaissent sur les radicelles de la plante qui permettent de convertir l'azote atmosphérique en ammoniac utilisé par la plante pour son développement et sa croissance (**Patricia, 2004**).

La fixation d'azote atmosphérique joue un rôle crucial dans différents secteurs agronomique, écologique et agricole. Avec l'azote se forment les acides aminés qui présentent la base d'anabolisme des protéines. Il permet aussi la diminution d'utilisation des engrais chimiques en enrichissant naturellement le sol en azote donc la réduction des impacts négatifs causés par la production des engrais chimiques (**Shetta et al., 2011**).

Les *Rhizobium* ont montré un véritable potentiel de plusieurs activités enzymatiques nécessaires pour le fonctionnement des écosystèmes en permettant aux bactéries d'assurer les différentes fonctions de fixation, de minéralisation, de dégradation des matières organiques et de production d'énergie. Parmi les enzymes hydrolytiques clés produites par *Rhizobium*, il y a les cellulases, les amylases, les protéases et les lipases (**Raoul, 2013**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui avait pour but l'isolement, l'identification des souches de *Rhizobium* et surtout la recherche de ses activités enzymatiques.

Introduction

Notre étude s'est divisée en quatre grandes parties : la première partie concerne la symbiose entre *Rhizobium*-légumineuse et le processus de nodulation,

la deuxième concerne les activités enzymatiques, une troisième partie où nous avons exposé les méthodes d'étude des *Rhizobia* impliquant leur isolement, identification et leur production d'enzymes hydrolytiques, la dernière partie a concerné les résultats obtenus et leurs discussion.

La partie Bibliographique

Chapitre I :

Symbiose

Rhizobium-légumineuses

I. La rhizosphère

I.1. Définition :

La rhizosphère a été introduite pour la première fois en 1904 par le microbiologiste visionnaire Hiltner, qui a remarqué que ce volume de sol jouait un rôle unique dans la régulation de la santé et la nutrition des plantes (**Philippe, 2010**).

La rhizosphère est une partie de sol où se trouve le système racinaire des végétaux (**Malak, 2020**). Elle représente un bon habitat pour le développement des différents microorganismes (**kaur et al., 2016**).

Les phylums procaryotes de la rhizosphère sont les protéobactéries, les actinobactéries, les Bactéroïdètes, les firmicutes et les acidobactéries. Sur le plan des phylums fongiques, la rhizosphère est dominée par les Acomycota et les Basidismycota, qui sont aussi les phylums taxonomiques les plus fréquents dans le sol (**Banerjee et Heijden, 2022**).

I.2. *Rhizobium* :

I.2.1. Taxonomie de *Rhizobium* :

Le terme « Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol capables d'induire des nodules sur les légumineuses et fixer l'azote atmosphérique (**Zakhia et Philippe, 2006**). La famille des *Rhizobiaceae* est une vaste famille de plusieurs espèces de « rhizobia » qui compte actuellement 19 genres et 181 espèces avec des noms décrits (**Tengfei et al., 2023**). Sur le plan phylogénétique, elles font partie de la subdivision alpha des protéobactéries. Lorsque qu'il a été admis que le spectre d'hôtes n'était pas le seul critère à considérer pour la classification des *Rhizobium*, les espèces de *Rhizobium* ont d'abord été divisées en deux genres, le genre *Rhizobium* révisé incluant les souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium* qui a été créé pour ceux à croissance lente (**Zakhia et Philippe, 2001**).

Le nombre exacte d'espèces des *Rhizobia* n'est pas fixe et des nouvelles espèces étant régulièrement découvertes et décrites. On prend comme exemple les espèces suivants : *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Pararhizobium* et *Allorhizobium* (**Banerjee et Heidjan, 2022**).

La classification taxonomique des *Rhizobia* d'après Jean et ses collaborateurs (2006) est :

- **Phylum** : *Proteobacteria*
- **Classe** : *α-proteobacteria*
- **Ordre** : *Rhizobiales*
- **Famille** : *Rhizobiaceae*
- **Genre** : *Rhizobium*

I.2.2 Caractères morphologiques :

C'est une bactérie du sol, en forme de bâtonnet à Gram négatif, mobile et non sporulant (**Jordan, 1984**).

Cette bactérie est répartie en deux formes (**Hoben et Somasegaram, 1994**) :

- **La forme végétative** : Elles sont présentes sous forme des bâtonnets réguliers de 1.2 à 3 µm de longueur sur 0.5 à 0.9 µm de large (figure 1).
- **La forme bactéroïde** : Quand elles sont à l'intérieur des nodules, elles se transforment en bactéroïdes de formes régulières ou irrégulières.



Figure 1 : Observation microscopique des *Rhizobia*

I.2.3 Caractères culturaux :

Sur le milieu solide YMA (Yeast Mannitol Agar), la bactérie présente des grandes colonies circulaires surélevées, brillantes, d'un blanc laiteux, avec une texture du mucoïde bien visible (Almihyawi et al., 2024). Il existe deux formes différentes de *Rhizobium* selon la vitesse de croissance sur les milieux liquides YMB (Amrani et al., 2010) :

- **Une croissance rapide** : La turbidité du milieu apparaît après 2 à 3 jours d'incubation.
- **Une croissance lente** : L'apparition d'un trouble dans le milieu liquide après 5 à 7 jours d'incubation.

I.2.4. Caractères biochimiques :

Cette bactérie a la capacité d'utiliser certains carbohydrates tels que le saccharose, le glucose et le mannitol (Legesse, 2016). Elle a la capacité de synthétiser des enzymes catalase, et oxydase. De plus, elles sont négatives pour l'utilisation du citrate, la synthèse de l'uréase et la gélatinase (Shree et al., 2020). En plus, ces bactéries ont la capacité de réduire le nitrate provenant de l'atmosphère, en nitrite qui est l'un des caractères biochimique les plus intéressants de *Rhizobium* (Gachande et khansola, 2011). Ces caractères biochimiques peuvent être résumés comme suit (tableau 1) :

Tableau 1 : Caractères biochimiques des *Rhizobium* (Gachande et Khansola, 2011, Legesse, 2016, Shree et al., 2022).

| Tests biochimiques | Résultats |
|------------------------|-----------|
| Catalase | Positive |
| Oxydase | Positive |
| Utilisation du citrate | Négative |
| Uréase | Négative |
| Gélatinase | Négative |
| Glucose | Positive |
| Saccharose | Positive |
| Mannitol | Positive |
| Réduction des nitrates | Positive |

I.2.5. Caractères physiologiques :

Les *Rhizobia* sont des bactéries aérobies ou microaérophiles qui peuvent croître dans une faible concentration d'oxygène. La température optimale de croissance est de 28°C et le pH est de 6 à 7 avec la présence des souches acidophiles qui peuvent tolérer des écologies acides (pH=4) tel que *Rhizobium japonicum* (Legesse, 2016).

I.3. Les PGPR :

I.3.1. Définition :

« Plant Growth promoting bacteria » ou les PGPR, ce sont des micro-organismes qui habitent librement dans le sol. Leur présence favorise l'enracinement des plantes que ce soit de manière directe ou indirecte (Kaur et al., 2016). A la fin des années 1970, Klooper a introduit le concept des PGPR, en les décrivant comme « des bactéries vivantes présentes dans le sol qui colonisent

ou incorporent les racines des plantes et favorisent leur croissance (figure 2) (Mohsin et al., 2017).

Les PGPR regroupent plusieurs genres, les plus connus sont : *Rhizobium* , *Anabeana*, *Acetobacter* , *Bacillus megaterium*, *Azolla*, *Pseudomonas* et *Bacillus polymyxa* (Sarhani et yahaya, 2022).



Figure 2 : Association des PGPR sur les racines de plantes (Bhat et al., 2023)

I.3.2. Rôle des PGPR :

Les bactéries du genre rhizobium peuvent agir comme des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et renforçant leurs protections contre plusieurs agents biotiques et abiotiques (Fahde et al., 2023) .

Les PGPR ont suscité une grande attention dans l’agriculture et l’horticulture en raison de leur potentiel à accroître la production agricole, l’absorption des nutriments et la résistance aux maladies tout en diminuant le besoin d’engrais chimiques et de pesticides (Tripathie et al., 2024).

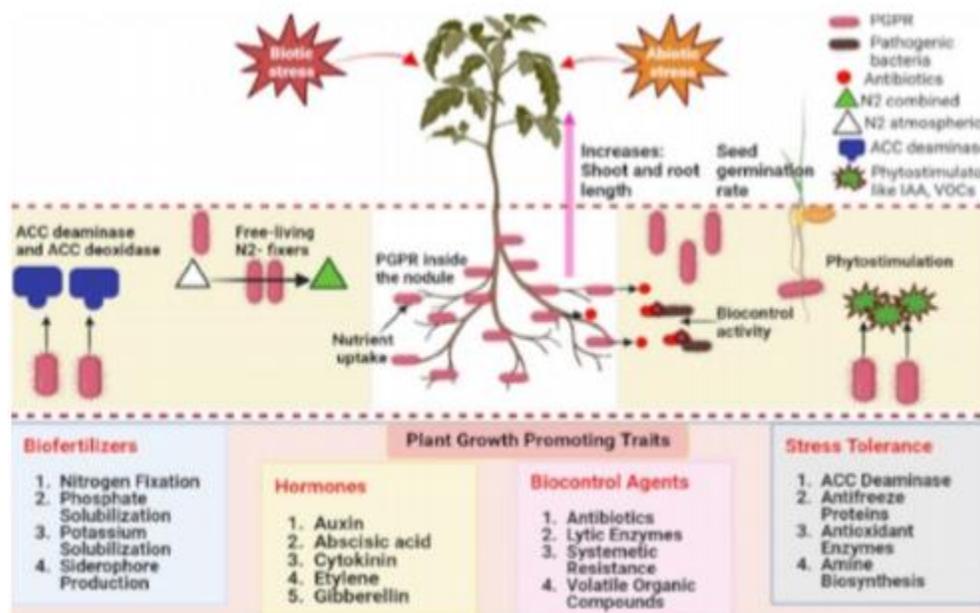
Les PGPR favorisent directement la croissance des plantes en augmentant la disponibilité des nutriments grâce à diverses actions directes telles que la fixation de l'azote, et la solubilisation des minéraux (Hyder *et al.*, 2023).

D'autres avantages indirects des PGPR comprennent la synthèse des composés antibiotiques, et la libération des enzymes protectrices (Marco *et al.*, 2022).

Les PGPR contribuent à l'adaptation et l'ajustement rapide des plantes au stress de la sécheresse (Enebe et Babalola, 2018). Ils améliorent la réponse photosynthétique des plantes inoculées et la capacité d'échange gazeux des feuilles pendant le stress (Verma *et al.*, 2024).

Les PGPR produisent divers types d'enzymes telles que la lipase, la protéase, la déshydrogénase et la chitinase, cette dernière est libérée par les rhizobactéries et peut briser la paroi cellulaire des champignons en dégradant la chitine qui est le principal constituant de ses parois (Hyder *et al.*, 2023).

En plus, la présence des bactéries rhizobium en particulier associée à des légumineuses entraîne une fixation symbiotique qui apporte des quantités importantes d'azote au sol, pouvant atteindre plusieurs centaines de kilos par hectare (Poullais *et al.*, 2013).



**Figure 3 : Mécanisme d'interaction des PGPR avec leurs plante hôte
(Bhadresh et al.,2023).**

II. Les légumineuses :

II.1 Généralités :

Les légumineuses, une famille vaste comprenant plus de 18000 espèces sont des plantes dicotylédones reconnues pour leur haute teneur en protéines, ce qui les rend important dans l'alimentation humaine et animale (Caroline, 2017). Dans l'agriculture, on distingue deux catégories principales : les légumineuses fourragères (tels que la luzerne et les trèfles) et les légumineuses à graines (comme les haricots, le pois et la fève) (Jean, 2017).

II.2 Intérêt des légumineuses :

Elles renferment une importante quantité de glucides et de protéines, dépassant même les céréales et rivalisant avec la viande et le poisson. Elles sont également riches en fibres, tant solubles que totales, ainsi qu'en vitamines B et minéraux, ce sont des constituants indispensables d'une alimentation équilibrée et saine (Valérie et al., 2010).

De 2008 à 2012, selon les données de la fédération nationale de légumes secs (FNLS), la production mondiale annuelle de légumes secs à l'exception du soja, s'élevait en moyenne à 72,5 millions de tonnes. Les légumineuses à graines hors soja, ont enregistré une croissance de plus de 50 % entre 1980 et 2010 de plus de 50 % entre 1980 et 2010 (Caroll, 2001).

II.3. La fève :

II.3.1. Description de la fève :

La fève (*Vicia faba*) est une plante annuelle cultivée en hiver qui appartient à la famille des légumineuses les plus anciennes dans le monde. Les principaux producteurs sont les pays méditerranéens, l'Égypte, l'Éthiopie, la Chine, l'Inde, l'Afghanistan, l'Afrique du Nord et l'Europe (kuldeep et al., 2021, Tanno et al., 2021).

La fève présente des tiges simples non ramifiées, creuses et de section quadrangulaires d'une hauteur de 30 jusqu'à 80 centimètres (**Boyeldieu, 1991**).

Ses fleurs sont blanches avec des grandes taches noires. Ses fruits sont des grandes gousses vertes de 25 à 30 cm de longueur et contiennent 4 à 8 graines ovales et aplaties, couvertes d'une peau épaisse (figure 4) (**krimi et al., 2021**).

Les feuilles de la fève sont pointues et disposées l'une en face de l'autre sur la tige. Elles ont une longueur moyenne de 5 à 9 cm, une largeur de plus de 2 à 2.5 cm et ont généralement une couleur allant du vert foncé au vert clair (figure 5) (**Garip et Gülay, 2020**).

La fève possède l'un des plus grandes génomes parmi les légumineuses cultivées et est diploïde comprenant $2n = 12$ chromosomes et un grand génome de 13000 Mb (**Zhao et al., 2023**).



Figure 4 : Présentation schématique des différents composants de la fève (Saikat et Epsita, 2021)



Figure 5 : La partie aérienne de la fève

(<http://lelaurier.canalblog.com/archives/2014/05/18/29894172.html>)

III. Fixation biologique de l'azote :

III.1 Définition :

L'azote est l'élément le plus abondant dans la planète et constitue 78% de l'atmosphère terrestre (Nag *et al.*, 2019). Il est considéré comme un élément critique pour le développement des plantes (Carroll, 2001). L'azote joue un rôle essentiel pour les plantes. Il est inclus dans la composition de tous les acides aminés, donc de toutes les protéines, de certains pigments de nombreux composés hétérocycliques et de métabolites secondaires qui jouent un rôle essentiel dans l'équilibre agro-socio-environnemental des végétaux (Christian, 2011).

III.2. Fixation symbiotique de l'azote :

Il existe de nombreuses genres qui fixent l'azote atmosphérique dans le sol et le rendent disponibles aux plantes telles que : *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* (Michael, 2014).

La contribution la plus importante de fixation de l'azote est représentée par l'association symbiotique entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses (Emma et Philip, 2003). Cette association symbiotique apporte des quantités importantes d'azote au sol, pouvant atteindre plusieurs centaines de kilos par hectare (Poullais *et al.*, 2013).

Ces bactéries réduisent l'azote de l'air atmosphérique en ammoniac grâce à un système enzymatique à l'intérieur de leurs cellules, qui à son tour se combine avec les acides organiques résultant de la décomposition de la matière organique formant des acides aminés qui en bénéficient (Shetta *et al.*, 2011).

La nitrogénase est une enzyme labile à l'oxygène très sophistiquée retenue chez les diazotrophes symbiotiques libres, elle est responsable de la transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac (Khosro *et al.*, 2024). La glutamine synthetase incorpore rapidement l'ammonium formé au glutamate pour créer la glutamine, qui est la source de l'azote aminé (Gaudri, 2013).

Il est essentiel que les partenaires symbiotiques (*Rhizobium*-légumineuse) établissent un dialogue moléculaire en plusieurs étapes lors de la colonisation des rhizoplasmes, de l'infection, de l'organogénèse des nodules et de la sénescence. Cela constitue un cycle de vie facultatif caractéristique des microsymbiotes (figure 6) (Liu *et al.*, 2023).

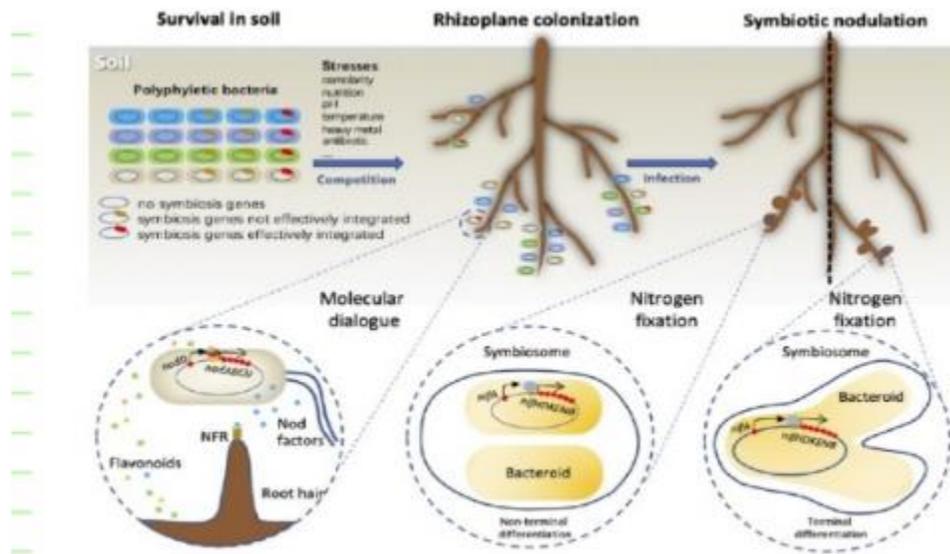


Figure 6 : Le dialogue moléculaire entre les *Rhizobiums* et légumineuses (Liu *et al.*, 2023)

III.3. La nodulation :

III.3.1. Définition :

Les nodules ou bien nodosités sont des petites vésicules qui se trouvent dans les racines des légumineuses (Figure 7). Elles sont le résultat d'une colonisation par d'autres types de bactéries très communes dans le sol qui appartiennent généralement au genre *Rhizobium* (Patricia, 2004).

Ces derniers, abritent les symbiontes bactériens et leur fournit les conditions requises pour leur activité de fixation de l'azote. En plus, elles sont considérées comme un siège des échanges nutritifs entre les deux partenaires (pante-bactéries) (Jean *et al.*, 2010).



Figure 7 : Nodosités sur les racines de trèfle (Breton, 2015)

III.3.2 Les étapes de nodulation :

III.3.2.1 La pré-infection

La reconnaissance entre *Rhizobium*/légumineuse est la première étape vers la mise en place de la symbiose qui est influencée par l'expression des gènes NOD bactériens par les flavonoïdes (Issa *et al.*, 2022) ;

qui sont présents dans les exsudats de racine des légumineuses et agissent comme des signaux chimio tactiques envoyés aux rhizobia dans des conditions de faible teneur en azote (Sonal *et al.*, 2019).

III.3.2.2. Infection:

Cette étape débute lorsque les bactéries pénètrent dans les poils racinaires déformés (Issa et al., 2022). Ce stade est suivi par l'apparition et l'extension des cordons d'infection qui sont des structures tubulaires dérivées de la plante (Benjamin et al., 2014).

Le microsymbionte est orienté vers le primodorum nodulaire grâce à ces cordons, qui traversent les cellules épidermales et corticales. Des organes semblables aux symbiosomes abritent les bactéries qui se divisent en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique (Eduardo, 2004).

Selon Joelle (2015), les bactéries symbiotiques principalement rhizobium peuvent pénétrer dans les cellules racinaires par voie intracellulaire grâce aux lamelles moyennes des cellules épidermales.

III.3.2.3 Développement des nodules :

La déformation des cordons d'infection chez rhizobium commence au niveau de cortex. La décision cellulaire entraîne la formation d'un primodorum nodulaire où les bactéries sont régulées (Figure 8) (Daniel et Williams, 2000). Les *Rhizobia* se différencient en bactéroïdes à l'intérieur du nodule, séparés du cytoplasme de cellules végétales par la membrane péri-bactérienne (Carole et al., 2013).

Après la division, les bactéroïdes produisent la nitrogénase et permet d'activer la capacité de fixer le N₂ (Sonal et al., 2019). La majorité de l'ammonium produit par la fixation symbiotique de l'azote est utilisé par les nodosités pour la synthèse des acides aminés, qui se déplacent ensuite dans le xylème pour se rendre dans le système calaminé.

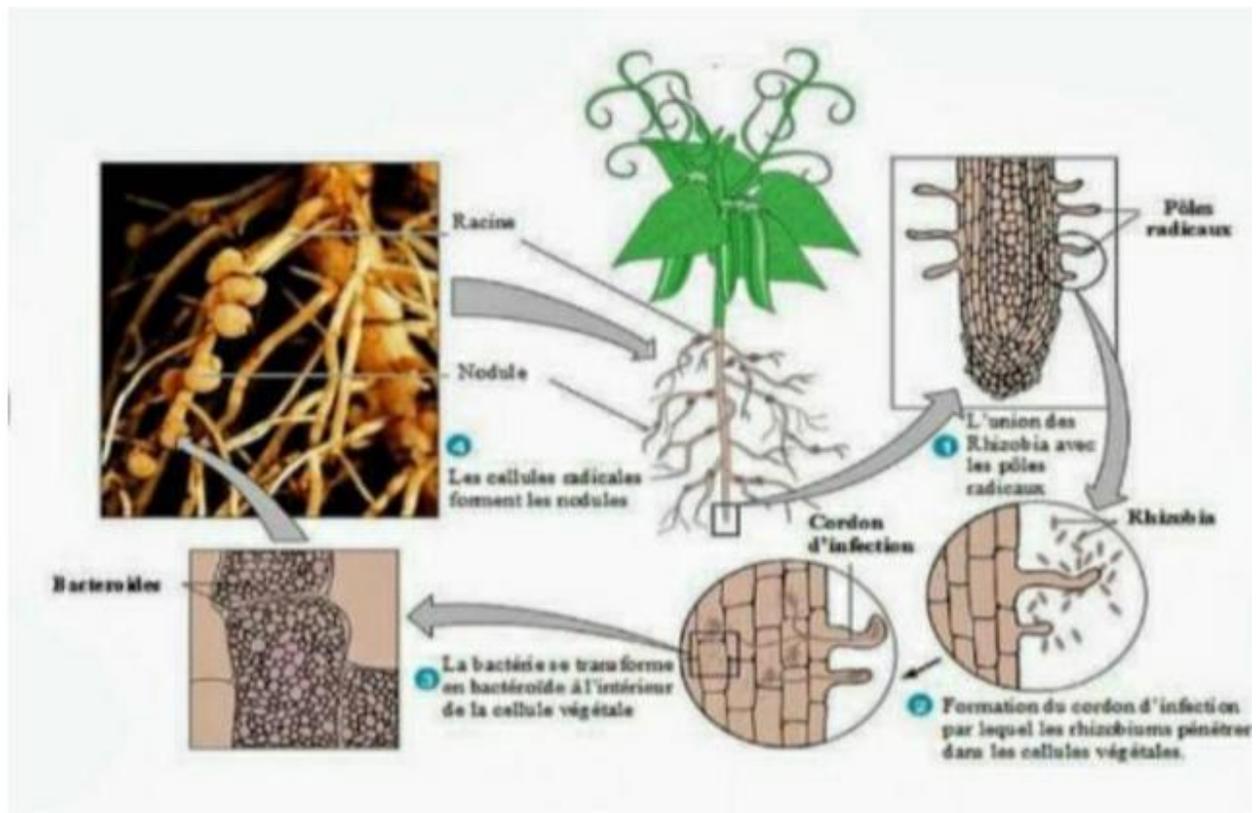
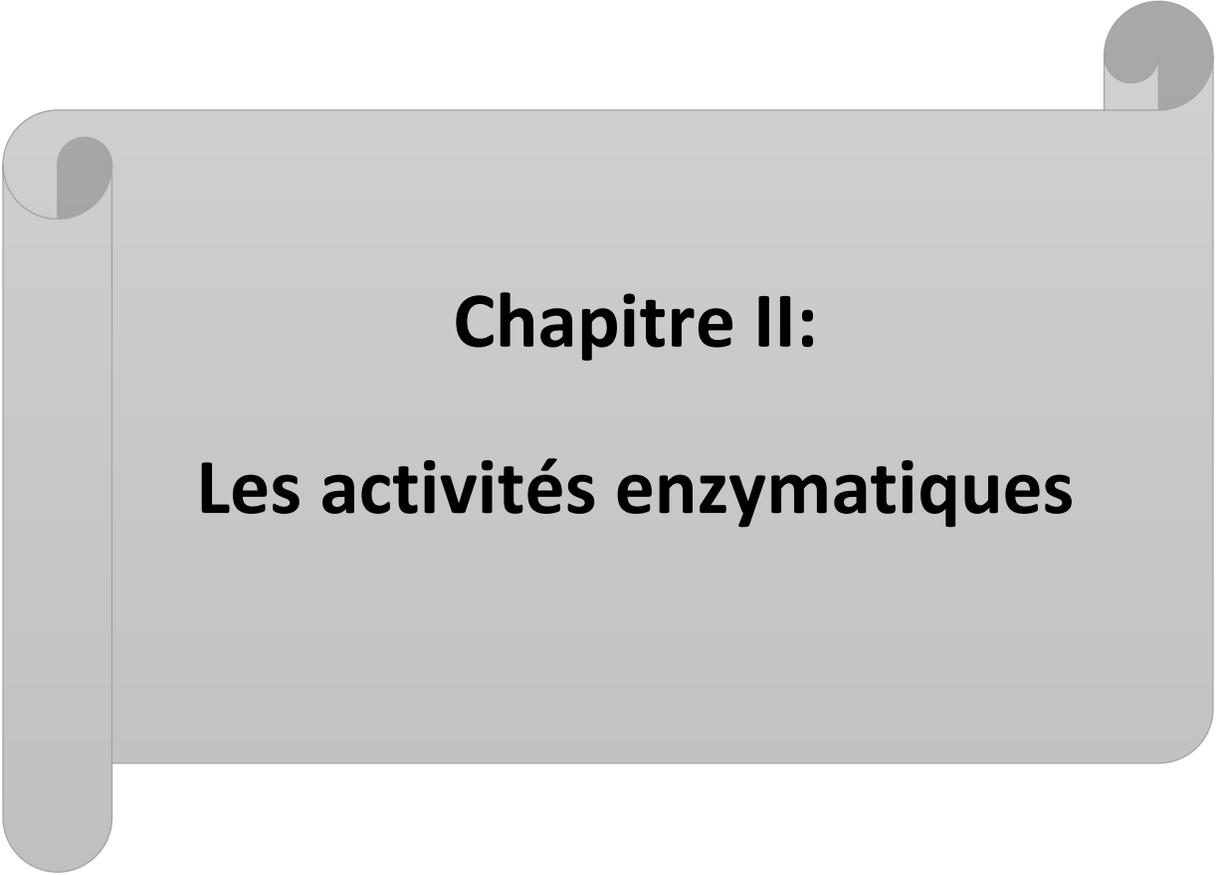


Figure 8 : Les différentes étapes de l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Faghir, 2012)



Chapitre II:
Les activités enzymatiques

I. Généralités :

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique catalysant les différentes réactions biochimiques. Il s'agit de catalyseurs particuliers, ce qui signifie qu'une enzyme spécifique ne peut catalyser qu'une réaction chimique précise. Ce sont des molécules fragiles influencées par la chaleur, la haute pression, et les radiations. Les enzymes alimentaires sont obtenues de diverses sources soit de plantes, d'animaux ou de micro-organismes (**Xavier, 2023**). Les enzymes microbiennes sont privilégiées par rapport aux sources végétales et animales en raison de leur économie de production, de leur texture, de leur facilité de modification et de leur optimisation. Elles présentent une stabilité relativement plus élevée que les enzymes provenant de végétaux ou d'animaux. En outre, elles proposent une plus grande variété d'activités catalytiques, et la majorité des enzymes utilisées dans l'industrie sont d'origine microbienne (**Raoul, 2013**).

II. Classification des enzymes :

Selon la classification internationale des enzymes les réactions et les enzymes qui les catalysent sont divisés en six classes définis par le type de réaction catalysée (tableau 2).

- **Les oxydoréductases** : elles catalysent les réactions d'oxydoréduction par le transfert des électrons.
- **Les transférases** : responsables de transfert des groupements fonctionnels.
- **Les hydrolases** : réactions d'hydrolyse par l'addition d'une molécule d'eau, par exemple : les estérases, lipases, uréases
- **Les lyases** : la coupure des molécules C-C, C-O, C-N et l'addition des doubles liaisons aux autres molécules.
- **Les isomérases** : Elles catalysent l'isomérisation des molécules.
- **Les ligases** : les ligases couplent l'hydrolyse de l'ATP (**Raoul, 2013**).

Tableau 2 : Classification des enzymes (Hames et al., 1999)

| no | Nom de classes | Types de réaction catalysée | Exemples |
|----|-----------------|--|------------------------|
| 1 | Oxydoréductases | Transfert des électrons | Alcool déshydrogénase |
| 2 | Transférases | transferts de groupements fonctionnels | Hexokinases , trypsine |
| 3 | Hydrolases | Réaction d'hydrolyse | Pyruvate |
| 4 | Lyases | Clivage de C-C, C-O ,C-N et d'autres liaisons formant souvent une double liaison | Décarboxylase |
| 5 | Isomérase | Transfert de groupes à l'intérieur de molécules | Maléate isomérase |
| 6 | Ligase | Couplée à l'hydrolyse de l'ATP | Pyruvate décarboxylase |

III. Production d'enzymes :

III .1 Activité amyliques:

L'amylyase est une enzyme essentielle qui joue un rôle crucial dans le domaine de la biotechnologie. Elle est extraite principalement à partir des microorganismes et utilisée dans de nombreuses industries (Subash et al., 2017).

Les amylyases sont classées en alpha-amylyase, Béta-amylyase et gluco-amylyase en fonction de leurs structures tridimensionnelles et de leurs mécanismes de réaction (Figure 9). Elles peuvent être dérivées de différentes sources comme les plantes, l'animal et les micro-organismes (Pandey et al., 2000).

La production d'amylyase a considérablement augmenté en raison des propriétés hydrolysantes de l'amidon et l'utilisation des matières premières disponibles et peu coûteuses (Syriya et al., 2016).

Elle est utilisée dans l'alimentation, les détergents, les produits pharmaceutiques ainsi que dans les industries du papier et du textile (Vinhineu et al., 1989).

Les amylases jouent également un rôle important dans le brassage de bière et des liqueurs à partir des sucres à base d'amidon (**Subash et al., 2017**).

Toutes les souches de *Rhizobium* pourraient produire des protéines extracellulaires, de biomasse d'amylase avec des différents types de substrats carbonés. Le maltose était le meilleur substrat pour la production de protéine et d'amylase (**Oliviera et al., 2007**).

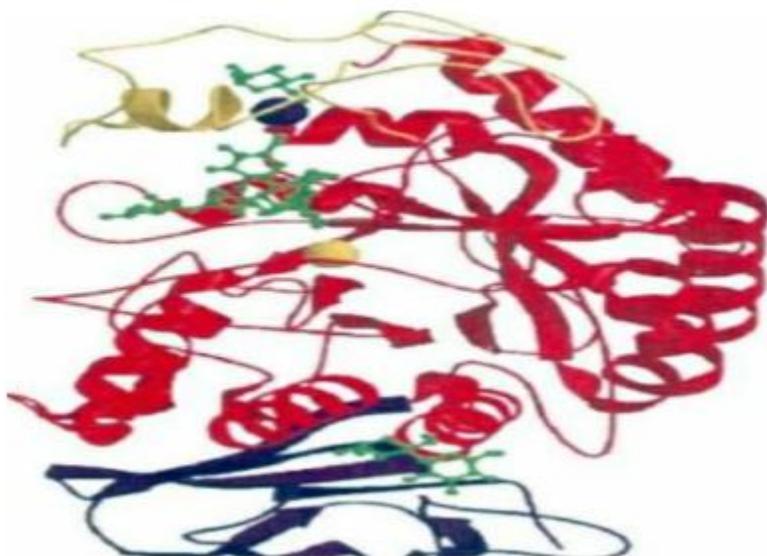


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de alpha amylase (Roglaski et Allison, 2007)

III.2. Activité protéolytique :

Les protéases représentent l'un des trois grands groupes d'enzymes industrielles et représentent environ 60% des ventes mondiales d'enzymes. Selon le comité de nomenclature de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, elles font partie des enzymes de troisième classe, les hydrolases, et de la sous-classe 3.4, les peptidases ou hydrolases peptidiques. Les protéases sont regroupées en deux grandes classes selon leur site d'action : les exopeptidases et les endopeptidases (**Jermen et Fassil, 2018**).

Les protéases sont produites par des microorganismes, des plantes et des animaux. Les protéines bactériennes occupent la place la plus importante en raison de leurs applications industrielles.

Elles sont utilisées dans les produits de nettoyage, du cuir, l'alimentation, du textile, ainsi que dans les procédés de récupération de l'argent et de bioremédiation (**Lòpes-Otin et Bond, 2008**).

III.3 Activité cellulosique :

La cellulose est un polymère de bêta glucose qui présente le composant structural le plus important de la paroi cellulaire primaire des plantes vertes. Ce dernier est catalysé par l'enzyme cellulase (**Jean et al., 2010**).

Les cellulases représentent un groupe d'enzymes complexes composé de trois types nécessaires à l'hydrolyse totale de la cellulose : ce sont l'endoglucanase (EC 3.2.1.91) l'exoglucanase (EC 3.2.1.91) et la bêta glucosidase (EC.3.2.1.21). Elles sont produites à partir des différentes sources soit par des bactéries (ex. *cellvibrio*, *cytophaga*...), par de nombreux champignons et aussi par quelques protozoaires et mollusques (**Jean et al., 2010**).

La production de cellulose bactérienne par *Rhizobium* sp et sa modification avec de la nisine pourrait être utilisée dans diverses industries telles que l'industrie textile par l'élimination des excès de fibres et l'amélioration de la qualité des produits finis, l'industrie alimentaire en facilitant la macération des fruits et des légumes, l'industrie du papier pour l'amélioration de la qualité du papier en réduisant la teneur en lignine. En plus, les celluloses ont un rôle crucial dans la biotechnologie, la médecine et l'agriculture (**Almihyawi et al., 2024**).

III.4 Activité uréasique :

L'uréase est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniacque et en dioxyde de carbone (**Iwona, 2012**).

Elle a été la première enzyme cristallisée et identifiée comme une protéine. Cette dernière a été découverte environ 50 ans après sa cristallisation comme le premier exemple de métalloprotéine à base de nickel (**Zerner, 1991**).

C'est un catalyseur très efficace pour l'hydrolyse de l'urée avec une vitesse environ de 10 à 14 fois supérieure à la vitesse de la réaction non catalysée (**Havey, 2001**).

L'uréase est produite par des plantes, des champignons, et certains vertébrés (Mobley, 2001). Elle a été utilisée comme un test de fertilité, ainsi que pour l'identification taxonomique, l'agriculture et le traitement médical (**Yingjie, 2002**).

La Partie

Expérimentale



Matériel et méthodes

Matériel et méthode

1. Isolement des bactéries à partir des nodules :

1.1 Description de la zone d'étude :

Notre étude a été effectuée sur trois sites du Nord de la wilaya de Tlemcen : Beni Ouarsous (P1), Remchi (P2) et Bourj Arima (P3) (figure 10) où un prélèvement des échantillons de la plante de *Vicia faba* a été fait.

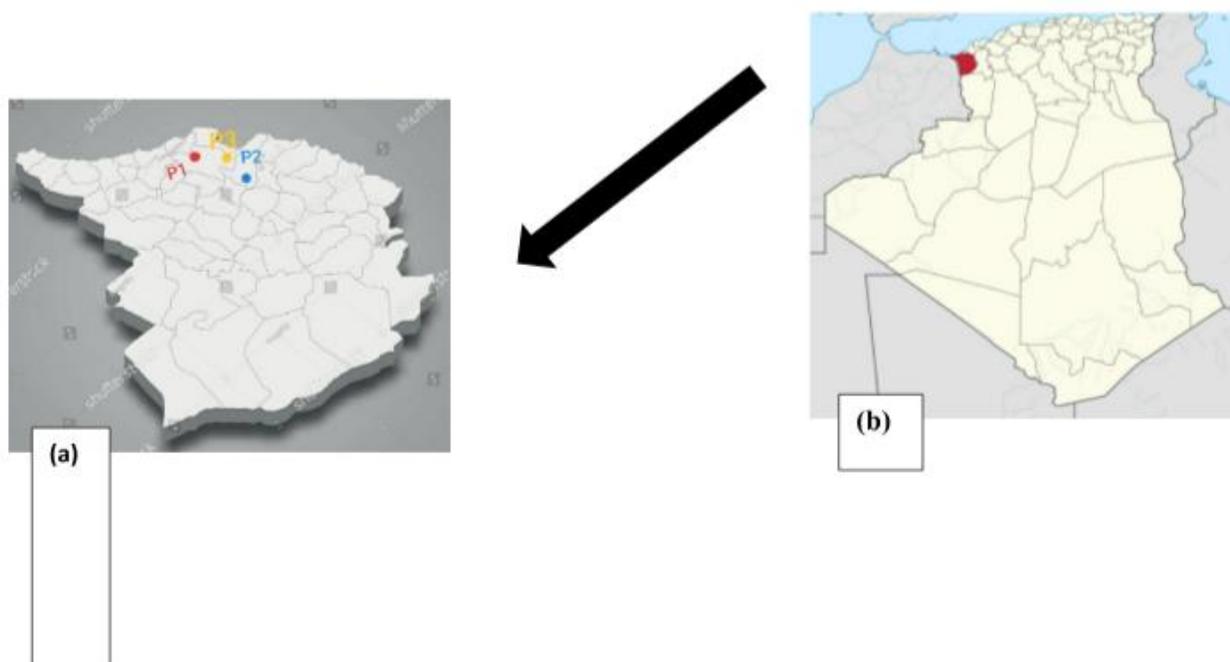


Figure 10 : Localisations géographiques des sites de prélèvement (a) : localisation des P1, P2 et P3 à la Wilaya de Tlemcen / (b) Localisation de Tlemcen en Algérie.

1.2 Collecte des plantes :

La collecte des plantes a été effectuée durant le mois de février. A cette période d'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines. Il s'agit de creuser environ 20 cm dans le sol pour extraire les plantes et ses appareils racinaires en évitant la destruction des nodules (figure 11).

Matériel et méthode



Figure 11 : La zone de prélèvement (photo personnel)

1.3. Prélèvements des nodules :

La partie aérienne a été détachée de la partie racinaire de la plante. Puis, les racines ont été lavé doucement avec leurs nodules à l'eau de robinet afin d'éliminer tous les restes du sol. Ensuite, les nodosités de 1 à 2 mm sont détachées à l'aide de ciseaux puis séchées délicatement avec un papier absorbant.

1.4. Stérilisation des nodules :

Les nodules ont été lavés délicatement plusieurs fois dans l'eau distillée stérile. La surface des nodules a été stérilisée en immersion à 70% d'éthanol pendant 5 min puis dans l'hypochlorite de sodium (2%) pendant 2 min. Ensuite, ils ont été rincés successivement dix fois dans l'eau distillée stérile (Figure 13) (Mabiala *et al.*, 2021).



Matériel et méthode

Figure 12 : La stérilisation des nodules (photo personnel)

1.5. Écrasement des nodules :

En utilisant une paire de pinces à pointe émoussée, les nodules stérilisés ont été découpés de manière superficielle dans une grande goutte d'eau stérile dans une boîte de Pétri. Ensuite, les nodules sont écrasés dans des tubes à essai stériles avec une pipette Pasteur stérile.

1.6. Les milieux de cultures utilisés :

- Dans cette étude nous avons préparé les milieux de cultures suivants (**Legesse, 2016**).
- **YMA (Yeast Mannitol Agar)** : c'est un milieu solide spécifique pour l'isolement des bactéries *Rhizobium* (Annexe 1) (Figure 13).
- **YMA + RC** : c'est le milieu YMA (annexe 1) additionné de 10 mL de solution rouge de Congo (Annexe 2) (Figure 13).
- **YMA + BTB** : consiste à ajouter des solutions de bleu de bromothymol (Annexe 1) avec le milieu YMA (Annexe 1).
- **Milieu GPA** : c'est un milieu utilisé pour différenciation entre les *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Annexe 1).



Figure 13 : Les milieux de cultures utilisées (photo personnel)

Matériel et méthode

1.7. Isolement et purification des isolats :

Une suspension de chaque nodule écrasé a été étalée sur un milieu solide YMA (annexe 1) afin de distinguer des colonies simples, ce qui facilite leur caractérisation. L'incubation de ses derniers, a été faite à une température de 28°C pendant 3 jours. Après incubation, les colonies de même aspect ont été repiquées afin de les purifier puis les ensemercer sur d'autres boîtes contenant le milieu de culture YMA (Annexe 1).

2. caractères morphologiques :

2.1. Examen macroscopique :

L'observation macroscopique des colonies a été basée sur plusieurs paramètres tels que la morphologie, la texture et le diamètre des colonies.

2.2. Examen microscopique :

2.2.1. Etat frais :

- Prélever une trace de culture pure sur milieu solide YMA (Annexe 1) à l'anse de platine.
- Ajout de paraffine et couvrir avec la lamelle.
- Émulsionner sur une lame en verre contenant une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique.
- Observer au microscope optique (G×40) (Denis et al., 2016) .

2.2.2. Coloration de Gram :

La coloration de Gram a pour but de catégoriser les bactéries à Gram positif et négatif en se basant sur leur morphologie et leurs caractéristiques différentielles. Cet examen a été fait en suivant les étapes de coloration (Annexe 3) (Putrie et al., 2016). L'Observation a été faite au microscope optique à l'objectif ×100 à immersion.

2.2.3 Observation au microscope électronique à balayage (MEB) :

Matériel et méthode

Après avoir réalisé des frottis sur lame pour chaque colonie suspecte, nos échantillons ont été observés au microscope électronique à balayage de type Hitachi TM1000 (Département de Physique, Faculté des sciences, Université de Tlemcen).

3. Caractères biochimiques :

3.1 Test de catalase :

La catalase est une enzyme qui se trouve chez la majorité des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle est responsable de la dégradation du peroxyde de l'hydrogène (H_2O_2) en dioxyde et eau.

La recherche de cette enzyme joue un rôle crucial dans la première étape de l'identification d'une bactérie pure. Sur une lame stérile, une goutte d'eau oxygénée a été disposée, puis mise en contact avec la colonie. La présence de catalase (test catalase+) se traduit par le dégagement des bulles d'air (Camille, 2007).

3.2 Test d'oxydase :

L'oxydase est une enzyme qui se trouve dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes et repose sur la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore par l'enzyme phényle diamine oxydase. Le test d'oxydase est réalisé en suivant ces étapes :

- Imbiber une bandelette d'oxydase avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une partie de la souche bactérienne en utilisant une pipette pasteur stérile.
- Étaler sur la surface de la bandelette imbibée.

Après quelques secondes le virage de couleur vers le violet ou bleu foncé indique une réaction oxydase positive, si la bandelette reste incolore c'est une réaction oxydase négative (Camille, 2007).

3.3 Citrate de Simmons :

Matériel et méthode

Le principe de ce test est l'étude d'utilisation des bactéries du citrate comme seule source de carbone. L'inoculation a été faite en prélevant une seule colonie isolée et l'ensemencer par strie sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur fermée puis l'incubée pendant 72 heures à 30°C (Figure 14).

Après incubation, si la bactérie utilise du citrate la coloration du milieu passe du vert au bleu. Si la réaction est négative la coloration de milieu reste verte (Williams, 2009).

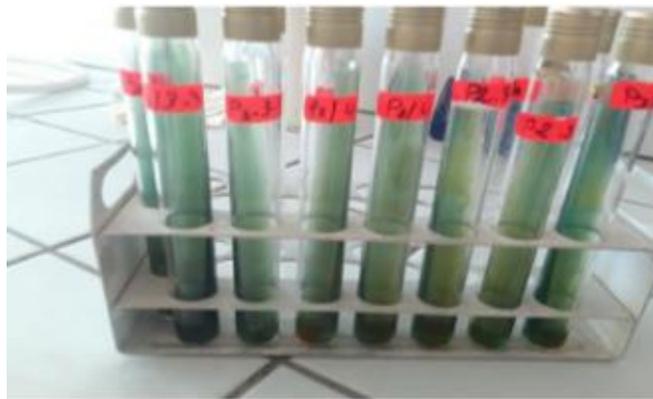


Figure 14 : Test de citrate de Simmons (photo personnel)

3.4 Test de bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des rhizobia à produire de l'acide ou de l'alcalin dans le milieu a été évaluée en utilisant de milieu YMA (Annexe 1) contenant du bleu de bromothymol (BTB) (0.026 p/v) (Annexe 1).

Chacune des souches testées provenant d'un bouillon de 48 heures a été étalée sur le milieu et incubée à 28°C pendant 3 à 7 jours.

Dans le cas d'une acidification on parle de la souche *Rhizobium* à croissance rapide, tandis que dans le cas d'une alcalisation on parle de *Bradyrhizobium Rhizobium* (*Rhizobium* à croissance lente) (Legesse, 2016).

3.5 Test de rouge de Congo (RC) :

Matériel et méthode

La mise en évidence de la production des polysaccharides par la bactérie *Rhizobium* a été effectuée par l'addition de 1% de RC dans le milieu YMA (annexe 1). L'absorption de colorant et la coloration des colonies en rouge sont des indicateurs de leur production (**Ondieki et al., 2017**).

3.6 Test de GPA :

Il s'agit d'un test de confirmation des *Rhizobium*. Des colonies des cultures pures de *Rhizobium* sur YMA (annexe) ont été ensemencées en stries sur milieu solide GPA (annexe) et incubées pendant 5 à 7 jours à une température de 28°C. Si les souches de *Rhizobium* montrent une absence de croissance indique qu'il s'agit au *Rhizobium* car elles n'ont pas la capacité de fournir le carbone à la peptone. Une modification de la couleur du milieu indique la présence des contaminant tels que *Agrobacterium* (**kbede et al., 2022**).

3.7 Recherche de l'enzyme nitrate réductase :

La nitrate réductase est une enzyme qui permet la réduction de nitrate en nitrite, jouant un rôle essentiel dans le processus de l'assimilation de l'azote. La recherche de cet enzyme consiste à ensemencer 5 ml de bouillon nitraté avec la souche bactérienne et l'incuber à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, ajouter à la culture 3 gouttes de nitrate 1 et 3 gouttes de nitrate 2, ensuite observer la couleur du milieu :

L'apparition d'une couleur rouge indique la présence de nitrite provenant de la réduction des nitrates donc la bactérie est nitrate réductase positive.

En absence de coloration, il faudra ajouter la poudre de zinc, s'il y'a une coloration rouge ceci permet de dire que la poudre de zinc a réduit les nitrates en nitrites donc la bactérie est nitrate réductase négative. En cas d'absence de coloration donc la bactérie est nitrate réductase positive (**Lucinski et al., 2001**).

4. Conservation des souches :

Nous avons utilisé deux méthodes de conservation :

Matériel et méthode

4.1. Conservation à court terme :

Cette technique de conservation implique la préparation et version de la gélose YMA dans des tubes à essai inclinés pour obtenir une pente d'ensemencement. Ensuite, une colonie de la souche pure de *Rhizobium* a été ensemencée sur la surface de la gélose à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes ont été incubés à 28 °C jusqu'à l'apparition de croissance. Après incubation et la croissance des souches, les tubes ont été étiquetés et stockés à une température de 4°C, cette méthode permettra conservation des souches de 1 à 6 mois (Vincent, 1970).

4.2. Conservation à long terme :

Cette méthode permet la conservation des souches pendant plusieurs mois.

- Ensemencer une colonie pure de *Rhizobium* dans des tubes à essai contenant 5 mL de bouillon YMB et les incubés à 28°C jusqu'à l'apparition d'une turbidité.
- Addition de 5 mL d'une solution de glycérol stérile afin d'éviter la congélation des cellules bactériennes.
- Verser le milieu +glycérol dans des tubes à Eppendorf stériles.
- Stockage dans des boîtes spéciales et étiquetées.
- Congélation à une température de -80°C (Shetta et al., 2011).

5. Recherche des activités enzymatiques :

5.1 L'activité amylolytique :

La production de l'amylase a été réalisée en utilisant la gélose nutritive additionnée de 1% d'amidon. L'inoculation a été réalisée par la méthode de touche en déposant la souche bactérienne directement sur la surface du milieu de culture par une simple touche et à raison de quatre répétitions. Après une incubation à 28°C pendant 72h, une solution de Lugol a été dispersée sur toute la surface de la boîte de pétri pendant 5 minutes de contact et l'excès a été retiré.

Matériel et méthode

L'apparition d'une zone claire autour de la colonie indique l'hydrolyse de l'amidon, tandis que la présence d'une couleur bleu indique l'absence de l'activité amylolytique (Oliveira, 2007).

5.2 L'activité cellulosique :

La mise en évidence de l'activité cellulosique a été effectuée par l'ensemencement des isolats sur milieu gélosé GN additionnée de 1% de carboxyméthyl cellulose avec un (pH de 7). Après incubation à 28°C pendant trois jours, une révélation avec une solution de rouge congo à 0.1% pendant 15 minutes suivie par une solution de NaCl (1 M) a été réalisée.

L'apparition d'un halo claire autour de la colonie indique la présence d'une cellulase extracellulaire (Almihyawi et al., 2024).

5.3 L'activité protéolytique :

La recherche de l'activité protéolytique a été réalisée sur deux substrats :

5.3.1 L'hydrolyse de la caséine :

La présence de la caséine a été examinée en ajoutant 10% de lait écrémé stérile dans la gélose nutritive, l'ensemencement des souches bactériennes a été fait par la méthode de touche puis incubées à 28°C pendant 72 heures. Après incubation, l'observation d'une zone claire autour des colonies indique l'hydrolyse de la caséine.

5.3.2 La recherche de gélatine :

Les *Rhizobia* ont été ensemencés sur une gélose nutritive (pH 07) contenant 4g/L de la gélatine bactériologique. Après une incubation de trois jours à 28 °C, la révélation a été faite par addition d'une solution de sulfate d'ammonium.

La présence d'un halo claire autour des colonies signifie la présence d'une activité gélatinase (Baljinder et al., 2008).

5.4 L'activité lipolytique :

5.4.1 Hydrolyse de tween 80 :

Matériel et méthode

La mise en évidence de l'activité lipolytique a été effectuée en ajoutant 1%(v/v) de tween 80 stérile dans le milieu gélosé. Les souches bactériennes ont été inoculées puis incubées pendant 3 à 5 jours à 28°C. Une précipitation blanche autour de la colonie indique la présence d'une activité lipasique (**Francisco *et al.*, 1998**).



Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des isolats :

Les résultats d'isolement des bactéries à partir des nodules de *Vicia faba* après incubation à 28°C ont permis d'obtenir 14 isolats de caractères cultureux identiques (forme et couleur des colonies), ce qui nous a orienté au genre *Rhizobium* (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des prélèvements

| Prélèvement | Nombre de souches |
|-------------|-------------------|
| P1 | 5 |
| P2 | 5 |
| P3 | 4 |

2. Caractères morphologiques :

2.1 Examen macroscopique :

Après une période de croissance de 2 à 3 jours à 28°C, les colonies de *Rhizobium* observées sont généralement de tailles différentes de 1 à 4 mm, d'une forme circulaire irrégulière. Elles ont une couleur blanche laiteuse avec une surface lisse, visqueuses et bombées (figure 15). Ces caractères ont été similaires à celles des autres recherches (**Laurette et al., 2015 et Sahkirov et al., 2023**). Mir et ses collaborateurs (2024), ont démontré que cette viscosité des colonies est due à la production des exopolysaccharides.



Figure 15 : Résultat des *Rhizobium* sur YMA (photo personnel)

Résultats et discussion

2.2 Examen microscopique :

2.2.1 État frais :

Cet examen a été fait au microscope optique (G×40) et permet l'observation des coccobacilles mobiles. Cette mobilité des bactéries est due à des flagelles qui sont présentés au niveau de leur paroi. Cette propriété leurs permet de se déplacer et coloniser des racines et donc contribuer à la fixation symbiotique de l'azote. De plus, elles peuvent construire des relations avec d'autres bactéries soit d'une manière symbiotique telles que les bactéries appartenant aux groupes des PGPR ou de manière compétitive et donc un effet antagoniste contre les bactéries pathogènes qui altèrent les plantes et causent des maladies (El-Haloui et al., 1986).

2.2.2 Coloration de Gram :

Après coloration de Gram, tous les isolats présentent le même aspect caractérisé par une forme des bacilles à Gram négatif (figure 16). Ces résultats ont été démontrés par plusieurs chercheurs et c'est un caractère morphologique commun des *Rhizobium*. La coloration de cette bactérie en rose est due à la composition de leurs paroi qui est composée d'une fine couche peptidoglycane et des lipopolysaccharides qui permet la décoloration du cristal de violet après ajout de alcool et la coloration avec le deuxième colorant la fushine (rose) (Degefu et al., 2018 et Wulandari et al., 2024).

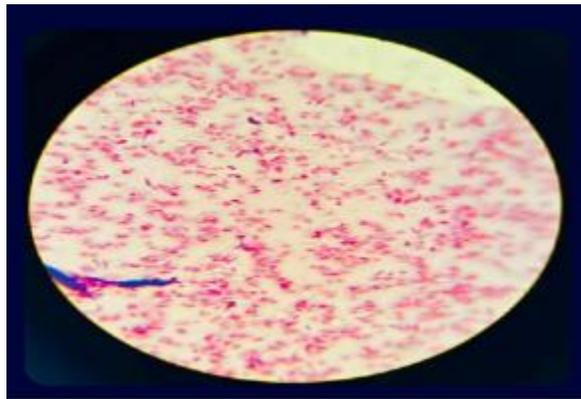


Figure 16 : Résultat de coloration de Gram (G×100) (photo personnel)

Résultats et discussion

2.2.3 Observation au microscope électronique à balayage :

L'observation microscopique MEB a permis d'observer la forme des bactéries révélant la présence de bacilles de formes régulières Figure 17.

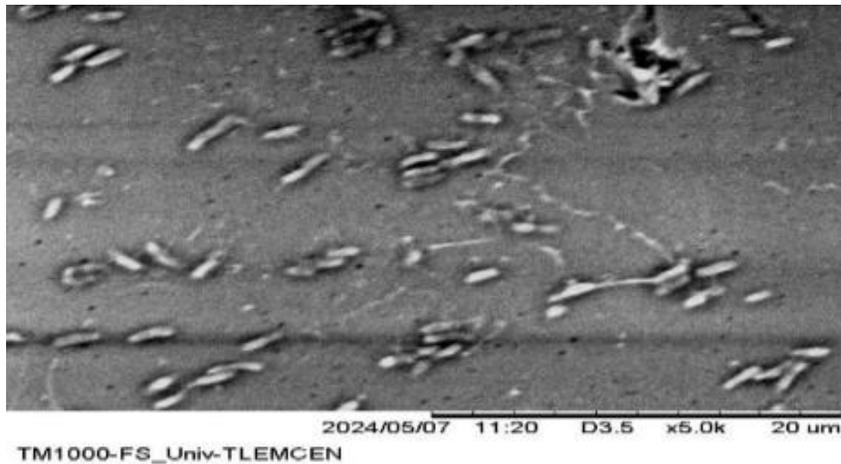


Figure 17 : Observation microscopique MEB (Grossissement X20000) (photo personnel)

3. Tests biochimiques :

3. 1 Test de catalase :

Le test de catalase a démontré une activité catalasique positive déterminée par un dégagement des bulles d'air après l'ajout de H_2O_2 (figure 18). Ce caractère est trouvé chez les bactéries aérobies. Cette enzyme permet aux *Rhizobium* une meilleure tolérance aux stress oxydatif (**Kwon et An, 1999**). Ywan et ses collaborateurs en (2005) ont démontré que les *Rhizobium* utilisent ce métabolisme aérobie avec une phosphorylation oxydative pour synthétiser de l'ATP et des équivalents réducteurs indispensables à la fixation de l'azote et la formation des nodules au niveau des racines.

Résultats et discussion



Figure 18 : Résultat de test de catalase (photo personnel)

3.2 Test oxydase :

Les résultats de ce test ont été observés après le dépôt d'une colonie pure sur une bandelette d'oxydase imbibée. Une couleur bleue a révélé que ces souches sont oxydase positive (figure 19). Ces résultats ont montré que ces bactéries possèdent un enzyme cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire cytochromique (Shree *et al.*, 2022).

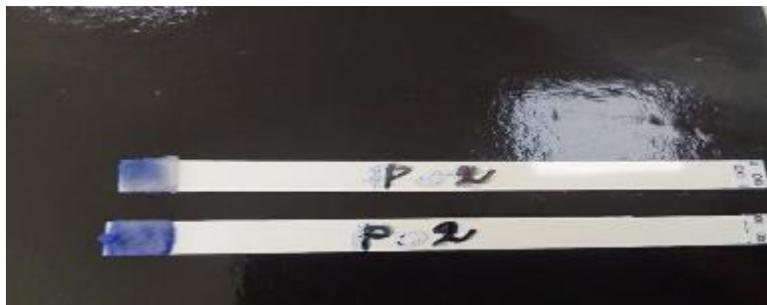


Figure 19 : Résultat de test d'oxydase (photo personnel)

3.3 Test de citrate de Simmons :

Après incubation, aucun changement de couleur de milieu n'a été observé, ce qui signifie que les résultats sont négatifs.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont identiques à ceux de Shree et *al.*, (2022), et c'est un caractère biochimique connu chez toutes les *Rhizobium*, c'est-à-dire elle ne peut pas utiliser le citrate comme une seule source de carbone.

3.4 YMA+BTB :

Les résultats obtenus sur ce milieu ont révélé un virage de couleur de milieu vers le jaune (figure 20) pour certaines souches indiquant l'acidification du milieu c'est-à-dire qu'elles appartiennent aux groupes des rhizobiums à croissance rapide. Shetta et ses collaborateurs (2011) ont confirmé que la production d'acides est un caractère des *Rhizobium* durant la croissance des plantes. Notre résultat ont été similaire à celui présenté par Amrani et son équipe (2009) sur une plante légumineuse. Dans cette étude, ils ont démontré que les *Rhizobium* à croissance rapide sont osmotolérances et ils peuvent noduler des légumineuses qui se trouvent dans des zones chaudes ou pauvres en eaux. Nos échantillons ont été récoltés de différents zones la wilaya de Tlemcen qui est récemment menacée par un changement climatique et une diminution de précipitations ce qui justifie la présence de ce groupe de *Rhizobium* acidifiant et à croissance rapide.



Figure 20 : Résultat de culture sur YMA+BTB (photo personnel)

Résultats et discussion

3.5. YMA+ RC :

Après incubation sur le milieu YMA additionné de rouge Congo pendant 72 heures à 28°C, des colonies de *Rhizobium* de couleur rose sont apparues, cette couleur est due à une faible absorption de l'indicateur RC, certaines souches n'absorbent pas le RC (figure 21). Ces résultats sont en accord avec d'autres recherches récentes qui ont clairement montré que les isolats présentent peu ou pas d'absorption de l'indicateur RC et c'est une caractéristique des Rhizobactéries (Degefu et al., 2018 ; Purwaningsih et al., 2018).

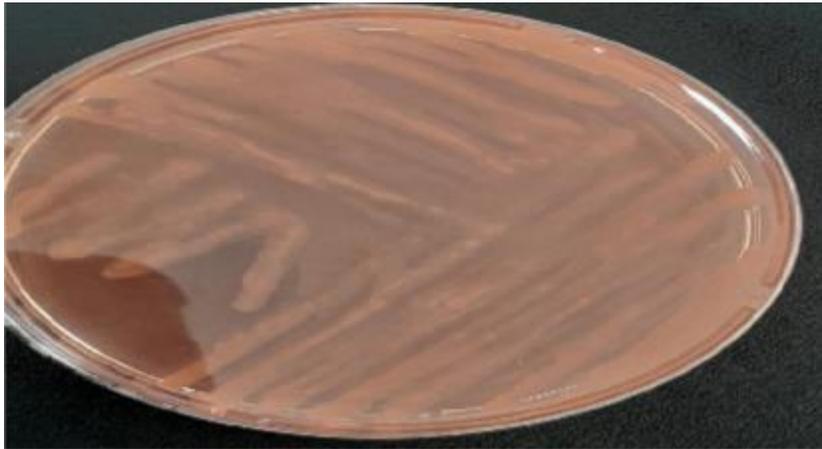


Figure 21 : Résultat de croissance sur YMA+RC (photo personnel)

3.6 Test de GPA :

Après incubation à 28°C pendant 3 jours sur milieu GPA, aucun changement de couleur de milieu n'a été observé et aucune croissance ; ce qui confirme la pureté des isolats. Ces résultats sont parallèles avec ceux obtenus par Singh et ses collaborateurs en (2008) et Pervin et ses collaborateurs en (2017). Ce milieu est utilisé pour différencier entre les *Agrobacterium* et *Rhizobium* à partir des nodules de deux différentes légumineuses en se basant sur le virage de couleur du milieu par une modification de leur pH et la croissance des *Agrobacterium* sur ce milieu.

Résultats et discussion

3.7. Test de nitrate réductase :

Les milieux présentent un trouble qui signifie la croissance de nos souches (figure 22). Après ajout des réactifs nitrates 1 et 2, certaines souches ont présenté la coloration rouge c'est-à-dire qu'elles possèdent l'enzyme nitrate réductase (figure 23 a). Pour les autres souches, elles sont restées incolores, ce qui nécessite l'ajout de poudre de zinc et après quelques secondes les milieux sont devenus rouges alors ces bactéries ne possèdent pas cette enzyme, car c'est la poudre de zinc qui a réduit le nitrate en nitrite (figure 23 b). La capacité des souches de *Rhizobium* à réduire le nitrate en nitrite est un indicateur important de sa contribution à la fixation de l'azote atmosphérique (Lucinski *et al.*, 2001).

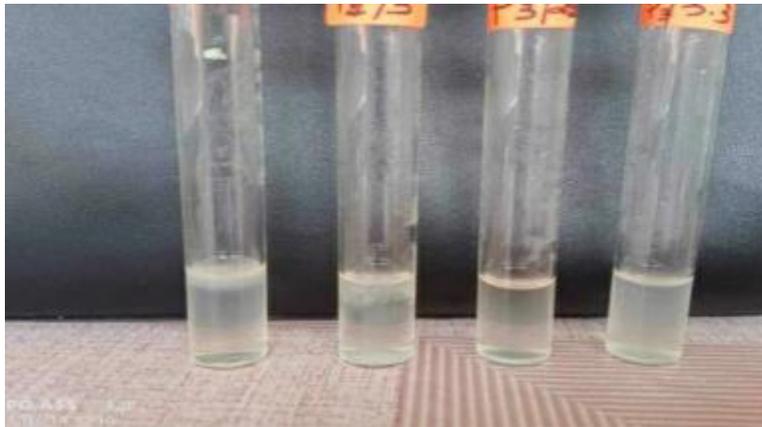


Figure 22 : La turbidité sur bouillon nitraté (photo personnel)

Résultats et discussion

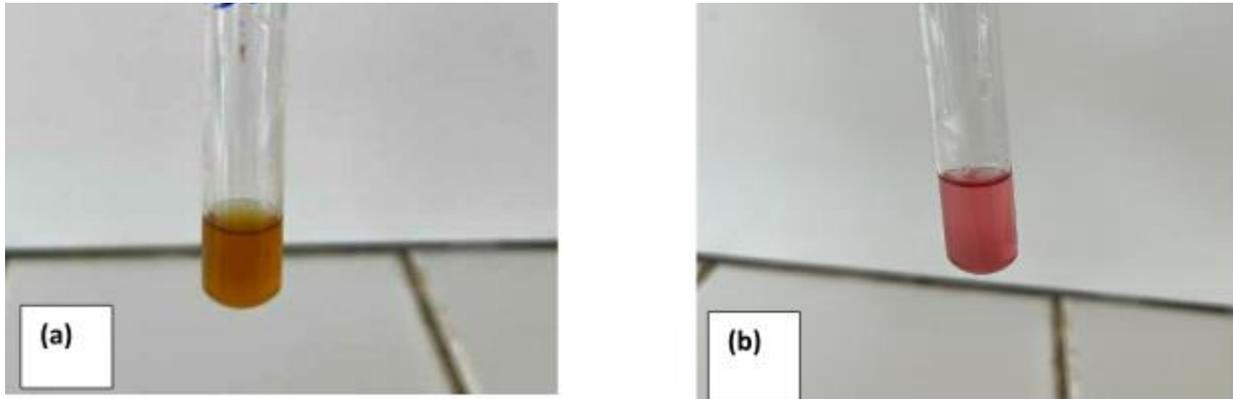


Figure 23 : Résultat de l'enzyme nitrate réductase

(a) test positive (b) test négative coloration après ajout de poudre de zinc.

(photo personnel)

4. Recherche des activités enzymatiques :

Les résultats des tests enzymatiques ont permis de confirmer la capacité de certaines souches à produire différentes enzymes telles que l'amylase, la protéase, la lipase et la cellulase (tableau 4)

Résultats et discussion

Tableau 4 : Les résultats des activités enzymatiques

| Souches | P1.2 | P1.4 | P2.4 | P2.5 | P2.3 C | P3.1 | P3.2 | P3.3 | P3. |
|--------------------------------|------|------|------|------|-----------|------|------|------|-----|
| Activité amylolytique | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + |
| Activité cellulosique | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Gélatinase | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Caséinase | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Activité lipolytique (Tween80) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

4.1 Activité amylolytique :

Les résultats de l'activité amylolytique ont montré l'apparition d'un halo clair autour des colonies chez toutes les souches testées, ceci confirme la présence d'une activité amylolytique.

Résultats et discussion



Figure 24 : Activité amylolytique chez les souches P1.4 et P3.2 (photo personnel)

Selon Oliveira et ses collègues (2007), les souches de *Rhizobium* peuvent produire différentes quantités de biomasse et d'amylases avec différents types des sources de carbone.

En comparant les diamètres des halos d'éclaircissement autour des colonies, il y'avait différents degrés de dégradation de l'amidon. Les souches (P1.2) et (P1.4) ont une activité plus forte en comparaison aux autres souches (tableau 4). Ceci est en accord avec le constat de Jopinath (2017) qui a rapporté que les *Rhizobiums* ont la capacité d'hydrolyser l'amidon.

4.2 Activité protéolytique :

4.2.1 Hydrolyse de la gélatine :

D'après les résultats des cultures mentionnés dans Le tableau 4, aucune souche n'a été capable d'hydrolyser la gélatine, cela se traduit par l'absence d'un halo clair autour des colonies après rinçage avec la solution de sulfate d'ammonium (Figure 25).

De ce fait, toutes les souches bactériennes étudiées sont dépourvues de la gélatinase.

Balinder et ses collègues (2008), ont trouvé que toutes les souches *Rhizobium* testés sont incapables de produire cet enzyme Donc, ils ont constaté que l'absence de l'activité de la gélatinase est également une caractéristique de *Rhizobium*.

Résultats et discussion



Figure 25 : Résultats de l'hydrolyse de la gélatine (photo personnel)

4.2.2 Hydrolyse de la caséine :

Les résultats obtenus ont montré qu'une seule souche parmi les 9 souches testées a la capacité d'hydrolyse la caséine (Figure 26), ceci a été observé par la présence d'un halo clair autour des colonies. Selon Ramadan et al (2021), la présence d'une zone claire autour des colonies indique que la bactérie a dégradé les protéines complexes du lait écrémé en peptides et acides aminés en produisant des enzymes protéolytiques.

Des études réalisées par Ahmed et ses collègues (2013), ont montré que 66.7% des isolats produisent des protéases. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres. Les protéases d'origine microbienne peuvent être influencées par plusieurs facteurs tels que la souche microbienne, la concentration d'oxygène et les sources d'azote et de carbone (**Jerman et Fassil, 2018**).

Résultats et discussion



Figure 26 : L'hydrolyse de la caséine (a) négative (P2.5), (b) positive (P1.4) (photo personnel)

4.3 Activité cellulosique :

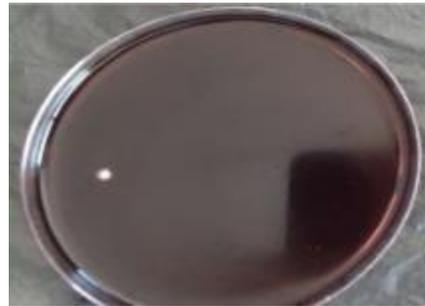
Les résultats obtenus ont montré l'hydrolyse du carboxyl-méthyl-cellulose chez quatre souches (tableau 4). L'absence de cette activité pour le reste des souches s'est traduit par l'absence d'une zone claire autour des colonies (Figure 27), cette absence signifie qu'ils ne peuvent pas dégrader la cellulose présente dans la paroi cellulaire des plantes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Almihyawi et ses collègues qui ont révélé que 66.66% des isolats ont produit la cellulase.

Des études par Oliveira et ses collègues (2007) ont montré que tous leurs isolats étaient constitués de cellulase. L'activité cellulosique peut être influencée par l'origine de la souche et par la composition du milieu de culture. (Mir *et al.*, 2021).

Résultats et discussion



a



b

Figure 27 : Résultats de l'activité Cellulosique

(a) positive (P2.5), (b) négative (P3.3) (photo personnel)

4.4. Activité lipolytique :

D'après les résultats mentionnés dans le tableau4, aucune souche n'a été capable d'hydrolyser le tween 80, cela s'est traduit par l'absence d'une zone claire autour des colonies (Figure 28).

Donc, toutes les souches de *Rhizobium* testées sont dépourvues de lipase. Dans les études réalisées par Ahmed et ses collègues en (2013), 58.3% des souches bactériennes étudiées avaient des résultats positifs, ce qui ne correspond pas à nos résultats.



Figure 28 : Résultats de l'activité lipolytique

(photo personnel)

Conclusion

Conclusion

La bactérie *Rhizobium* est connue par sa capacité à noduler les racines des plantes et surtout les légumineuses et contribue à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et le rend utilisable pour la plante.

Cette étude a été effectuée dans le but d'identifier, isoler et rechercher les activités enzymatiques de cette bactérie qui a été isolée à partir des nodules de la plante *Vicia faba* récoltées de trois sites différents de la wilaya de Tlemcen.

L'étude des caractères morphologiques a montré que les souches isolées sont de petits bâtonnets, mobiles à Gram négatif. La caractérisation biochimique a révélé une variabilité de comportement vis-à-vis des tests effectués. Les résultats de ces tests ont montré une positivité des tests oxydase, catalase et négative pour l'utilisation de citrate. En plus, ils ont la capacité de réduire le nitrate en nitrite. Certaines souches ont été caractérisées par une capacité acidifiante connue chez les *Rhizobium* à croissance rapide.

Le présent travail a confirmé la capacité des souches de *Rhizobium* à hydrolyser l'amidon, la cellulose et une faible dégradation de la caséine. Pour les activités de gélatinase et lipolytique les résultats étaient négatifs. Ces résultats peuvent être utiles en biotechnologies alimentaires et en agriculture pour l'utilisation de ces bactéries dans l'amélioration des rendements agricoles.

En perspective de cette recherche, il serait intéressant de pouvoir utiliser des techniques de biologie moléculaire telles que les PCR pour une identification plus précise des souches de *Rhizobium*. En plus, il est souhaitable de rechercher d'autres activités enzymatiques.

Les références

Bibliographiques

Les références bibliographiques

1. **Ahmed,N.,Shunwari,Z.K.,Bashir,S et Yassir,M.(2013).**Function ans Pylogenetic characterization of Rhizosphere Bacteria Associated with GM and Non GM Maiz.PAK.J.Bot.,45(5).1781-1788,2015.
2. **Almihyawi,R.A.H.,Musazade,E.,Alhussany,N.,Zhang,S et Chen,H. (2024).**
Production and characterization of bacterial cellulose by Rhizobium sp.isolated from bean root. Scientific reports, 14(1), doi: 10.1038/s41598-024-61619-w.
3. **Amrani ,N.M.M et Yahaya,N. (2022).** Advanced Development of Bio-fertilizer Formulations Using Microorganisms as Inoculant for Sustainable Agriculture and Environment -A Review. MJOSHT, 8(1), 92-101.
4. **Baljinder ,S.,Ravneet,K.,Kashmir,S.(2008).** Characterization of Rhizobium strain isolated from the root of Trigonella foenumgraecum(fenugreek).AfricJournal of Biotechnology, vol.7(20).pp.3671.3676,20 october2008.
5. **Banerjee, S et Heijden , M.G.V. (2022).** Soil microbiomes and on health.. Nature Reviews Microbiology, 21(1),1-15
6. **Benjamin,G.Fathi,B.,Pascal,R et Gary,S.(2014).** Rhizobium-legule symbiose :the crucial role of plant immunity.Trends plant Sci 2015 Mar ;20(3) :186-94. Htttps://doi:10.1016/j.tplants.2014.11.008
7. **Bhadrecha,P.,Singh,S et Dwibedi,V. (2023).** Plant’s major strength in rhizosphere : The plant growth promoting rhizobacteria . Archives of Microbiology, 205(5) 165-190 .
8. **Bhat,M.M.,Mishra,A.K.,Jan,S et Aamir,M.(2023).**Plant growth promoting Rhizobacteria in plant health :A perspective study of the under ground interaction. Plant, 12(3), 629-650.
9. **Breton ,P.(2015).**Dans prairies,de quelles couleurs sont k les nodosités Caroline, R.(2017). Les légumes secs, aliments de choix à valoriser Pulses :An excellent healthy food choice.Cahiers de Nutrition et de Diétitique, 52(2),71-77.
10. **Burt,Z.(1991).**Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. Bioorganic chemistry,Volume19,issue1,March1991,p116-131. [https://doi.org/10.1016/0045_2068\(91\)90048-](https://doi.org/10.1016/0045_2068(91)90048-)
11. **Camille,D.(2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire ou de contrôle sanitaire.

Les références bibliographiques

12. **Carole ,S.,Didier,B., Claudine,F.(2013).**Biological nitrogen fixation in non-legume plants .Annals of Botany ,111 : 743_767,2013. [https://doi : 10.1093/aob/mct 048](https://doi.org/10.1093/aob/mct048).
13. **Carroll, P.V. (2001).** Symbiotic Nitrogen Fixation and phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a world of Declining Renewable Ressources. Plant Physiology, 127(2),390-397.
14. **Daniel,J.G., William,M.(2000).**Hanging by a thread invasion of legume plants by Rhizobia,January 2001.3(6) :613-7
15. **Degefu,T.,Endalkachew,W.M.,Adem,M.,Fikre,A.,Amede,T et Ojiewo,C. (2018).** Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (Cajans cajan L. Millsap.) growing in Ethiopia. academic Journals, 17(6), 167-177.
16. **Eduardo,J.P.,Rosari5a,T.,Simona,F et Manrizio,L.(2004).**Organogenesis of Legume Root nodules . International Review or cytology, vol,234.
17. **El-Haloui,N.E.,Ochin,D et Tailliez,R. (1986).** Compétitivité pour l'infection entre souches de Rhizobium meliloti : Rôle de la mobilité. Plant and Soil, 95(3),337-344.
18. **Emma,L.,Philip,P. (2003).** Metabolism of Rhizobium Bacteroids. Critical Reviews in plants sciences, 22(1),37-78.
19. **Enebe,M.C et Bababola,O.O. (2018).** The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress :a survival strategy. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(7),7821-7835.
20. **Faghir,M.(2012).**Rôle des microorganisms symbiotiques. (cas de Rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de Phaseolus vulgaris sous stress salin.Thèse de doctorat en agri-physiologie et Microbiologie des symbiotes.Université cadi ayyad,Marrakech , Maroc,111p.
21. **Fahde,S.,Boughribial,S.,Sijilmassi,B et Amri,A. (2023).** Rhizobia :A promosing source of plant growth-promoting molecules and their Non-legume. interactions :Examining Applications and mechanisms. Agriculture, 13(1279),27.

Les références bibliographiques

- 22. Fransisco,J.P., Manuel ,F., Oscar ,M.N.,Maria,V.C.,Miguel,A.,.....et Antonio,B.(1998).** Analysis of tween 80 as an esterase,lipase substrate for lipolytic activity assay.Biotechnologie technique,vol12.N03,pp.183-186 p.
- 23. Harun-or Rashid, M.,Javier, G.,Peter,J.W.Y et Michael,W. (2014).** Rhizobium leguminosarum is the symbiont of lentils in the middle East and Europe but not in Bangladesh. FEMS Microbiology Ecology, 87(1),64-77.
- 24. Havey,L.T.M .(2001).**Urease, helicobacter pylory : physiology and genetic.Chapter 16,187-191,2001. Doi <https://doi.org/10.1128/9781555818005>.
- 25.Hyder,S.,Rizfi,Z.F.,Sergio,D.V.,Santoya,G.,Gondal,A.S.,Khalid,N.,Fatima,S.N.,Nadeem, M.,Rafique,K et Rami,A. (2023).** Applications of plant growth-promoting rhizobacteria for increasing crop production resilience. Journal of plant Nutrition, <https://doi:10.1080/01904167.2022.2160742>.
- 26. Issa,D.,Abdallah,D.(2022).**Les symbiose fixatrices d'azote :types et régulateurs transcriptionnel de la nodulation.Internarional Journal of biological ana d chemical sciences ,dans formula groupe [journal], sur le site iff.org consulté le 30 avril 2022.<https://www.ifdg.org>.
- 27. Iwona ,K.,paulina,Z.,Marel,K.,Beata,K.,Justyna,F.,Zbigniew,K et Wieslaw,K. (2013).**Bacterial urease ans its Rôle in long lasting human diseases ,Cuvr Protein peptsci-2012 Dec,13(8):789-806.<https://doi10.2174/138920312804871094>.
- 28. Jean,,M.S.(2017).**Légumineuse +Bactérie Rhizobium = Symbiose. Agriculture de conservation.com. Le portail des agricultures écologiquement cohérentes.
- 29. Jean,M.G., Michel,A.,Willy,M.(2010).**Le sol vivantp.edition 3 revue et augmentee,817p.
- 30. Jerman,M.,Fassil,A.(2018).**The role of microbial asparatic protease enzyme in food and beverage industries.Journal of food quality 2018(1),7957269,2018
- 31. Joël,F.(2015).**Rhizobial infection chamber remodeling.Plant physiology Review.Doi :10.1104/pp.114.253302.
- 32. Jordan, D.C.(1984).**Family III.Rhizobiaceae In :Kring NR,Holt JG (eds) Bergey's manuel of sysetematic bacteriology, Williams and Wilkins, Biltimore.P : 234-242.

Les références bibliographiques

- 33. Kaur,H.,Kaur,J et Gera,R. (2016).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Boon to Agriculture. International journal of cell Science and Biotechnology, 5(2016), 17-22.
- 34. Kbede,E.,Amsalu,B.,Agraw,A et Tamiru,S. (2022).** Nodulation potential and phenotypic diversity of rhizobia Nodulating Cow pea (*Vigna unguiculata* L.) from Agriculture Soils of Lower Eastern Kenya. International Journal of Microbiology, 2017(4),1-9.
- 35. Kejela,T. (2024).**phytohormones. Producing Rhizobacteria and their Role in plant growth. New Insights into phytohormones.
- 36. Khan,S.,Budakoti,A.,Rani,K et Sharma,S. (2023).** Rhizobacterial mediated interactions in curcuma longa for plant growth and enhanced crop productivity: a systematic review. Frontiers in Plant science, 14(14), 1-16.
- 37. Khoso,A.M.,Wagan,S.,Alam,I.,Hussain, A.,Ali,Q.,Saha,S...et Liu,F. (2024).** Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and characteristics current perspective. Plant Stress, 11,1-5, Doi : 10.1016/j stress .2023.100341.
- 38. Kuldeep,A.R.,Mitali,M et Pramod,K.P. (2021).** Nutritional composition, anti- nutritional factors, pretreatment cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.) :A comprehensive review-LWT,138.
- 39. Krimi,S.,Felouat,R et Bouhlaies,A. (2021).** Symbiose Rhizobium-légumineuse et diversité des rhizobia nodulant les légumineuses de la tribu de Viciae. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master.
- 40. Kwon,S et An,C.S.(1999).** Isolation and characterization of catalase Gene from Rhizobium sp.SN4003, a Root Nodule Symbiont of Canavalia Lineata. Molecules and Cells, 9(1),49-55.
- 41. Legesse,S. (2016).** Isolation, Identification and Authentication of Root Nodule Bacteria (Rhizobia) in Promoting Sustainable Agricultural Studies, 6(1), 87-93.
- 42. Liu,S.,Jiao,J et Tian,C. (2023).** Adaptive Evolution of Rhizobial symbiosis beyond Horizontal Gene Transfer : From Genome Innovation to Regulations Reconstructional. Genes, 14(2), 247.

Les références bibliographiques

43. **Lopez.M.,Herrera,J.A.,Tejera,N.L.C.(2008).**Growth and Nitrogen fixation in Lotus Japonicus and Medicago truncatula under NaCl stress :Nodule carbon metabolism.Journal of plant physiology 165 :641-650
44. **Lucinski,R.,Polcyn,W et Ratajczak,L. (2001).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium legumes. Acts Biochimica Polonica, 49(2),537- 546.
45. **Mabiala,S.M.,Joseph,G.T.,Nazou,S.A.E et Lebonguy,A.A. (2021).** Isolation and Characterization of native Rhizobium strains nodulating some legumes species in South Brazzaville in Republic Congo. Advances in Bioscience and Biotechnology, 12(1),21.
46. **Malak,F. (2020).** Interaction microbienne. Tlemcen . Kunuz édition.
47. **Marco,P.C.,Alarcon,A.,Perez.J et Ferrera-cerrato,R. (2022).** Agricultural and Forestry importance of Microorganism-plant symbioses: A Microbial Source of Biotechnological Innovations. Reviews in Agricultural Science, 10(1), 344-355.
48. **Massadeh,M.I.,Alkhataibeh,E.A.,Al-Ghazawi,A.A et Aukour,F.(2024).** Enhancement of Medicago sativa Plant Growth and Yield after Treatment with Rhizobium sp. Journal of Ecological Engineering, 25(2), 33-43.
49. **Michael,F.D. (2014).** Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobium-legume interactions. Critical Reviews in Microbiology, 1-41.
50. **Mir,I.,Mukkamula,N.,Kumar,B.K et Parvay,J.A. (2024).** Impact of microbial consortium of Rhizobium tropici and Rhizobium majense on the growth of Rhizoglyphus vulgaris L. NC-Nd Licence. South Africa Journal of Botany, 168(1), 562-572.
51. **Mohammed,I.M.,Kiram,B.K.,Subramaniam,G.,Srinivas,V et Bee,H.(2021).** Characterization of Rhizobia isolated from leguminous plant and their impact of the growth of IGGV2 variety of Chickpea (Cicer arietinum L).Journal of Heliyon, Heliyon7 (2021) e08321.
52. **Mohsin,T.,Muhammad,N.,Temoor,A et Amir,H. (2017).** Antagonistic features displayed by plant Growth promoting Rhizobacteria (PGPR) :A Review. Journal of Plant Science and phytopathology, 1(1), 38-43.

Les références bibliographiques

- 53. Nag,P.,Shriti,S et Das,S. (2019).** Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in non legumes. *Journal of Applied Microbiology*. [https://doi : 10.1111/Jan.14557](https://doi.org/10.1111/Jan.14557).
- 54. Nathalie,G. (2015).** Fève (*Vicia faba*, mal aimée des légumineuses. Jardiner avec Binette jardin.
- 55. Oliveira,A.N.de.,Oliveira,L.A.,Andrade,J.S et Chagas Junior,A.F.(2007).**Rhizobia amyase production using various starchy substances as carbon substrates.Brazilian Journal of Microbiologie,38,208-216. Doi : https://doi.org/10.1590/S1517_83822007000200005.
- 56. Ondieki,K.,Nyaboga,E.,Wagacha,M et Mwaura,F.B. (2017).** Morphological ans Genetic Diversity of rhizobia Nodulating Cow peau (*vigna unguiculata L.*) from Agriculture Soils of Lower Eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2017(4), 1-9.
- 57. Pandey ,A.,Nigam,P.,Soccol,C.R.,Soccol,V.T.,Singh,D et Mohan,R.(2000).**Advances in microbial amylases .*Biotechnol Appk Biochimie*.2000Apr.31(2):135-52. [https://doi: https://doi.org/10.1042/ba19990073](https://doi.org/10.1042/ba19990073).
- 58. Previn,S.,Jannat,B.,Al Sanjee,S et Farzana,T. (2017).** Characterization of Rhizobia from Root Nodule and Rhizosphere of Lablab purpureus and *Vigna sinensis* in Bangladesh. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(1), 14-17.
- 59. Philippe,H. (2010).** Les racines au cœur de fonctionnement de la rhizosphère : Des connaissances pointues issues de la recherche aux applications possibles en AB. *After Agri* ,101.
- 60. Purwaningsih,S.,Nditasari,A et Antonius,S, (2019).** Isolation, physiological characters and effectivity of bacterial isolates of root nodules from various plants on the growth of *Vigna radiate L.* *ISBIOREV*, 308(1) [https://doi :10.1088/1755-1315/308/1/012024](https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012024).
- 61. Putrie,R.F.W.,Widowat,T.I.,Lekatompessy,S et Sukiman,H.(2016).** Nitrogen fixing Potential of Endophytic Bacteria Isolated from *Aloe barbadensis* Miller et *Aloe sp.* *Microbiology Indonesia*, 10(2), 48-56.

Les références bibliographiques

- 62. Ramdhan,A.R.,Bachruddin,Z.,Widodod,Y et Hanin,C.(2021).** Isolation and Selection of proteolytic lactic acid Bacteria from Colostrum off dairycattle.IOPconf-Ser.Earth Environ.Sci,2021 :788,012077.
- 63. Raoul,C.(2013).**Le sol.Edition France Agricol 2éme edition,2013
- 64. Roglaski,A.(2007).**Synthesis and Kinetic Analysis of Tandanustat _Based alpha amylase inhibitors.Senior Honor Theses.Paper185.
- 65. Sarbani,N.M.M et Yahaya,N. (2022).** Advanced Development of Bio-fertilizer Formulation Using Microorganisms as Inoculant for Sustainable Agriculture and Environment-A Review. MJOSHT,8(1), 92-101.
- 66. Shanti,K.N.(2011).** Characterization and purification of protease enzyme.Journal of applied Pharmaceutical science 01(03) ;2011 :107-112
- 67. Shetta, N.D.,Al-Shaharani,T.S et Abdel-aal,M. (2011).** Identification and Characterization of Rhizobium associated with woody legume trees grown unde Saudi Arabia condition. American-Eurasian J. Agric & Environ.Sci,10(3), 410-418.
- 68. ShreeK.S.,Prasad,N.,Prakruthi,G.,Siddaligeswara,K.G et Patil,S.J. (2022).** Isolation, Biochemical Characterization of Rhizobium sprs SN 01 Strain from Root Nodules of Mimosa pudica and their impact on Agriculture Crops. Asian Journal of Biological and life Science, 11(1), 200-205.
- 69. Sobti,S.,Hamdi,A.B et Afaf,D.(2015).** Isolation and characterization of Native Rhizobia under Hyper-salt Edaphic conditions in ouargla(South east Algeria). Energy Procedia, 7(1), 1434-1439.
- 70. Somasegaram,P.,Hoben ,H.J.The Manuel for Rhizobia Springer -verlog. Berlin.Spaink HP. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology, 54, 257-288.
- 71. Sonal,R.,Wei,L.,Eaja,S.N.,Ashely,C., kirankumar ,S.M....et Michael,K.V.(2019).** Celebrating 20years of genetic discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen fixation.American Society of plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>.

Les références bibliographiques

- 72. Subash,C.B.G.,Periasamy,A.,Arshad,M K.M.,Thangavel,L.,Chun,H.V.,Uda,H et Suresh,V.C.(2017).** Biotechnological processes in Microbial Amylase production.Biomed Research International.Doi : <https://doi.org/10.1155/2017/1282193>
- 73. Syria,J.,Bharathiraja,S.,Krishnan,M.,Manivasgan,P et Kim,S.K.(2016).**Marine microbial Amylases :Properties and application.2016 :79 :161-177. [https://doi : 10.1016/bs.afnr.2016-07.001](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016-07.001)
- 74. Tanno,k et Willcox,G. (2006).** The origine of cultivation of *Cice arietinum* L. and *vicia faba* L : early finds from Tell et krekh, north-west Syria ,late 10 th millennium B.P.veget. History. Archeobot, 15, 197-204.
- 75. Tengfei,M.,Xue,H.,Piao,C.,Jiang,N et Li,Y. (2023).** Phylogenomic reappraisal of the family Rhizobiaceae at the genus and species levels including the description of *Ectorhizobium quercum* gen.nov.,sp.nov. *Frontiers in Microbiology*. Doi :[10.3389/fmicb.2023.1207256](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1207256).
- 76. Tripathie,A.,Pardey,V.K.,Jaim,D.,Singh,G.,Brar,N.S.,Taufeeq,A....et Rustagi,S. (2024).** A updated review on significance of PGPR induced plant signaling and stressmanagement in advancing sustainable Agriculture. *Journal of Agriculture and food research*, 16,1-13.
- 77. Valerie,M.,Chantal,B.,Martine,C.,Isabelle.,Dominique,J.R.,Chantal,M.,Maud,P. (2010).** Aliment mixte « blé dur-légumineuse » : influence de la structuration de leurs constituants sur leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques Design of food made from durum wheat and legume : How their components contribute to their nutritional and organoleptic properties. *Cashiers de Nutrition et de D  t  tique*, 45(5), 237-245.
- 78. Verma,K.K.,Joshi,A.,Song,X.P.,Liang.Q.Xu,L.,Huang,H.R.,Wu,K.C.....et Li,Y.R. (2024).** Regulatory mechanisms of plant rhizobacteria on plants to the adaptation of adverse agroclimatic variables. *Frontiers in Plant Science*, 15(1377793),1-11. [https://doi :10.3389/fold.2024.1377793](https://doi.org/10.3389/fold.2024.1377793).
- 79. Vinhenu ,M.,Mantsala,P.(1989).** Microbial amylolytic enzymes.Département of Biochemistry university of turk, Finland,1989 :24(4) :329-418 .Doi

Les références bibliographiques

:10.3109/10409238909082557.

- 80. Williams, M.P., (2009).** Citrate de test protocol. American society for Microbiologie
- 81. Wulandai, D., Baskoro, K., Mahmudah, Y., Kusmiyati, F., Pratiwi, A.R et Anto, B. (2024).** Bio prospecting of Rhizobia as Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential from Root Nodules of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *TRENDS IN SCIENCES*, 21(7), 7651-7664.
- 82. Xavier, M. (2023).** Analyses of Enzyme Réaction Kinetic. Wiley online library. <https://doi.org/10.1002/9781119490258>
- 83. Yingjie, Q. (2002).** Review properties and applications of urease, *Biocatalysis and biotransformation* 20(1), 1-14, 2002
- 84. Yuan, Z.C., Zaheer, R et Finan, T.M. (2005).** Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium miloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 877-894.
- 85. Zakhia, F et Philippe de, L. (2001).** Taxonomy of rhizobia . *Agronomie*, 21(6-7), 569- 576.
- 86. Zerner, B. (1991).** Recent advances in the chemistry of an old enzyme , urease, *Bioorganic chemistry*. Volume 19, issue 1, March 1991, pages 116-131. Doi : [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(91\)90048-T](https://doi.org/10.1016/0045-2068(91)90048-T)
- 87. Zhao, N., Xue, D., Miao, Y et Wang, Y. (2023).** Construction of high density genetic map for faba bean (*Vicia faba* L.) and quantitative trait loci mapping of sleep-related traits. *Frontiers in Plant Science*, (14) . <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1201103>.
- 88. Yingjie, Q. (2002).** Review properties and applications of urease, *Biocatalysis and biotransformation* 20(1), 1-14, 2002

Les références bibliographiques

Annexes :

Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisées

Le milieu YMA :

- **Mannitol** : 10g
- **K₂HPO₄** : 0,5 g
- **MgSO₄** : 0,2 g
- **NaCl** : 0,1 g
- **Extrait de levure** : 1 g
- **Agar** : 15 g
- **Eau distillée** : 1000 mL
- **PH** : 6.8

Le milieu YMA +BTB

- **YMA** : 1000 mL
- **Solution de bleu de bromothymol** : 1 mL
- **PH** : 7

Le milieu YMA +RC

- **YMA** : 1000 mL
- **Solution rouge de Congo** : 10 mL
- **PH** : 6,8

Le milieu GPA

- **Glucose** : 5 g
- **Peptone** : 10 g
- **Violet de bromocrésol** : 10 g

- **Agar** : 10 g
- **L'eau distillée** : 1000 mL
- **PH** : 6,8

Annexe 2 : les solutions d'indicateurs colorés :

Rouge Congo :

- **Poudre de rouge Congo** : 0.025 g
- **Eau distillée** : 100 mL

Bleu de Bromothymol :

- **Poudre de bleu de bromothymol** : 0.25 g
- **Éthanol** : 100 mL

Annexe 3 : coloration de Gram :

- Réalisation des frottis bactériennes thermo fixées.
- Emersion dans un colorant violet cristal pendant une minute.
- L'ajout de Lugol pendant une minute pour fixer la première coloration puis rinçage à l'eau distillée.
- Décoloration avec l'éthanol puis rinçage à l'eau distillée.
- Immersion de la lame d'une solution de fuchsine pendant une minute.
- Rinçage à l'eau distillée puis égouttage et séchage avec un papier absorbant.