

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

Présenté par

Hemimou Mohammed et Tebbal Abir

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Microbiologie fondamentale

Thème

***Contribution à l'étude du pouvoir compétitif de
Rhizobium***

Soutenu le : 30 /06/2025

Devant le jury

Président	Pr. Rebiahi Sid Ahmed	Université de Tlemcen
Encadrante	Dr. Rahmoun Malika	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. Bellifa Samia	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

C'est avec une profonde gratitude et une grande fierté que nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Nous remercions avant tout Dieu Tout-Puissant, pour Sa grâce, Sa force et la patience qu'Il nous a accordées tout au long de ce parcours parfois difficile.

Nos remerciements les plus respectueux vont à notre encadrante Mme ***Rahmuon Malika*** pour son accompagnement précieux, ses conseils avisés, et sa bienveillance tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

A notre juge et président de ce Mémoire

Pr Sid Ahmed Rebiahi

Nous souhaitons vous remercier d'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire, Nous avons été touchés par la bienveillance et la gentillesse que vous nous avez accordées. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Ce travail est l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

A notre examinatrice de ce mémoire

Dr Bellifa Samia

Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi notre jury de mémoire et d'évaluer notre travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre estime et notre grand respect.

Un grand merci aussi à l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), pour leur accueil, leur disponibilité et les moyens qu'ils ont mis à notre disposition afin de mener à bien notre travail expérimental.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à l'ensemble de nos enseignants, pour leur dévouement, leur savoir transmis avec passion, et leur rôle essentiel dans notre formation.

Un merci tout particulier à nos familles, pour leur soutien inconditionnel, leur amour constant et leur présence silencieuse mais puissante tout au long de cette aventure.

Dédicace



À Dieu Tout-Puissant,

Lui seul m'a relevée lorsque j'étais à terre,
Il a illuminé mes pas dans l'obscurité,
et m'a comblée de force et de patience.

Louange à Lui pour le passé, et confiance en Lui pour ce qui est à venir.

À moi-même,

Pour chaque instant de persévérance,
Pour avoir cru en mes rêves malgré les doutes et la fatigue.
Un grand objectif m'attend encore... et par la volonté de Dieu, je
l'atteindrai.

À ma chère mère,

La lumière de ma vie, le refuge de mon cœur,
Ta présence est une bénédiction inestimable et ton amour un trésor
inépuisable.

À mes chers frères et sœur : *Fatima, Walid et Oussama,*
Vous êtes ma force, ma fierté, et mon plus beau soutien.

Et à mon binôme Mohammed

Merci pour ta gentillesse, ton esprit d'équipe et ton engagement sincère,
Ta présence a rendu cette aventure plus douce et plus enrichissante.

Abir

Dédicace



A l'aide de *Dieu*, tout puissant qui m'a permis d'être ce que je suis et j'ai
Pu réaliser ce modeste travail que je dédie ;

A mes parents pour leur dévouement, leurs encouragements et
leurssacrifices. Ils ont tout fait pour que je sois aujourd'hui, à cette place.

Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde
affection.

Je les dédie également à :

A toute *ma famille*, grande et petite, tant en Algérie, qu'à l'étranger surtout

Ma sœur *Samia* et mon frère *Youcef*.

A tous mes ami(e)s : *Younes, Zayneb*

A mon binôme *Abir* ; pour tous les bons moments partagés, je te souhaite
le bonheur et le succès dans ta vie,

Et à tous qui me connaissent.

Enfin à tous ceux qui aiment la science et la recherche.

Mohammed

ملخص

تلعب بكتيريا الريزوبيا دورًا أساسيًا في التثبيت الحيوي للنيتروجين، مما يساهم بشكل كبير في تغذية النباتات البقولية وخصوبة التربة. ويتأثر نموها وكفاءتها بعدة عوامل بيئية، خاصة الرقم الهيدروجيني (pH) ودرجة الحرارة. يمكن لهذين العاملين التأثير على تطور البكتيريا، وإنتاج المركبات الثانوية، وتشكيل العلاقة التكافلية مع النباتات المستضيفة. في هذه الدراسة، تم عزل 24 سلالة من الريزوبيا من تربة مناطق مختلفة من ولاية تلمسان. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصاتها الخالية من الخلايا باستخدام تقنية الحفر على وسط مولر-هينتون، ضد سلالات ممرضة ومرجعية. لم تُظهر النتائج مناطق تثبيط واضحة. ومع ذلك، لوحظ أن إحدى السلالات أظهرت نمواً موضعياً حول البئر الذي يحتوي على الراشح الخاص بها، مما قد يشير إلى وجود مركبات تعزز نموها بدلاً من أن تكون ذات تأثير مضاد للبكتيريا. وتبرز هذه الملاحظات مدى تعقيد التفاعلات الميكروبية في منطقة الجذور.

الكلمات المفتاحية : ريزوبيا، التثبيت الحيوي للنيتروجين، النشاط المضاد للبكتيريا، الرقم الهيدروجيني (pH) ، درجة الحرارة، منطقة الجذور، تلمسان.

Résumé

Les bactéries du genre *Rhizobium* jouent un rôle essentiel dans la fixation biologique de l'azote, contribuant significativement à la nutrition des plantes légumineuses et à la fertilité des sols. Leur développement et leur efficacité sont influencés par divers paramètres environnementaux, notamment le pH et la température. Ces deux facteurs peuvent affecter la croissance bactérienne, la production de métabolites secondaires et la symbiose avec les plantes hôtes. Dans cette étude, 24 souches de *Rhizobium* ont été isolées à partir de sols de différentes régions de la wilaya de Tlemcen. L'activité antibactérienne de leurs extraits a été examinée à l'aide de la méthode des puits sur gélose Müller-Hinton, en confrontation avec des souches pathogènes et de référence. Les résultats n'ont montré aucune zone d'inhibition clairement définie. Cependant, une souche a présenté une prolifération localisée autour du puits contenant son propre surnageant, ce qui pourrait suggérer la présence de composés favorisant sa croissance plutôt qu'un effet inhibiteur. Ces constats reflètent la complexité des interactions microbiennes au sein de la rhizosphère.

Mots clés : *Rhizobium*, fixation biologique de l'azote, activité antibactérienne, pH, température, rhizosphère, Tlemcen

Abstract

Rhizobium bacteria play an essential role in biological nitrogen fixation, significantly contributing to the nutrition of leguminous plants and soil fertility. Their growth and efficiency are influenced by various environmental factors, notably pH and temperature. These factors can affect bacterial development, secondary metabolite production, and symbiosis with host plants. In this study, 24 *Rhizobium* strains were isolated from soils in different regions of the Tlemcen province. The antibacterial activity of their cell-free extracts was evaluated using the well diffusion method on Müller-Hinton agar, tested against pathogenic and reference strains. The results showed no clearly defined inhibition zones. However, one strain exhibited localized proliferation around the well containing its own supernatant, which may suggest the presence of compounds promoting its growth rather than exhibiting antibacterial activity. These observations highlight the complexity of microbial interactions in the rhizosphere.

Keywords: *Rhizobium*, biological nitrogen fixation, antibacterial activity, pH, temperature, rhizosphere, Tlemcen

Table des matières

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
Chapitre 1 : La rhizosphère.....	3
1.1. Définition	3
1.2. Les légumineuses	4
1.2.1. Généralités.....	4
1.2.2. Classification des légumineuses.....	4
1.3. Intérêt des légumineuses.....	5
1.3.1. Intérêt agronomique.....	5
1.3.2. Intérêt environnementale.....	5
1.3.3. Intérêt alimentaire.....	6
1.4. La plante légumineuse <i>Vicia faba</i> . L	6
1.5. Fixation Biologique de l'azote :.....	8
1.5.1. Importance de la fixation biologique de l'azote :.....	8
1.5.2. Rôle du phosphore	8
1.5.3. La nodulation.....	9
1.6. <i>Rhizobium</i>	11
1.6.1. Taxonomie de <i>Rhizobium</i>	11
1.6.2. Caractères morphologiques:.....	13
1.6.3. Caractères cultureux	14
1.6.4. Caractères biochimiques et physiologique.....	14
1.6.5. Caractère génétique	15
Chapitre 2 : Activité antimicrobienne des <i>Rhizobia</i>	16

2.1. Compétition pour la nodulation.....	16
2.2. Antagonisme entre les bactériesrhizosphériques.....	17
2.3. La lutte biologique par les Rhizobia.....	17
2.4. L'importance de l'étude des interactions entre les Rhizobia et les autres microorganismes	18
2.5. Les bactériocines.....	19
2.5.1 Définition et généralités	19
2.5.2. Les bactériocines produites par lesRhizobia	20
2.5.3 Classification des bactériocines deRhizobia	20
Chapitre 3 : Materiel et méthodes	22
1. Lieu d'étude	22
2.1. Description de la zone d'étude :.....	22
2.2. Collecte des plantes :.....	23
2.3. Prélèvements des nodules	23
2.4. Stérilisation des nodules	24
2.5.Écrasement des nodules.....	25
3 .Les milieux de culture utilisés	25
4. Isolement et purification des isolats.....	26
5. Caractères morphologiques	27
5.1. Examenmacroscopique.....	27
5.2. Etat frais.....	27
5.3. Coloration de Gram.....	27
5.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)	27
6. Caractères biochimiques.....	27
6.1. Test de catalase	27
6.2. Test d'oxydase	28
6.3. Test du Citrate de Simmons :.....	28
6.4. Test de bleu de bromothymol (BTB).....	28
6.5. Test de rouge de Congo (RC)	29

6.6. Test de GPA.....	29
6.7. Réduction des nitrates	29
7. Conservation des souches	29
7.1. Conservation à court terme	30
7.2. Conservation à long terme	30
8. Caractères physiologiques	30
8.1. L'effet de pH.....	30
8.2. Effet de la température (°C).....	31
9. Activité antagoniste in vitro des <i>Rhizobia</i> vis à vis des souches bactériennes testées	31
Chapitre 4 : resultats et discussion.....	33
1. Isolement et purification des isolats :.....	33
2. Caractères morphologiques	33
2.1. Examen macroscopique	33
2.2 Examen microscopique.....	34
3. Tests biochimiques.....	36
3. 1 Test de catalase :.....	36
3.2 Test d'oxydase :.....	37
3.3 Test de citrate de Simmons :	37
3.4 YMA+ Bleu de Bromothymol :	38
3.5. YMA+ RC :.....	39
3.6 Test de GPA	39
3.7. Test de nitrate réductase	40
4. Etude des caractères physiologiques des isolats.....	41
4.1.Effet du pH sur la croissance des isolats	43
4.2. Effet de la température.....	43
5. Activité antagoniste in vitro des <i>Rhizobia</i> vis à vis des souches bactériennes testées	45

Conclusion 47

Références bibliographiques..... 49

Annexe 01.....63

Annexe 02.....65

Liste des abréviations

% : Pourcentage

Nod: Produit du gène de nodulation (facteur Nod)

ADP : Acide adénosine diphosphate

BCP : Poupre de Bromocrésol

BNL : Bactéries nodulant les légumineuses

BTB : Bleu de Bromothymol

C° : Degré Celsius

GPA : Glucose Peptone Agar

H : Heure

H₂ : Dihydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

N : Azote

N₂ : Diazote

NO₂⁻ : Nitrite

NaCl : Chlorure de sodium

NH₄⁺ : Ammonium

NO₃⁻ : Nitrate

PH : potentiel hydrogène

RC : Rouge Congo

RND : résistance-nodulation-division cellulaire

s.d. : sans date

V. faba: la plante *Vicia faba*

YEM:YeastExtrat Mannitol

YMA:Yeast Mannitol Agar

YMB:Yeast Mannitol Broth

BBT:Bleu de bromothymol.

BCP :Bromocresolpurple

FAO : Organisations des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

EPS:Exopolysacaride

PGPR : *Rhizobactéries* Promotrice de la Croissance des Plantes

PUE : Efficacité d'utilisation du phosphore.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des <i>Rhizobia</i>	12
Tableau 2 : Classification des bactériocines en fonction de leur taille.....	21
Tableau 3 : Milieux de culture employés	26
Tableau 4 : Les souches testées.....	32
Tableau 5 : Les zones de prélèvement des échantillons.....	33
Tableau 6 : Caractéristiques microscopiques et macroscopique des isolats.....	35
Tableau 7 : résultats de réduction des nitrates par les isolats et les souches testées...	40
Tableau 8 : pH du sol des trois stations de prélèvements.....	42

Liste des figures

▪ Figure 01 : Représentation des trois zones de la Rhizosphère.....	03
▪ Figure 02 : Les fleurs et les fruits de <i>Vicia faba</i>	07
▪ Figure 03 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose <i>Rhizobialégumineuse</i>	09
▪ Figure 04 : Les étapes de la nodulation	10
▪ Figure 05 : Observation des <i>Rhizobium</i> au microscope électronique à fort grossissement.....	14
▪ Figure 06 : Localisations géographiques des sites de prélèvement.....	22
▪ Figure 07 : La zone de prélèvement	23
▪ Figure 08 : Plante de fève extraite avec son appareil racinaire.....	24
▪ Figure 09 : La stérilisation des nodules.....	24
▪ Figure 10 : Écrasement des nodules.....	25
▪ Figure 11 : Technique de diffusion en puits	31
▪ Figure 12 : Résultat des <i>Rhizobium</i> sur YMA.....	33
▪ Figure 13 : Résultat de Coloration de Gram	36
▪ Figure 14 : Résultat du test de catalase.....	36
▪ Figure 15 : Résultat du test d'oxydase	37
▪ Figure 16 : Résultat typique du test de citrate de Simmons.....	38
▪ Figure 17 : Résultat de culture sur milieu YMA + BTB	38
▪ Figure 18 : Résultat de croissance sur milieu YMA + Rouge Congo.....	39
▪ Figure 19 : Résultat de croissance sur milieu GPA.....	40
▪ Figure 20 : Résultat de Réduction des nitrates.....	41
▪ Figure 21 : Effet du pH sur la croissance des isolats	42
▪ Figure 22 : Résultat del'effet du pH sur la croissance des souches	43
▪ Figure 23 : Effet de la température sur la croissance des isolats.....	44
▪ Figure 24 : Résultatdel'effet de la température sur la croissance des souches.....	44
▪ Figure 25 : Résultat de test d'antagonisme des souches de <i>Rhizobium</i>	46

Introduction

Introduction

L'agriculture reste un socle essentiel de l'économie mondiale, garantissant la sécurité alimentaire, créant des postes de travail et participant au développement des zones rurales. En dépit des progrès technologiques, elle est confrontée à d'importants défis tels que le réchauffement climatique, la détérioration des sols et la dépendance aux produits chimiques.

Dans ce cadre, les légumineuses ont une importance capitale en tant que cultures résilientes durables (FAO, 2022). Les haricots, les pois chiches et les lentilles, qui font partie des légumineuses, sont connus pour leur aptitude à capter l'azote de l'atmosphère en associant avec des bactéries du genre *Rhizobium*. Ce procédé fertilise naturellement les sols en nutriments, diminuant par conséquent le besoin d'engrais chimiques et favorisant la vitalité du sol (FAO, 2024). En outre, leur culture favorise la biodiversité et renforce la résilience des systèmes agricoles face aux variations climatiques (FAO, 2023).

Les légumineuses sont essentielles pour les systèmes d'agriculture durable, principalement grâce à leur aptitude à former une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote appartenant au genre *Rhizobium*. Cette relation symbiotique favorise la création de nodules sur les racines, où l'azote de l'air est transformé en formes que la plante peut assimiler, diminuant par conséquent le besoin d'engrais azotés artificiels (Rahman *et al* ;2023).

Outre la fixation de l'azote, certaines variétés de *Rhizobium* génèrent des métabolites secondaires comme les bactériocines, qui sont capables d'empêcher la prolifération des micro-organismes nuisibles dans le sol. Grâce à ses caractéristiques antibactériennes, *Rhizobium* présente un potentiel en tant que moyen de bio contrôle, aidant à défendre les plantes contre une variété d'agents pathogènes (Mwenda *et al*, 2023).

La compétitivité des souches *Rhizobiennes*, soit leur aptitude à coloniser la rhizosphère de manière efficace et à développer des nodules en coexistence avec d'autres micro-organismes, est un élément crucial pour la réussite de l'inoculation. Des recherches récentes ont démontré que cette capacité compétitive est modulée par des interactions complexes entre les différentes souches de *Rhizobium* et d'autres bactéries du sol, susceptibles d'influer sur la constitution des nodules et la productivité des plantes hôtes (Zhang *et al*, 2024).

Introduction

L'objectif de ce travail a été d'isoler, d'identifier et de caractériser des souches de *Rhizobium* à partir de nodules racinaires de *Vicia faba*, tout en évaluant leur capacité compétitive. Le but a été de choisir des souches performantes capables d'optimiser la symbiose *Rhizobienne* et le rendement des légumineuses.



Chapitre 1
La rhizosphère

Chapitre 1 : La rhizosphère

1.1. Définition

Le terme rhizosphère, a été introduit en 1904 par le bactériologiste Lorenz Hiltner (**Anton *et al.*, 2008**), il provient du grec, combinant « Rhizo » signifiant racine et « Sphère » désignant un champ d'influence (**Morgan *et al.*, 2005**).

Il désigne la zone du sol immédiatement adjacente aux racines, influencée directement par les exsudats racinaires. Cette région du sol, particulièrement riche en nutriments, constitue un environnement propice au développement d'une microflore dense. L'activité de ces microorganismes modifie à la fois la composition et les propriétés chimiques du sol (Hiltner, 1904). Les bactéries qui colonisent cette zone spécifique sont communément appelées les «Rhizobactéries».

La rhizosphère se divise en trois parties : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface de la racine) et l'ectorhizosphère (sol proche de la racine) (Figure 1) (**Mcnear, 2013**).

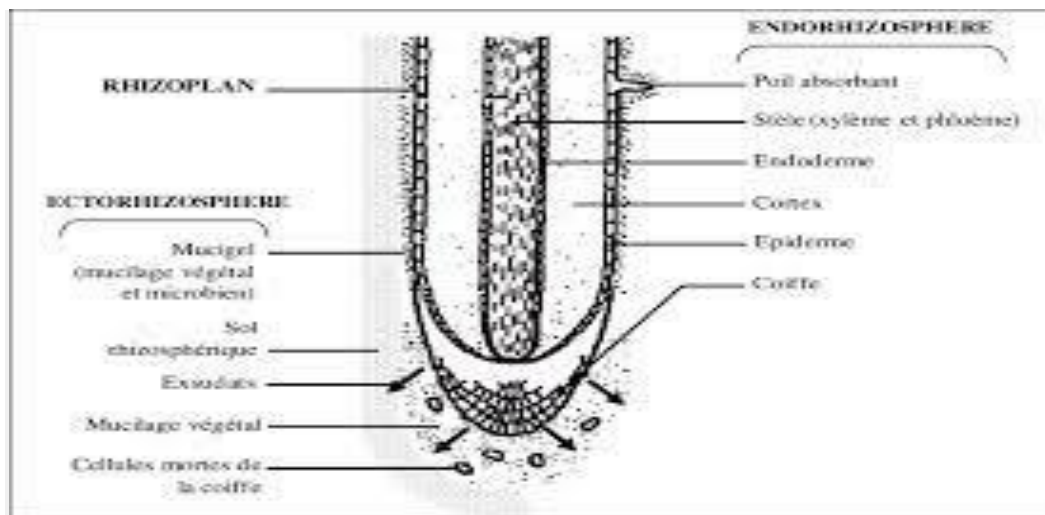


Figure 01 : Représentation des trois zones de la Rhizosphère

(Lynch, 1983).

1.2. Les légumineuses

1.2.1. Généralités

Les légumineuses sont des plantes qui appartiennent à la famille des Fabacées (*Fabaceae*). En termes de richesse spécifique, les légumineuses représentent la troisième plus grande famille d'angiospermes après les orchidées et les astéracées. Sur le plan biogéographique, les légumineuses se retrouvent dans quasiment tous les biomes terrestres, y compris ceux les plus extrêmes, et elles assument des fonctions écologiques significatives (Vincent, 2019).

1.2.2. Classification des légumineuses

Les légumineuses sont classées en trois sous-familles

1.2.2.1. *Caesalpinioideae*

Cette sous-famille regroupe essentiellement des arbres ou des arbustes que l'on trouve en zones tropicales et subtropicales, seulement 23% des espèces de *Caesalpinioideae* ont été identifiées comme aptes à la nodulation. Leurs fleurs irrégulières présentent cinq pétales non distincts et des étamines visibles de l'extérieur (Sebihi, 2008 ; Ghalem, 2009 ; Fitouri, 2011 ; Sousou, 2013).

1.2.2.2. *Mimosaideae*

Il s'agit principalement d'arbres et d'arbustes originaires des zones tropicales et subtropicales. Cette sous-famille englobe 62 genres et près de 2500 espèces, et parmi les 10% d'espèces déjà étudiées, plus de 90% présentent une nodulation. Les étamines et les petites fleurs constituent les éléments les plus visibles de la fleur (Saoudi, 2008 ; Sebihi, 2008 ; Ghalem, 2009 ; Fitouri, 2011 ; Sousou, 2013).

1.2.2.3. *Papilionideae*

Cette sous-famille est la plus variée, comportant 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement des herbes et petites plantes. On les retrouve partout dans le monde, en régions tempérées et tropicales. Parmi les espèces évaluées, 97% sont nodulées. Ces plantes ont des fleurs à forme de papillon dotées d'un pétale supérieur (Sebihi, 2008 ; Ghalem, 2009 ; Sousou, 2013).

1.3. Intérêt des légumineuses

1.3.1. Intérêt agronomique

Leur importance en agronomie est principalement due à leur capacité de fixation symbiotique de l'azote (**Journet et al., 2001**). La valeur agronomique des légumineuses alimentaires en tant que culture de rotation pour le blé est liée à leurs avantages agronomiques. Dans ce contexte, elles offrent les bénéfices suivants :

- 1- Capacité à fixer l'azote atmosphérique (N₂).
- 2- Capacité à améliorer les propriétés physiques du sol.
- 3- Options de contrôle chimique efficace contre certaines mauvaises herbes qui nuisent aux céréales (comme les folles avoines et les Bromes en Algérie) et certaines maladies fongiques affectant les céréales (comme le piétin-échaudage par exemple).
- 4- capacité à améliorer la qualité du grain de blé (**Agrichem Algérie, 2021**).

Les légumineuses ont la faculté de rendre solubles les phosphates de calcium et le phosphore par le biais de leurs exsudats racinaires (**Lazrek, 2008**).

1.3.2. Intérêt environnementale

Grâce à ses associations symbiotiques avec les *Rhizobiums*, *Retama spherocarpa* participe à l'enrichissement des sols et à la prolifération de la végétation dans les zones arides et semi-arides (**Boulilaet al., 2009**). Il prévient l'invasion des dunes de sable et les dispositifs anti-vent (**Ferry et al., 1990**). Il aide aussi à diminuer les rejets de gaz à effet de serre et à minimiser l'usage d'engrais azotés, qui participent à l'émission de CO₂ et de N₂O (**Rispail et al., 2010**).

De plus, l'érosion a souvent pour conséquence d'aggraver l'épuisement des sols tropicaux qui est déjà provoqué par une agriculture et un élevage intensifiés. Une option pour y parvenir est de cultiver des plantes qui fixent l'azote. Dans la première situation, ces plantes agissent comme un engrais vert, c'est-à-dire qu'elles sont intégrées dans le sol par labourage avant l'ensemencement des céréales. Dans le second cas, où l'on vise à protéger les sols érodés, on utilise des plantes pionnières pour stabiliser les dunes mouvantes ou les pentes dénudées, en

maintenant le sol grâce à leur solide système racinaire. Ces plantes peuvent être issues de la famille des légumineuses (**Domergue et al., 1985**).

Certaines espèces possèdent une toxicité, telles que les fèves de Calabar, les graines et les fleurs de *Spartiumjunceum*. Il convient également de mentionner son utilisation en tant

qu'insecticide : la roténone, un insecticide naturel dérivé des plantes du genre *Derris*, est le seul autorisé en agriculture biologique (**Saoudi, 2008**).

1.3.3. Intérêt alimentaire

L'attrait alimentaire est clair : cette famille se classe au deuxième rang mondial, juste après les céréales. Parmi les exemples, on peut mentionner le soja, les lentilles, les haricots et diverses autres fèves. Les graines de légumineuses renferment typiquement entre 20 et 30% de protéines et sont spécialement abondantes en lysine, un acide aminé indispensable pour le développement (**Djebali, 2008**).

Les variétés modernes de céréales à forte productivité (riz, sorgho, maïs) issues de la sélection, requièrent une grande quantité d'éléments minéraux ; elles drainent rapidement les sols tropicaux qui sont fréquemment très déficients en azote, en phosphore et en d'autres éléments essentiels.

Le développement des plantes. L'augmentation des rendements nécessite donc une quantité considérable d'engrais azotés et phosphatés. Cependant, le coût de ces engrais, généralement importés des pays développés, est incompatible avec les moyens financiers de la plupart des agriculteurs dans les pays tropicaux ou en développement (**Dommergues et al., 1985**).

1.4. La plante légumineuse *Vicia faba*. L

L'espèce *Vicia faba* L (Figure 2) est une légumineuse protéagineuse qui fait partie de la sous famille des *Papilionaceae* (**Pierre et al., 1999**). Elle est caractérisée par ses feuilles rigides portant 2 à 6 folioles (**Daoui, 2007**), des fleurs blanches avec des taches noires sur les ailes et des fruits en gousses verticales contenant des graines (**Beraud, 2007**).

L'espèce *V. faba* est divisée en trois catégories botaniques (Pesson, 1984), qui diffèrent principalement par la taille de leurs graines (Lopez-Bellido, 2005) :

Vicia faba major : connue sous le nom de fève, cette plante est cultivée pour être consommée par l'homme.

Vicia faba minor : il s'agit de la féverole qui a des graines de taille inférieure.

Vicia faba equina: incluant des graines plus légères que celles de *V. faba major*, mais plus lourdes que celles de *V. faba minor*.

La *Vicia faba* possède un système racinaire pivotant qui abrite des nodules contenant des bactéries du genre *Rhizobium*. Ces dernières établissent une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec la plante (Duc, 1997). Cela joue un rôle crucial pour l'agriculture écologique en réduisant la dépendance des agriculteurs vis-à-vis de l'utilisation massive d'engrais chimiques pour maintenir la qualité du sol et de l'eau (Sillero *et al* ; 2010).

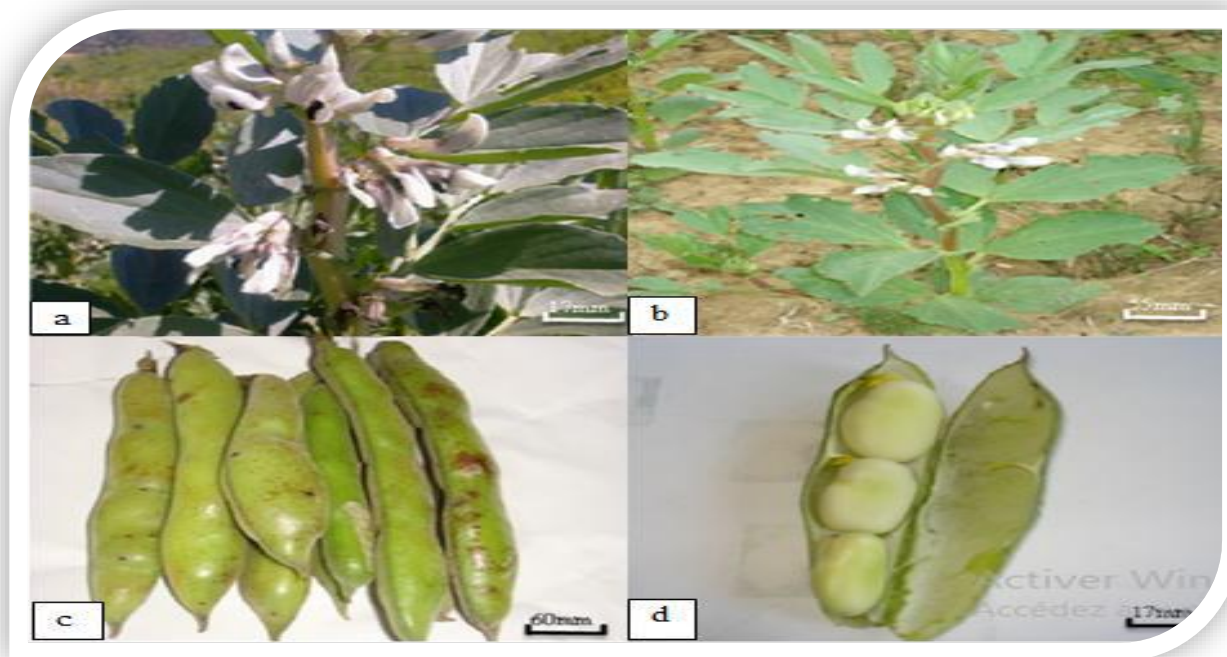


Figure 02: Les fleurs et les fruits de *V. faba* L
a : Feuilles et fleurs b : Tige c : gousses récoltées d : graines
 (Mezani, 2010).

1.5. Fixation Biologique de l'azote

1.5.1. Importance de la fixation biologique de l'azote

L'importance de la fixation biologique de l'azote, illustrée par le cas typique de la symbiose *Rhizobia*-légumineuses, est essentielle pour la productivité agricole et pour le cycle biogéochimique de l'azote qui est indispensable au maintien de la vie terrestre (**Perry et al., 2004**).

Ce processus est crucial pour la culture des plantes puisqu'il facilite la réduction des coûts, diminue les besoins en engrais azotés et aide donc à prévenir les complications environnementales associées à l'utilisation de ces fertilisants (**Jederet et al., 1996**).

L'agronomie visant un système à faible consommation d'intrants doit nécessairement s'appuyer sur le mécanisme des symbioses qui fournissent les éléments nutritifs essentiels. On fait ici notamment référence à l'association *Rhizobia*-légumineuses, qui garantit l'une des fixations les plus performantes de l'azote atmosphérique (pouvant atteindre 200-300 kg d'azote par hectare pour des légumineuses destinées au fourrage ou des plantes semencières telles que le soja) (**Adolphe et al., 2017**).

Par le biais de cette relation symbiotique, les légumineuses contribuent à la replantation des écosystèmes carencés en azote, en se positionnant comme flore pionnière et déclencheuse d'une succession écologique (**Giraud, 2007**).

1.5.2. Rôle du phosphore

Le phosphore est un élément crucial pour la plupart des légumineuses, puisqu'il se lie à l'azote (N) par l'intermédiaire du *Rhizobium*. L'apport du phosphore favorise la fixation de l'azote par les légumineuses et leur croissance efficace. De nombreuses recherches ont démontré que l'association de l'inoculation de *Rhizobium* à une fertilisation phosphatée favorise le PUE fécondé, l'expansion végétative et les critères de productivité de diverses légumineuses, y compris les pois chiches et le soja (**Ronneret et al., 2016; Kyei-Boahen et al., 2017; Ulzenet et al., 2018**).

L'inoculation du pois d'Angole avec le *Rhizobium* a stimulé la libération d'une importante quantité d'acides organiques, provoquant une augmentation de la disponibilité du

phosphore inorganique (Pi) dans la rhizosphère et une amélioration de l'efficacité d'utilisation du phosphore (Yamamoto *et al.*, 2022).

Ces observations indiquent que l'introduction de *Rhizobium* chez les légumineuses favorise leur capacité à mobiliser le phosphore, ce qui renforce la condition du phosphore dans la rhizosphère liée et, par conséquent, l'efficacité d'utilisation du phosphore fertilisé. **Mei et ses collaborateurs (2012)** ont examiné l'impact d'un système de culture mixte sur les productions de féverole et de maïs inoculés au *Rhizobium* en Chine, dans un contexte de fertilisation phosphorée. Ils ont démontré que la culture en association de féverole et de maïs avec inoculation de *Rhizobium* favorisait une augmentation du PUE fertilisé par rapport à la culture en monoculture (Massawe *et al.* ; 2017).

1.5.3. La nodulation

1.5.3.1. Processus de nodulation

L'interaction entre la plante hôte et le *Rhizobia* conduit à la production de lipo-oligosaccharides spécifiques, appelés facteurs nod, par la bactérie. Cela est provoqué par les composés phénoliques (Flavonoïdes, chémoattracteurs) exsudés par la plante hôte (Mulder *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007). Il s'agit de signaux moléculaires qui stimulent la division des cellules corticales de la racine, entraînant la création d'un nouvel organe différencié chez la plante, à savoir le nodule ou nodosité (Figure 3) (Faghire, 2013).

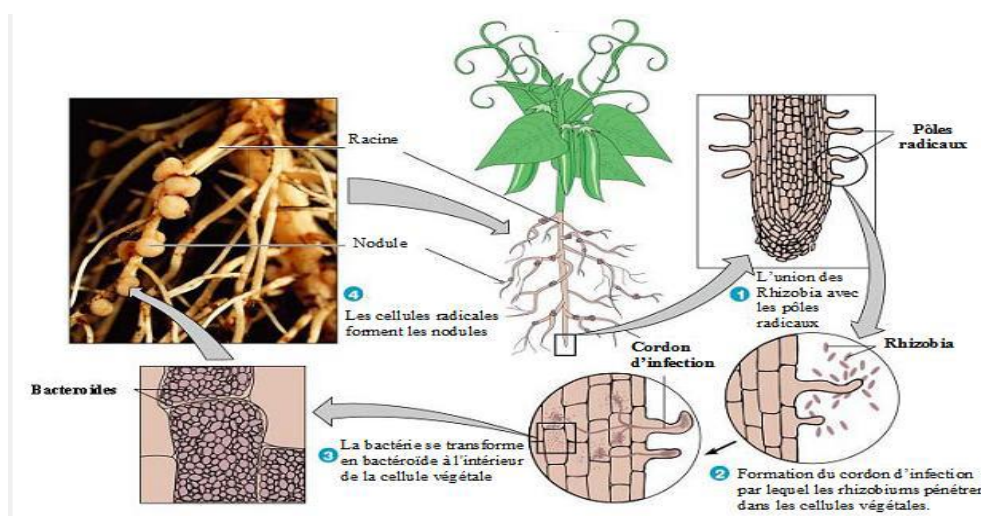


Figure 03 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose *Rhizobia*-légumineuse (Faghire, 2013)

1.5.3.2. Les étapes de la formation des nodosités

- ✓ La plante légumineuse produit des flavonoïdes, des composés que les *Rhizobiums* détectent spécifiquement, ce qui déclenche un processus de chimiotactisme où une souche bactérienne réagit de manière sélective à ces signaux.
- ✓ Les bactéries s'attachent aux poils absorbants de la plante, entraînant une stimulation de la production de nombreuses fibres absorbantes courtes.
- ✓ Les bactéries viendront par la suite percer la paroi cellulaire du poil absorbant. Le poil absorbant est sujet à une invagination qui donne naissance à un tube appelé cordon d'infection, s'enfonçant dans la cellule.
- ✓ Le fil infectieux se diffuse vers les cellules du cortex de la racine, où il se subdivise.
- ✓ Les cellules du cortex, en phase de mitose, commencent à créer un nodule, un phénomène qui devient manifestement visible.
- ✓ Le nodule persiste à croître, indiquant la phase observable du processus de création des nodosités (Figure 4) (Perrin, 2019).

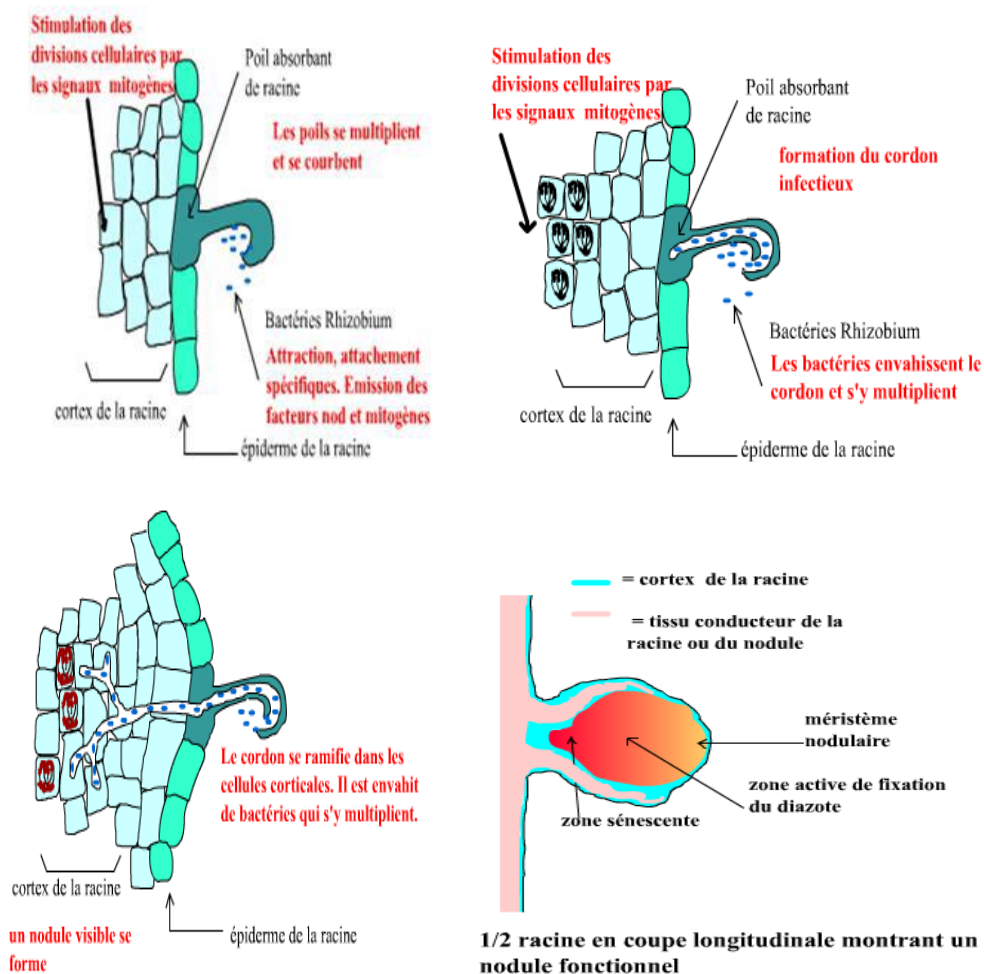


Figure 04 : Les étapes de la nodulation (Perrin, 2019).

1.6.: *Rhizobium*

1.6.1. Taxonomie de *Rhizobium*

Les *Rhizobium*, également appelés *Rhizobia* et appartenant au genre *Rhizobium*, de la famille des Rhizobiaceae.

Traditionnellement, le terme « *Rhizobium* » a été utilisé pour désigner un groupe spécifique de bactéries du sol appartenant à un ensemble de genres apparentés, capables d'établir une symbiose avec les légumineuses en formant des nodosités racinaires ou caulinaires (Springer, 2019).

Durant les vingt-cinq dernières années, des investigations approfondies ont permis de mieux comprendre la diversité des *Rhizobia*, aboutissant à l'identification et à la classification officielle de nombreux genres et espèces jusqu'alors inconnus (de Lajudie *et al.*, 2019).

Au début des années 1980, toutes les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses étaient regroupées dans un seul genre, *Rhizobium*, comprenant uniquement six espèces reconnues : *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupin* et *R. japonicum*. Depuis, les avancées scientifiques ont profondément remanié cette classification, portant le nombre d'espèces connues à environ 238, réparties dans 18 genres distincts (Shamseldin *et al.*, 2016).

La plupart des *Rhizobia* actuellement connus sont affiliés à la classe des α -*Proteobacteria*, répartis entre plusieurs familles, dont : *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Ensifer* [anciennement *Sinorhizobium*], *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*), *Methylobacteriaceae* (*Methylobacterium*, *Microvirga*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*), *Xanthobacteraceae* (*Azorhizobium*) et *Hyphomicrobiaceae* (*Devosia*). En parallèle, quelques genres de *Rhizobia* appartiennent à la classe des β -*Proteobacteria*, notamment ceux de la famille des *Burkholderiaceae*, tels que *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* et *Trinickia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2018).

La classification des *Rhizobium* a été révisée récemment, mettant en lumière une grande diversité parmi les souches fixatrices d'azote provenant de diverses légumineuses (tableau 1)

Tableau1 : Classification des *Rhizobia* selon Berrada et Benbrahim (2014).

	Source d'isolement	Référence
Famille:Rhizobiaceae		
Ordre: Rhizobiales		
Classe:Alphaproteobacteria		Frank <i>et al.</i> , 1889
Genre : <i>Rhizobium R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens,</i>	Frank <i>et al.</i> , 1889;
Symbiovarviciae	<i>Lathyrus Trifolium</i>	Jordan <i>et al.</i> , 1982
symbiovartrifolii	<i>pratensePhaseolusvulgaris</i>	Jordan <i>et al.</i> , 1982;
symbiovarphaseoli	<i>Galega, Leucaena</i>	Renan <i>et al.</i> , 2012
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	Frank <i>et al.</i> , 1889;
SymbiovarofficinalisSymbiovarorientalis	<i>Galegaofficinalis</i>	Jordan <i>et al.</i> , 1982
		Terefework et al.,1998;Lindstrom et al., 1989
		Lindstrom et al., 1989
		Martinez <i>et al.</i> , 1991
		Renan <i>et al.</i> , 2012
		Martinez <i>et al.</i> , 1991
		Lopez <i>et al.</i> , 2010

On peut classer les Rhizobia en fonction des espèces végétales avec lesquelles ils sont liés et de leur rythme de développement. On compte parmi les variétés de bactéries rhizobiums:

- *Rhizobium leguminosarum*
- *Rhizobium alarii*
- *Rhizobium lantis*
- *Rhizobium japonicum*
- *Rhizobium trifolii*
- *Rhizobium phaseolii*.
- *Rhizobium smilacinae*

1.6.2. Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont des organismes à Gram négatif, aérobies stricts, de morphologie bacillaire, et ne présentant pas de capacité de sporulation (**Jordan, 1984**).

Ce sont des bactéries qui sont habituellement mobiles, elles possèdent des flagelles qui leur permettent de se déplacer. Elles présentent une forme allongée en bâtonnet, mesurant environ 0,8 µm de diamètre pour 2 µm de longueur (figure 2). Toutefois, une fois à l'intérieur de leur hôte, leur morphologie se modifie : elles prennent alors des formes atypiques, souvent irrégulières, pouvant évoquer la lettre « Y » (**Briggs, 2021**).

Cette bactérie présente deux morphologies distinctes (**Hoben et Somasegaram, 1994**) :

- **Forme végétative** : Elle apparaît sous forme de bacilles réguliers, mesurant de 1,2 à 3 µm de longueur pour 0,5 à 0,9 µm de largeur (figure 5).

- **Forme bactéroïde** : À l'intérieur des nodules racinaires, elle évolue en bactéroïdes, affichant des morphologies variées, régulières ou irrégulières.



Figure 05 : Observation des *Rhizobia* en microscopie électronique à fort grossissement(X10000)

1.6.3. Caractères cultureux

Sur le milieu solide YMA (Yeast Mannitol Agar), *Rhizobium* développe de grandes colonies circulaires, légèrement surélevées, brillantes, de teinte blanche laiteuse, avec une consistance mucoïde prononcée (Almihyawi *et al.*, 2024).

En milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth), deux phénotypes se distinguent selon la vitesse de croissance (Amrani *et al.*, 2010) :

- *Rhizobium* à croissance rapide : une turbidité est visible au bout de 2 à 3 jours d'incubation.
- *Rhizobium* à croissance lente : le trouble du milieu ne se manifeste qu'après 5 à 7 jours d'incubation.

1.6.4. Caractères biochimiques et physiologique

Le genre *Rhizobium* possède un système respiratoire capable d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons en conditions aérobies. En conditions anaérobies, certaines espèces de ce genre sont capables de recourir aux nitrates ou aux nitrites pour assurer la continuité de la chaîne respiratoire (Werner, 1992 et Benguedouar, 2000).

Selon (Somasegaran et Hoben, 1994), les souches de *Rhizobium* présentent une croissance optimale à des températures comprises entre 25 et 30 °C et un pH situé entre 6,0 et

7,0. Elles restent toutefois capables de se développer dans des conditions plus extrêmes, avec des températures allant de 4 à 42,5 °C et un pH variant de 4,5 à 9,5.

1.6.5. Caractère génétique

La recherche sur la génétique de *Rhizobium* est rendue complexe par l'implication d'un grand nombre de gènes dans la symbiose et par les particularités génétiques propres à chaque souche (**Pelmont, 1995**).

Les bactéries du genre *Rhizobium* capables de former des nodules sur les légumineuses présentent une sensibilité notable, attribuable à la nature spécifique de leur patrimoine génétique (**Raposeiras et al., 2002**).

Le génome du *Rhizobium* présente une organisation remarquable : selon les espèces, il peut être constitué de trois types de réplicons distincts, incluant un chromosome principal de plus de 4 Mb, un mégaplasmide dont la taille varie entre 1 et 2 Mb, ainsi qu'un plasmide plus petit, généralement inférieur à 1 Mb (**Laranjo et al., 2002**).

Chez toutes les souches de *Rhizobium meliloti*, on retrouve un mégaplasmide (appelé Psym) de grande taille, qui constitue un élément notable. Ce plasmide symbiotique unique abrite les gènes essentiels à la nodulation (Nod) ainsi qu'à la fixation de l'azote (Fix et Nif).

Il contient également des gènes impliqués dans la synthèse de bactériocines et la production de pigments (**Werner, 1992 ; Pelmont, 1995 ; Patríciaetal., 1998**).



Chapitre 2
Activité antimicrobienne des
Rhizobia

Chapitre 2 : Activité antimicrobienne des Rhizobia

2.1. Compétition pour la nodulation

L'interaction entre les *Rhizobiums* et l'hôte est caractérisée par un niveau élevé de collaboration entre les deux parties, impliquant de nombreuses transmissions de signaux ainsi qu'un transfert considérable de ressources métaboliques (**Oldroyd et Downie, 2008 ; Oldroyd et al., 2011; Udvardi et Poole, 2013**). Il est également indispensable de considérer les interactions communautaires qui existent entre les Rhizobia et les micro-organismes concurrents (**Checucci et al., 2017**).

Les *Rhizobia* montrent des traits antagonistes et des aspects évolutifs de compétitivité qui peuvent aussi être identifiés (**Sachs et al., 2018**). Ainsi, la compétitivité d'une souche est rapidement identifiée comme un critère essentiel à considérer lors de l'élaboration d'inoculants de *Rhizobia* (**Schumpp et Deakin, 2010**), particulièrement pour les sols où coexistent des souches concurrentielles, mais moins performantes et plus adaptées aux conditions locales (**Estrella et al., 2009**).

Les variétés les plus compétitives peuvent aussi perdurer plus longtemps dans le sol, ce qui leur permet de dominer la population du sol et d'accroître leurs probabilités de remplir la majorité des nodules lors du prochain cycle de culture (**Daubech et al., 2017; Onishchuk et al., 2017**). Il est donc possible d'améliorer la compétitivité de l'inoculant non seulement sur le plan génétique, mais également par le contrôle de facteurs extérieurs, tels que la culture et la conservation des bactéries, la formulation des milieux de culture, l'incorporation de substances stimulantes et la production de facteurs antagonistes. En outre, pour évaluer la compétitivité d'une souche en fonction de l'occupation des nodules, il est impératif d'inclure des vérifications sur le terrain qui corroborent les résultats obtenus dans des conditions maîtrisées (**Fabiano et Arias, 1991 ; Nangul et al., 2013**).

2.2. Antagonisme entre les bactéries rhizosphériques

Les communautés microbiennes interagissent de diverses façons, soit en se soutenant mutuellement, soit en s'opposant les unes aux autres. Pour faire face aux défis et cohabiter avec d'autres microorganismes, les bactéries luttent constamment pour l'accès aux nutriments et à l'espace écologique (**Hibbing *et al.*, 2010**).

Dans le contexte de l'antagonisme bactérien, il est crucial de qualifier une souche productrice comme celle qui peut synthétiser des composés toxiques inhibant l'expansion d'autres souches non productrices, généralement réceptives à la substance (**Russel *et al.*, 2017**). La production de ces substances toxiques peut affecter la concurrence entre bactéries, avec un avantage accordé aux souches qui les produisent par rapport à celles qui ne le font pas ou qui y sont sensibles. Ces souches productrices tendent donc à dominer l'espace microbien dans lequel elles se situent (**Khare et Tavazoie, 2015**). Néanmoins, les souches productrices et sensibles réagissent différemment lorsqu'elles sont placées dans un environnement structuré comparé à un environnement non structuré (**Kelsic *et al.*, 2015 ; Chacón *et al.*, 2018**).

Dans un contexte non organisé où une population de souches sensibles a été établie, les souches productrices ne peuvent pas envahir puisqu'elles sécrètent des toxines qui freinent leur croissance comparativement aux souches sensibles. Dans un cadre organisé tel que la surface d'une plaque de gélose, les souches qui produisent et celles qui sont sensibles se développent en colonies distinctes. Les toxines émises par la colonie productrice se propagent vers les colonies sensibles, ce qui rend les ressources plus accessibles pour les souches productrices en raison de leur suraccumulation. Ainsi, bien que leur vitesse de développement soit inférieure, le nombre de souches productrices augmente par rapport aux souches sensibles (**Stubbendieck *et al.*, 2016**).

On a rapporté la production de diverses substances inhibitrices par les bactéries. Parmi celles-ci figurent des antibiotiques à large spectre, des acides organiques, des sidérophores, des composés organiques volatils, des antifongiques et des bactériocines (**Riley, 2009 ; Li *et al.*, 2013 ; Meena et Kanwar, 2015 ; Sindhu *et al.*, 2016**).

2.3. La lutte biologique par les *Rhizobia*

Les *Rhizobia* sont des micro-organismes capables de s'installer sur les racines et d'établir des liens symbiotiques avec les plantes de la famille des légumineuses (**Ndoye, 1990**).

Ils contribuent non seulement de manière significative à la fixation biologique de l'azote et à l'amélioration de la croissance des végétaux, mais diminuent aussi l'apparition de maladies dans diverses plantations (**Gopalakrishnan et al., 2015**).

Les *Rhizobia* et leurs divers genres présentent un potentiel considérable pour réguler la prolifération de plusieurs champignons phytopathogènes, tels que : *Phytophthora*, *Rhizoctonia* et *Fusarium*, ainsi que les agents pathogènes (**Chao, 1990**).

De nombreuses bactéries comme *Ralstonia* et *Xanthomonas* peuvent être nuisibles pour les plantes, cependant, les agents pathogènes les plus significatifs demeurent les champignons et les oomycètes. La production d'antibiotiques, d'enzymes mycolytiques et de sidérophores dans des conditions carencées en fer est principalement à l'origine de l'activité antagoniste des Rhizobiums (**Ongena et al., 1999 ; Mishra et al., 2006**), Outre la compétition et l'induction de résistances systémiques associées aux mécanismes de défense des plantes (**Elbadry et al., 2006**).

2.4. L'importance de l'étude des interactions entre les Rhizobia et les autres microorganismes

Il est manifeste que l'examen des interactions entre les Rhizobia et d'autres microorganismes du sol revêt une grande importance, car des recherches ont démontré que l'effet positif de ces bactéries pourrait être amplifié grâce à une inoculation conjointe avec d'autres microorganismes, entraînant ainsi un impact additif ou synergique. Par exemple, l'association de souches de rhizobium avec des souches d'*Azospirillum*, d'*Azotobacter* ou de *Pseudomonas* a démontré une hausse de la production de matière sèche, du rendement des graines et du taux d'azote dans diverses légumineuses, comparativement aux légumineuses inoculées uniquement avec des rhizobium (**Burns et al., 1981; Iruthayathas et al., 1983; Sarig et al., 1986 ; Rodelas et al., 1999; Burdman et al., 1998; Kumawat et al., 2019**).

Des recherches récentes ont également démontré que les souches autochtones peuvent stimuler le développement symbiotique grâce à un inoculant rhizobien. On a constaté que le *Rhizobium fabae* extrait du sol stimule la nodulation du *Rhizobium etli* via un processus qui dépend de la détection du quorum (**Miao et al., 2018**). Outre cet effet de synergie, on note des interactions compétitives ou antagonistes qui favorisent la survie des bactéries ou leur concurrence avec d'autres microorganismes. Dans ce cadre, la production de bactériocines représente un facteur antagoniste, à l'origine de la prédominance de certaines souches sur d'autres (**Gross et Vidaver, 1978 ; Riley et Wertz; 2002; Wheatley et Poole, 2018**).

2.5. Les bactériocines

2.5.1 Définition et généralités

Gratia a découvert les bactériocines en 1925, prouvant l'existence d'une substance inhibitrice dérivée du dialysat d'un milieu de culture *d'Escherichia coli V*. Cette substance, qui a été par la suite désignée comme colicine V, freine la prolifération *d'E.coli*. Suite à cette découverte, l'étude des bactériocines a considérablement augmenté en raison de leur application.

Au fil du temps, diverses définitions des bactériocines ont été proposées (**Dortu et al ; 2009**). Selon **Klaenhammer (1988)**, les bactériocines sont des protéines, ou des complexes protéiques, dotés d'une action antibactérienne contre des espèces similaires à la souche qui les produit. D'après **Braun et ses collaborateurs (1994)**, les bactériocines sont générées par des bactéries Gram positif et Gram négatif, toutefois, celles issues du Gram négatif font l'objet de la plus grande recherche. Elles possèdent une structure en domaines qui est engagée dans la liaison à la cellule cible. Selon **Cenatiempo et collaborateurs (1996)**, les bactériocines sont définies comme toute molécule protéique, produite par le biais de la voie ribosomique, possédant une action bactéricide ou bactériostatique.

Toutefois, selon **Rea et al. (2011)**, les bactériocines sont des peptides antimicrobiens, modifiés ou non post-traductionnellement, qui sont produits par des bactéries dotées d'un système les protégeant contre leur propre synthèse. Pour conclure, **Yang et al., (2014)** définissent les bactériocines comme des peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique produits par les bactéries, capables d'éliminer ou d'inhiber les souches bactériennes, qu'elles soient productrices ou non. Ces molécules appartiennent à la catégorie la plus abondante et diversifiée d'agents antimicrobiens, constituant ainsi une arme microbienne atypique (**Silva et al., 2018**).

L'abondance de définitions fournies par différents auteurs illustre la difficulté à caractériser les bactériocines. Néanmoins, les bactériocines sont une classe de molécules bioactives que les bactéries produisent par mécanisme ribosomique ou plasmidique afin d'assurer leur survie. Les bactériocines constituent une vaste catégorie de composés antagonistes qui diffèrent grandement en termes de poids moléculaire, de caractéristiques biochimiques, de domaine d'action et de mécanisme d'action (**Klaenhammer, 1988**).

2.5.2. Les bactériocines produites par les Rhizobia

Selon **Gross et Vidaver (1978)** et **Triplett *et al.* (1988)**, les bactériocines produites par *Rhizobium spp.* ont été identifiées comme des phages et possèdent des caractéristiques antibiotiques. Plusieurs variétés de rhizobium, y compris *Rhizobium leguminosarum* et *Bradyrhizobium sp.* (souches produisant de la bactériocine), génèrent des bactériocines qu'on appelle rhizobiocines (**Roslycky *et al.*, 1967 ; Goel *et al.*, 1999**).

L'impact de la production de bactériocine sur la compétition pour la nodulation chez le haricot a été examiné en co-inoculant une souche de *Rhizobium sp.* productrice de bactériocine avec une souche sensible dans un environnement stérile. La souche génératrice de bactériocine présentait un nombre supérieur de nodules par rapport à la souche réceptive, ce qui laisse supposer leur influence sur la compétitivité de la nodulation (**Goelet *al.*, 1999**). En effet, d'autres études ont démontré que le *Rhizobium* GR4, dans un milieu liquide aseptisé et un sol stérilisé, produit des enzymes protéolytiques et des bactériocines qui inhibent la souche *Rhizobium* S24 du haricot (**Ahlawat *et al.*, 1996**).

La génération de bactériocines par les *Rhizobia* à partir des résidus de la rhizosphère adjacente à des plantes non légumineuses (comme le lupin blanc, le blé tendre et le maïs) joue aussi un rôle crucial dans les compétitions entre espèces (**Ambika *et al.*, 2014**).

Par ailleurs, **Allaiah (2008)** a observé les caractéristiques bactériocinogènes et la résistance des souches productrices à leurs propres bactériocines. Il a souligné que cette résistance n'était pas inconditionnelle, puisque certaines souches montraient une sensibilité face à des concentrations accrues de leurs propres bactériocines.

2.5.3 Classification des bactériocines de Rhizobia

Les souches Rhizobiennes produisent des bactériocines qui ont été classées en trois groupes : petites, moyennes et grandes, selon leur taille approximative et leurs propriétés de propagation (Tableau 2).

Tableau 2: Classification des bactériocines en fonction de leur taille

Numéro	Type de bactériocines	Espèces productrices	Référence
1	Petites	<i>R. leguminosarum</i> <i>R. trifolii</i>	*Schwinghamer et Brockwell.(1978); Gross et Vidaver. (1978), Hirsch. (1979); Van Brussel <i>et al.</i> (1985); Gray <i>et al.</i> (1996), Schripsema <i>et al.</i> (1996); Goel <i>et al.</i> (1999); Yajima <i>et al.</i> (2008), Sridevi and Mallaiah. (2008). Schwinghamer et Belkengren. (1968); *Triplett et Barta (1990); Triplett(1990);Triplett. (1988)
2	Moyennes	<i>R.leguminosarumbv. viciae</i> <i>R. japonicum</i>	*Hirsch.(1979).Rodel <i>aset al.</i> (1998); Oresnik <i>et al.</i> (1999);Wisniewski.(1983), *Hafeez <i>et al.</i> (1978); Roslycky. (1965)
3	Grandes	<i>R. lupine</i>	LotzetMayer(1972); Schwinghamer <i>et al.</i> (1973)
4	Bactériocinelik (Substance inhibitrice) BLIS	<i>R.trifolii</i> <i>R. japonicum</i>	*Schwinghamer. (1971); Schwinghamer <i>et al.</i> (1973);Schwinghamer (1975),Schwinghamer et Brockwell. (1978), Joseph <i>et al.</i> (1983); Hodgson <i>et al.</i> (1985);Triplettet Barta.(1990);Grosset Vidaver.(1978)
5	Rhizobiocines	<i>Rhizobium spp.</i>	Goel <i>et al.</i> (1999);Sridevi et Mallaiah.(2008)



Chapitre 3
Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Materiel et méthodes

1. Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomedical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université de Tlemcen (Algérie). L'objectif de ce travail expérimental est l'identification et caractérisation de souches de *Rhizobium* à haut pouvoir compétitif.

2. Isolement des bactéries à partir des nodules

2.1. Description de la zone d'étude

Dans le cadre de notre étude, nous avons prélevé trois échantillons de la plante *Vicia faba* (fève) à partir de différentes zones situées dans la wilaya de Tlemcen. Le premier prélèvement a été effectué dans la région de Maghnia, tandis que le second échantillon a été récolté dans la région de Beni Boussaid, et Zerigua est la 3ème région dans laquelle l'échantillon numéro 3 a été prélevé (Figure 06). Chaque échantillon a été codé selon la région de collecte : **Maghnia (Mg)**, **Beni Boussaid (B)** et **Zerigua (Z)**. Cette démarche nous a permis d'explorer la variabilité locale de cette espèce en fonction des conditions environnementales propres à chaque site. Le travail de terrain a été enrichissant et nous a offert une expérience précieuse dans la collecte et la préparation d'échantillons pour les analyses en laboratoire.

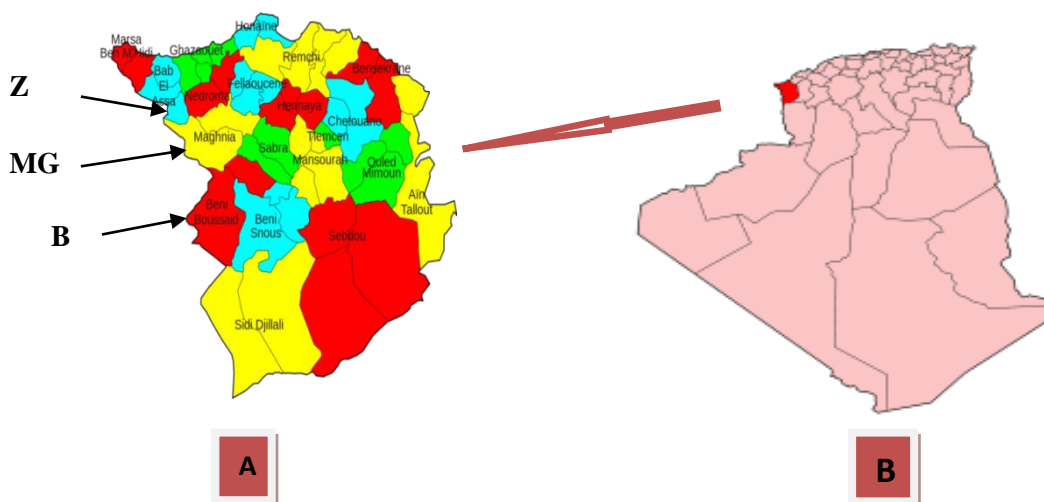


Figure 06 : Localisations géographiques des sites de prélèvement (A) : localisation des Mg, B et Z à la Wilaya de Tlemcen / (B) Localisation de Tlemcen en Algérie.

2.2. Collecte des plantes

La collecte a été effectuée en suivant les méthodes recommandées par **Vincent(1970)** ainsi que par **Somasegaran et Hoben (1994)**.

La récolte des plantes a eu lieu au mois de février, une période où les nodules au niveau des racines sont pleinement formés et facilement repérables. Pour cela, il convient de creuser jusqu'à une profondeur d'environ 20 cm afin de prélever la plante avec son système racinaire, en veillant à ne pas endommager les nodules (Figure 07).



Figure07: La zone de prélèvement (Photo personnelle)

2.3. Prélèvements des nodules

Dans le but d'isoler les nodules pour les analyses ultérieures, la plante a d'abord été sectionnée afin de séparer les parties aériennes des racines. Ces dernières ont été soigneusement nettoyées à l'eau de robinetafin d'éliminer toutes les impuretés. Les nodules, de petite taille (1 à 2 mm), ont été extraits avec précaution à l'aide de ciseaux, puis immédiatement séchés avec du papier absorbant pour éviter toute altération (Figure 08).



**Figure 08 : La plante de la fève extraite avec son appareil racinaire
(Photo personnelle)**

2.4. Stérilisation des nodules

Pour assurer leur conservation dans un agent dessicatif, les nodules subissent d'abord une phase de réhydratation en étant placés toute une nuit dans de l'eau froide au réfrigérateur. Ils sont ensuite soumis à une désinfection rapide par immersion dans de l'éthanol absolu pendant 5 à 10 secondes, avant d'être traités pendant 3 minutes dans une solution acidifiée de chlorure de mercure (HgCl_2) à 0,1 % (p/v) (Figure 09). Cette étape est suivie d'un rinçage rigoureux à l'eau distillée stérile, répété dix fois (Vincent, 1970).



Figure09 : La stérilisation des nodules (Photos personnelles).

2.5.Écrasement des nodules

À l'aide d'une pince à bout émoussé, les nodules stérilisés ont été délicatement incisés en surface dans une large goutte d'eau stérile déposée dans une boîte de Pétri. Par la suite, ils ont été broyés dans des tubes à hémolyse stériles à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (Figure10).



Figure10 : Ecrasement des nodules (Photo personnelle).

3 .Les milieux de culture utilisés

Quatre milieux de culture ont été utilisés dans ce travail, permettant l'isolement et la caractérisation des souches de *Rhizobium* (tableau3).

Tableau 3 : Milieux de culture employés pour l'isolement et la caractérisation des souches de *Rhizobium*

Milieu	Composition Ajout	Utilité	Référence
YMA	milieu solide à base de mannitol et d'extrait de levure,	Isolement spécifique de la bactérie <i>Rhizobium</i>	Annexe1-figure
YMA+RC	YMA +10ml de solution de rouge de congo	Mise en évidence de certaines caractéristiques des colonies bactériennes	Annexe1-figure
YMA+BTB	YMA +ajout de bleu de bromothymol	Observation des changements de pH aide à la différenciation des bactéries	Annexe1-figure
Milieu GPA	Milieu spécifique pour test de différenciation	Permet de distinguer <i>Rhizobium</i> de <i>Agrobacterium</i>	Annexe1-figure

4. Isolement et purification des isolats

L'isolement a été effectué en suivant la méthode décrite par **Vincent (1970)**,

le jus de nodule est prélevé à l'aide d'une anse de platine stérilisée par flambage au bec Bunsen, puis étalé sur une boîte de Pétri contenant un milieu sélectif, le Yeast-Mannitol Agar (**YMA**) supplémenté de rouge Congo, selon la méthode décrite par **Vincent (1970)** (Annexes 1). L'ensemencement a été réalisé selon la technique des quatre quadrants afin d'obtenir des colonies isolées, condition essentielle pour leur purification et leur caractérisation ultérieure.

Les boîtes ensemencées ont été incubées à 28°C pendant une durée de trois jours. À l'issue de cette période, les colonies présentant une morphologie similaire ont été sélectionnées, puis repiquées dans le but d'assurer leur purification. Ces souches purifiées ont ensuite été cultivées sur de nouvelles boîtes contenant le milieu YMA (Annexe 1) pour une meilleure conservation et une caractérisation ultérieure.

5. Caractères morphologiques

5.1. Examen macroscopique

L'observation à l'échelle macroscopique des colonies s'est appuyée sur différents critères, parmi lesquels la morphologie, la texture et le diamètre des colonies.

5.2. Etat frais

L'analyse à l'état frais permet l'identification rapide de la forme cellulaire, du type de mobilité et du mode de regroupement des bactéries. Elle s'effectue par observation microscopique directe d'une culture liquide en croissance (Joffin et Leyral, 2006).

5.3. Coloration de Gram

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la technique de coloration de Gram, l'une des méthodes de coloration les plus couramment employées. Elle permet de classer les bactéries en deux catégories distinctes : les Gram positives et les Gram négatives (Tortora, 2003).

À partir de cultures fraîches sur milieu YMB (voir Annexe 01) pour chaque souche, une préparation est réalisée en étalant une fine couche sur une lame, à l'aide d'une goutte d'eau distillée stérile. La lame est ensuite séchée, puis fixée à la flamme d'un bec Bunsen .

5.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) :

L'analyse microscopique des souches de *Rhizobium* a été effectuée grâce à un microscope électronique à balayage de type (Hitachi TM1000), au niveau du Département de Physique de l'Université de Tlemcen, elle nous a permis d'observer avec précision les structures superficielles des frottis réalisés à partir des colonies suspectes.

6. Caractères biochimiques

6.1. Test de catalase

L'activité de la catalase a été mise en évidence en appliquant une colonie bactérienne sur une lame de verre propre, suivie de l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10

volumes. La présence de bulles, résultant du dégagement d'oxygène, indique une réaction positive (Lévy *et al.*, 1992).

6.2. Test d'oxydase

Pour réaliser le test de l'oxydase, des bandelettes imprégnées d'oxalate de N-diméthylparaphénylènediamine ont été utilisées. Une réaction positive se manifeste par une coloration violet foncé rapide, traduisant la dégradation du substrat par les bactéries oxydase-positives (Marchall *et al.*, 1982).

6.3. Test du Citrate de Simmons

Un milieu incliné de citrate Simmons a servi à tester la capacité de nos souches à utiliser le citrate comme unique source de carbone, ce qui implique l'activité de la citrate perméase et de la citrate hydrolase. La surface du milieu a étéensemencée par des stries longitudinales à partir d'une culture cultivée sur milieu YMB (Annexe 1).

Après incubation à 28 °C, l'utilisation du citrate entraîne une augmentation du pH du milieu, se traduisant par une coloration bleue caractéristique. En absence d'activité, le milieu ne subit aucune modification chromatique et reste vert (Williams, 2009).

6.4. Test de bleu de bromothymol (BTB)

La production d'acidité ou d'alcalinité par les souches rhizobiennes a été évaluée en cultivant les souches, issues de cultures en bouillon de 48 heures, sur un milieu YMA, additionné de bleu de bromothymol (BTB) à 0,026 % (p/v) (Annexe 1).

Après une incubation à 28 °C pendant 3 à 7 jours, les boîtes ont été observées pour détecter un changement de couleur du milieu, indicatif d'une variation du pH. Un virage de couleur vers le jaune, traduisant une acidification du milieu, est associé aux souches de *Rhizobium* à croissance rapide. En revanche, un changement vers le bleu, révélateur d'une alcalinisation, correspond aux souches de *Bradyrhizobium*, caractérisées par une croissance lente (Legesse, 2016).

6.5. Test de rouge de Congo (RC)

La production de polysaccharides par la bactérie *Rhizobium* a été révélée par l'ajout de 1 % de RC au milieu YMA (annexe 1). La coloration rouge des colonies, résultant de l'absorption du colorant, témoigne de cette production (Ondieki *et al.*, 2017).

6.6. Test de GPA

Des colonies provenant de cultures pures sur le milieu YMA ont été ensemencées par stries sur un milieu GPA solide (annexe1). Les boîtes ont ensuite été incubées à une température de 28 °C pendant 5 à 7 jours. L'absence de croissance sur le milieu GPA constitue un indicateur clé, suggérant qu'il s'agit bien de *Rhizobium*, en raison de leur incapacité à utiliser la peptone comme source de carbone.

À l'inverse, un changement de couleur du milieu révèle généralement la présence de contaminants, notamment des bactéries comme *Agrobacterium* (Kbede *et al.*, 2022).

6.7. Réduction des nitrates

La nitrate réductase est une enzyme clé dans le processus d'assimilation de l'azote, catalysant la transformation des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-). Pour mettre en évidence l'activité de cette enzyme, 5 ml de bouillon nitraté sont ensemencés avec la souche bactérienne étudiée, puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

À l'issue de l'incubation, on ajoute successivement trois gouttes des réactifs nitrate 1 et nitrate 2. L'apparition d'une coloration rouge traduit la présence de nitrites, preuve que la réduction des nitrates a eu lieu : la souche est alors considérée comme nitrate réductase positive.

Si aucune coloration n'est observée, on introduit de la poudre de zinc dans le milieu. Si une couleur rouge apparaît après cette addition, cela signifie que les nitrates restants ont été réduits chimiquement par le zinc, indiquant que la bactérie ne possède pas l'enzyme : elle est donc nitrate réductase négative. En revanche, l'absence de coloration même après ajout du zinc confirme que les nitrates ont déjà été totalement réduits en d'autres composés, ce qui indique une activité nitrate réductase positive (Lucinski *et al.*, 2001).

7. Conservation des souches

Nous avons utilisé deux méthodes de conservation :

7.1. Conservation à court terme

La conservation des souches de *Rhizobium* a été réalisée en utilisant un milieu YMA coulé dans des tubes à essai positionnés en pente afin d'offrir une surface d'ensemencement adéquate. Une fois la gélose solidifiée, une colonie issue d'une culture pure a été déposée en surface à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes ont ensuite été incubés à 28 °C jusqu'à l'apparition d'une croissance bactérienne. Après incubation, les tubes ont été étiquetés et conservés à 4 °C. Cette méthode assure une viabilité des souches pendant une période allant de un à six mois (Vincent, 1970).

7.2. Conservation à long terme

Cette technique assure une conservation efficace des souches bactériennes sur une longue durée. Une colonie pure de *Rhizobium* est d'abord cultivée dans 5 mL de bouillon YMB, incubée à 28 °C jusqu'à l'observation d'une turbidité indiquant la croissance bactérienne.

Par la suite, 5 mL de glycérol stérile sont ajoutés au milieu afin de protéger les cellules contre les dommages liés à la congélation. Le mélange obtenu est transféré dans des tubes àEppendorf stériles, étiquetés et placés dans des boîtes de conservation appropriées. Enfin, les échantillons sont congelés à -20 °C pour assurer leur viabilité à long terme (Shetta et al., 2011).

8. Caractères physiologiques

La croissance des bactéries du sol peut être fortement influencée par certains facteurs environnementaux. Parmi les plus importants figurent le pH (qui détermine l'acidité ou l'alcalinité du sol), la température (qui agit sur le métabolisme et la reproduction bactérienne) ainsi que la salinité, exprimée par la concentration en NaCl (source de stress pour les micro-organismes).

8.1. L'effet de pH

Les souches ont été testées pour leur tolérance au pH sur milieu YeastMannitol(YM) en phase liquide et solide, avec une adaptation à des valeurs de pH spécifiques : 4, 5, 6, 7, 8 et 9, préparés avec des tampons pH. L'élaboration des solutions tampons phosphate et citrate-

phosphate, employées pour le calibrage du pH (Tableau en annexe 2), s'est effectuée en conformité avec les méthodes standards exposées dans les manuels de chimie analytique et microbiologie (Harris, 2015 ; Atlas, 2010).

Elles ont été incubées à une température de 28°C pendant une durée variant entre 3 et 7 jours, conformément aux procédures établies par Vincent (1970) et Somageraran et Hoben (1985).

8.2. Effet de la température (°C)

Pour observer la croissance des isolats en fonction de la température, les souches ont été cultivées à des températures de : 4°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C et 50°C. La durée de culture varie entre 3 et 7 jours, en fonction du type de croissance des souches (rapide ou lente). Les souches ont été cultivées sur les milieux YMA et YMB. Dans un milieu liquide, les tubes contenant 5 ml d'une solution YMB ont été inoculés avec 100 µl d'un ensemencement frais et placés dans un incubateur-agitateur réglé à 150 tours par minute. Sur un milieu YMA robuste, l'inoculation des divers isolats sur la boîte de Petri a été réalisée en utilisant la méthode des quatre quadrants ou par épuisement. On suit les protocoles tels que décrits par Vincent (1970) et Somageraran et Hoben (1985).

9. Activité antagoniste in vitro des *Rhizobia* vis à vis des souches bactériennes testées

L'effet antimicrobien du surnageant de culture de la souche *Rhizobium* sur différentes souches bactériennes testées à l'aide d'un essai de diffusion en gélose. La technique consiste à inoculer les souches testées (tableau 4) en stries sur une boîte de gélose. Ensuite, 50 microlitres du surnageant de culture de *Rhizobium* ont été ajoutés dans les puits préalablement préparés sur la même boîte de gélose Mueller-Hinton. Les boîtes ont été incubées à une température de 37 °C pendant une durée de 24 heures. L'activité antibactérienne a été déterminée en évaluant le diamètre de la zone d'inhibition créée autour du puits (Figure 11)(Upadhyay et al ; 2020 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983).

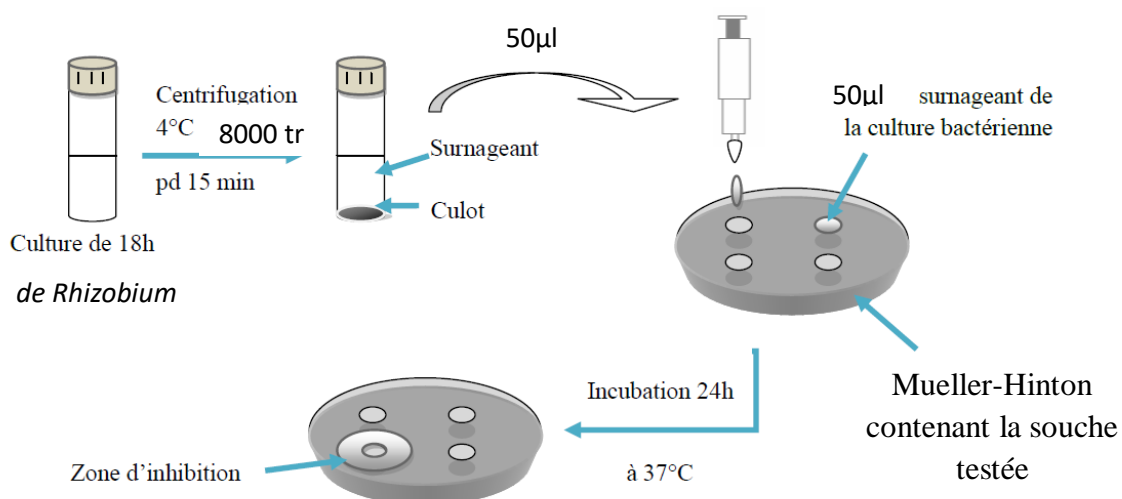


Figure 11 : La technique de diffusion en puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983).

Tableau 4 : Les souches testées.

Souches testées	Origine
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Souche de référence ATCC 19606
<i>Staphylococcus aureus</i>	Souche de référence ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Staphylococcus caprae</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Proteus mirabilis</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Serratia piquefiense</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Enterococcus faecium</i> 8DZ	Fournies par un étudiant de notre laboratoire
<i>Enterococcus faecium</i> 545	Fournies par un étudiant de notre laboratoire



Chapitre 4
Résultats et discussion

Chapitre 4 : résultats et discussion

1. Isolement et purification des isolats

L'isolement et purification des isolats après écrasement des nodules de plante légumineuse *Vicia faba* à 28 °C, nous avons pu isoler 24 souches bactériennes de trois régions différentes présentant des caractéristiques culturales identiques (tableau 5). La similarité observée au niveau de la morphologie et de la pigmentation des colonies nous a orientés vers une identification probable au sein du genre *Rhizobium*.

Tableau 5 : Les zones de prélèvement des échantillons.

Prélèvement	Nombre de souches
Maghnia	12
Beni Boussaid	6
Zerigua	6

2. Caractères morphologiques

2.1 Examen macroscopique

Après 8 à 10 jours d'incubation à 28 °C sur milieu YMA (Annexe 1), des colonies de *Rhizobium* sont apparues. Leur croissance lente confirme l'appartenance au genre (Moreira, 1993). Les colonies sont blanches, lisses, circulaires, de 1 à 2 mm de diamètre, à contours nets. Leur aspect est translucide ou opaque (Figure 12).

La viscosité des colonies a été associée à la production d'exopolysaccharides, comme l'ont démontré (Mir *et al* ;2024).

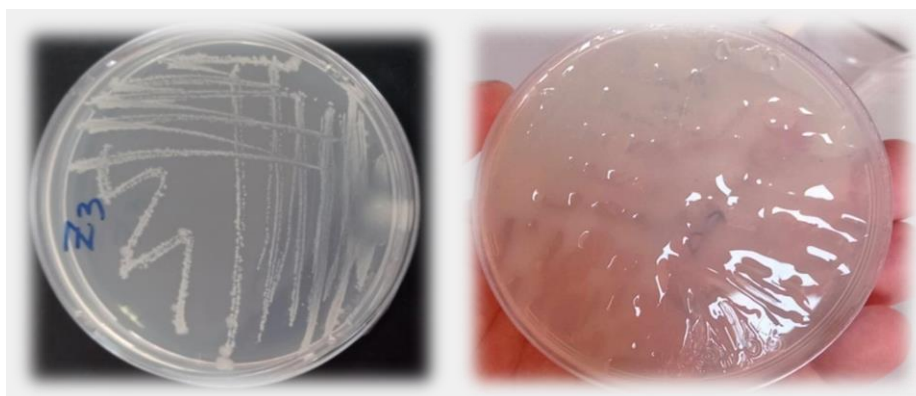


Figure 12 : Résultat des *Rhizobium* sur YMA (Photos personnelles)

2.2 Examen microscopique

2.2.1 Observation à l'état frais

À l'aide d'un microscope optique avec un grossissement de $\times 40$, l'observation à l'état frais a révélé la présence de coccobacilles animés d'une mobilité propre. Cette capacité de déplacement s'explique par la présence de flagelles, de fins prolongements insérés dans leur paroi cellulaire. Grâce à ces structures, les bactéries peuvent se mouvoir dans leur environnement, en particulier vers les zones racinaires, où elles s'installent pour participer à la fixation symbiotique de l'azote. Cette aptitude à se déplacer et à interagir avec leur milieu ne se limite pas aux plantes : elles peuvent aussi tisser des relations avec d'autres micro-organismes. Certaines coopèrent, notamment avec les PGPR (bactéries rhizosphériques promotrices de croissance végétale), tandis que d'autres adoptent une posture de compétition, inhibant ainsi les bactéries pathogènes nuisibles aux plantes (El-Haloui *et al.*, 1986).

2.2.2 Coloration de Gram

La coloration de Gram effectuée sur les différents isolats a révélé un aspect homogène : la majorité des souches présentent une forme bacillaire et certaine souche sous forme coccobacillaire (Tableau 6), et réagissent comme des bactéries à Gram négatif (Figure 13). Ce comportement est bien documenté dans la littérature et constitue une caractéristique commune au genre *Rhizobium*. La coloration rose observée s'explique par la structure particulière de la paroi cellulaire de ces bactéries. En effet, la paroi contient une fine couche de peptidoglycane entourée de lipopolysaccharides, ce qui rend la rétention du violet de cristal impossible après le traitement à l'alcool. Ce dernier provoque la décoloration, permettant à la fuchsine (colorant secondaire) de se fixer, donnant ainsi la teinte rosée typique des Gram négatif (Degefu *et al.*, 2018 ; Wulandari *et al.*, 2024).

Tableau 6:Caractéristiques microscopiques et macroscopique des isolats

Souches	Couleur	Forme	Viscosité
Mg1	Crème	Bacille	+++
Mg2	Crème	Bacille	+++
Mg3	Crème	Bacille	+++
Mg4	Crème	Bacille	+++
Mg5	Crème	Bacille	+++
Mg6	Crème	coccobacille	+++
Mg7	Crème	coccobacille	+++
Mg8	Crème	Bacille	+++
Mg9	Crème	Bacille	+++
Mg10	Crème	Bacille	+++
Mg11	Crème	Bacille	+++
Mg12	Crème	Bacille	+++
B1	Crème	Bacille	++
B2	Crème	Bacille	++
B3	Crème	Bacille	++
B4	Crème	coccobacille	++
B5	Crème	coccobacille	++
B6	Crème	coccobacille	++
Z1	Crème	Bacille	+
Z2	Crème	Bacille	+
Z3	Crème	Bacille	+
Z4	Crème	Bacille	+
Z5	Crème	Bacille	+
Z6	Crème	coccobacille	+

+ : Faible viscosité ++ : Viscosité moyenne

+++ : très visqueuse

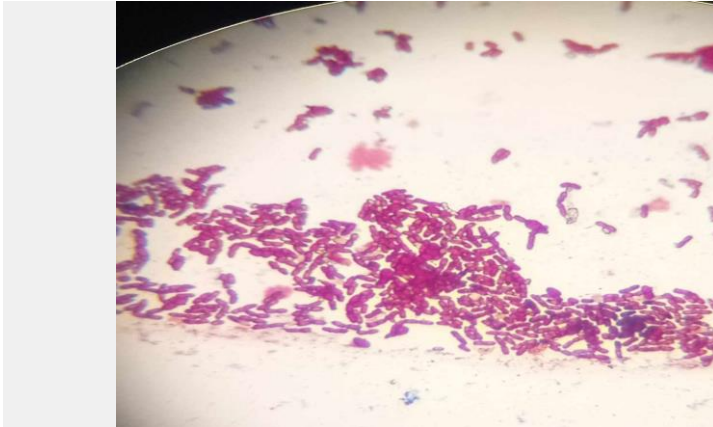


Figure 13 : Résultat de coloration de Gram (G×100)

(Photo personnelle).

3. Tests biochimiques

3. 1 Test de catalase

Les conclusions tirées lors de l'interaction avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été favorables pour toutes les souches examinées, comme le montre la libération de bulles d'air autour des colonies bactériennes (Figure 14), attestant ainsi de la présence de l'enzyme (catalase+) qui représente l'une des propriétés biochimiques des *Rhizobium*. Ces conclusions correspondent étroitement à celles établies par **Paudyal et al en (2021)**.

Les *Rhizobium* exploitent un métabolisme aérobie couplé à la phosphorylation oxydative pour produire l'ATP et les équivalents réducteurs nécessaires à la fixation de l'azote ainsi qu'à la formation des nodules racinaires (**Ywan et al ; 2005**).

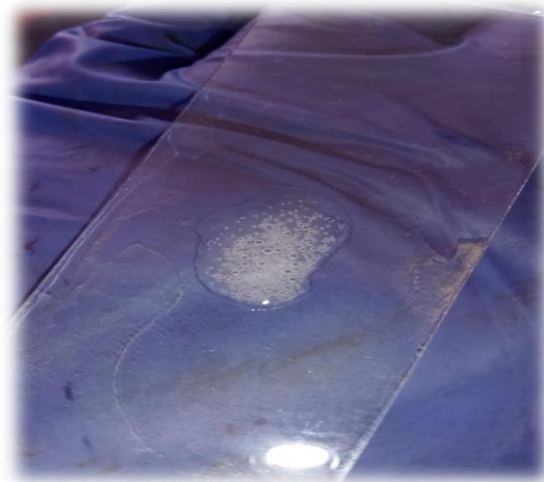


Figure 14 : Résultat de test de catalase (Photo personnelle).

3.2 Test d'oxydase

Après avoir observé une coloration bleu sombre immédiate sur la bandelette (Figure 15), toutes les souches examinées ont montré une activité oxydase positive, indiquant ainsi qu'elles contiennent cette enzyme.

Une recherche menée par **Tian *et al.* (2008)** sur des *Rhizobia* qui nodule la fève a mis en évidence des conclusions comparables aux nôtres.

Cette réaction traduit la présence de l'enzyme cytochrome oxydase, impliquée dans la chaîne respiratoire cytochromique des bactéries (**Shree *et al.*, 2022**).

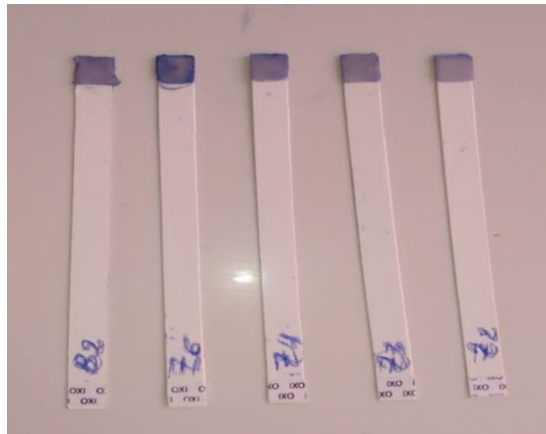


Figure 15: Résultat de test d'oxydase (Photo personnelle).

3.3 Test de citrate de Simmons

Toutes les souches isolées des nodules de l'espèce *Vicia faba* ont montré un résultat négatif au test du citrate (Figure 16), indiquant que ces bactéries ne se servent pas du citrate comme unique source de carbone.

Ce constat est en parfaite concordance avec les données obtenues par **Shree *et al.* (2022)**, et confirme un profil biochimique caractéristique des souches de *Rhizobium*, connues pour leur incapacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone.



Figure16 : Résultat typique du test de citrate (Photo personnelle).

3.4 YMA+ Bleu de Bromothymol

Un changement de couleur du BTB, passant du bleu au jaune, a été observé après 24 heures d'incubation des isolats, traduisant une acidification du milieu (Figure 17). Ce phénomène indique une activité métabolique rapide, typique des souches à croissance rapide. Ces observations sont en accord avec les critères de classification proposés par **Jordan (1984), Beck et al. (1993) et Pagano (2008)**.



Figure 17 : Résultat de culture sur YMA+ bleu de Bromothymol (Photo personnelle).

3.5. YMA+ RC

Nous avons effectué de multiples purifications sur le milieu YMA enrichi de rouge Congo pour les isolats présentant une apparence uniforme. Les colonies ont exhibé une texture visqueuse, arrondie, mucilagineuse et légèrement teintée de rose, indiquant que les isolats n'ont pas ou peu absorbé le colorant (Figure 18).

Ce constat est en accord avec les études de **Samasegaran et Hoben (1985)**, qui ont démontré que les colonies de *Rhizobium* ne devraient montrer qu'une faible présence ou aucune absorption du rouge Congo après une incubation de 48 à 72 heures à 28°C.

Des études récentes qui ont démontré que les isolats de *Rhizobium* absorbent peu ou pas du tout le rouge Congo, une caractéristique typique des *Rhizobactéries* (**Degefu et al., 2018 ; Purwaningsih et al., 2018**).



Figure 18 : Résultat de croissance sur YMA+RC (Photo personnelle).

3.6 Test de GPA

Après trois jours d'incubation à 28 °C sur le milieu GPA, aucune croissance bactérienne ni modification de la couleur du milieu n'ont été observées (Figure 19). Ce résultat témoigne de la pureté des isolats obtenus. Il est en accord avec les observations précédentes de **Singh et al. (2008)** ainsi que de **Pervin et al. (2017)**. Le milieu GPA est couramment utilisé pour distinguer *Agrobacterium* de *Rhizobium*, notamment à partir de nodules de légumineuses, en se basant sur deux critères : la capacité de croissance sur ce milieu et l'altération du pH, traduite par un changement de couleur. L'absence de ces réactions dans notre cas confirme l'absence de contamination par *Agrobacterium*.

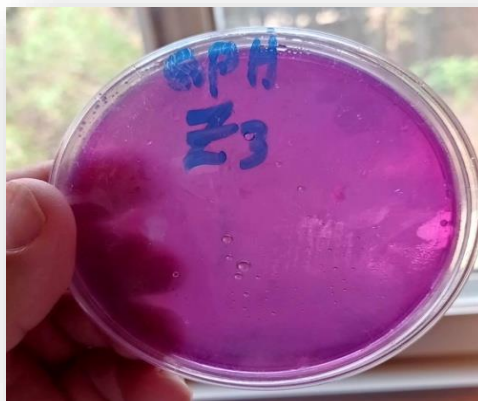


Figure 19 Résultat de croissance sur milieu GPA (Photo personnelle).

3.7. Test de nitrate réductase

Après avoir observé une turbidité dans les tubes après incubation à 28°C pendant 24h pour la croissance bactérienne, des réactifs nitrates 1 et 2 ont été rajoutés, certaines souches ont présenté une coloration rouge, indiquant la présence de l'enzyme nitrate réductase (Figure20). En revanche, d'autres souches n'ont montré aucun changement de couleur. L'ajout de poudre de zinc a alors été nécessaire, si après quelques secondes le tube est toujours incolore, le résultat est positif (Tableau7). Cette capacité à réduire le nitrate en nitrite est un critère important pour évaluer le rôle potentiel des souches de *Rhizobium* dans la fixation de l'azote atmosphérique (Lucinski *et al.*, 2001).

Tableau07 : résultats de réduction des nitrates par les isolats et les souches testées

Souche	Mg 1	Mg2	Mg3	Mg6	B2	B4	Z3	Z6	Z4
Résultats	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Ajout de Zinc	/	/	/	-	-	-	-	/	-

- réaction Négatif / + réaction Positif



Figure 20 : Résultat du test de réduction des nitrates par les souches Rhizobium (Photo personnelle)

4. Etude des caractères physiologiques des isolats

Cette étude a porté sur l'influence du pH et de la température sur la croissance de souches de *Rhizobium* isolées de la région de Tlemcen. Les cultures ont été incubées pendant 48H à 28 °C.

4. 1.Effet du pH sur la croissance des isolats

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des isolats sont présentés dans la figure 21. Ils démontrent le pourcentage de souches tolérantes aux différents pH testés sur milieu solide et liquide. Les souches testées ont présenté une faible prolifération à pH 4(4%) , pH 5(12%) , une prolifération considérable au pH à 6 (91%), tous les isolats présentent un développement à 100% à pH 6,8 , 7 et 8 ; Une prolifération significative même au pH 9(83%).

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux, de **Graham (1992 et 1994)** ; **Thami-Alami et al en (2010)** et **Elboutahiri et al. en (2010)** qui ont démontré que les variétés de *Sinorhizobium* qui nodulent la luzerne présentent une sensibilité au pH très acide de 3,5 et

Howieson *et al.* (1988), DelPapa *et al.* (1999) ont montré qu'à un pH de 5,5 à 6,0, la majorité des isolats se développent.

En comparaison, l'alcalinité semble poser moins de problèmes aux *Rhizobia*. Selon Jordan (1984), la plupart de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, ce qui est cohérent avec nos résultats (Figure 22).

Le pH du sol des trois stations à l'origine de nos prélèvements est alcalin 7 à 8 (Tableau 8), et selon Djili (2000), tous les sols contenant du gypse dans le nord de l'Algérie affichent un pH supérieur à 7.

Selon Rodrigues *et al.* (2006), le pH 6,5 à 7 est le pH le plus optimal pour favoriser la croissance des bactéries qui nodulent les légumineuses.

Les *Rhizobia* sont généralement classés parmi les bactéries neutrophiles, leur capacité à s'adapter à différentes conditions de pH reste remarquable (El-Hilali, 2006).

Tableau 08 : pH du sol des trois stations de prélèvements

Stations	Maghnia	Zerigua	Beni Boussaid
pH	8,03	8,25	7,85

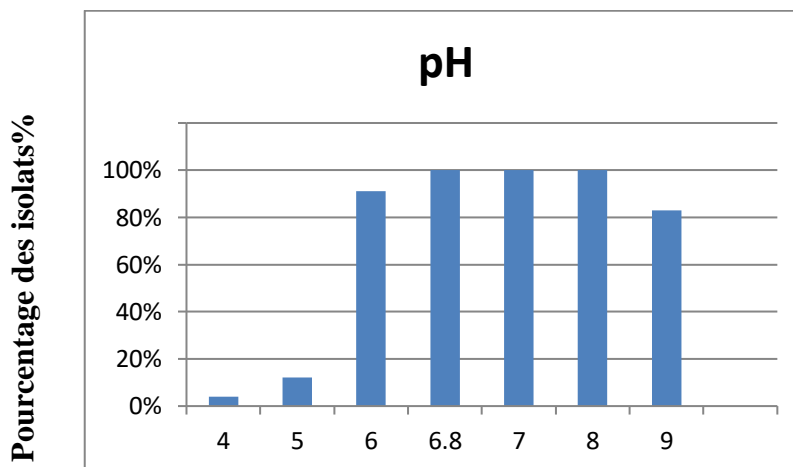


Figure 21 : Effet du pH sur la croissance des isolats



A

B

Figure 22 : Effet du pH sur la croissance des souches : A en milieu liquide ;B en milieu solide (Photos personnelles).

4.2. Effet de la température

Le test de tolérance à la température sur milieu YEM solide a montré que les isolats présentent une meilleure croissance avec développement de colonies, aux températures comprises entre 28°C et 30°C (100%) (Figure 23).

Aucune croissance à 4°C et 37°C à part la souche Z qui a montré une faible croissance (12%).

Aucune croissance à 45°C et 50°C n'a été observée pour toutes les souches testées (0%) (Figure 24).

Comme déjà mentionné par **Graham (1992)** et **Zahran (1999)**, qui ont rapporté que ces bactéries se développent préférentiellement entre 28°C et 31°C, et que nombre d'entre elles ne survivent pas à une température de 37°C.

Selon **Graham (1992)**, les *Rhizobia* sont habituellement des bactéries mésophiles qui peuvent se développer dans une gamme de températures allant de 10°C à 37°C.

Les températures élevées réduisent la survie et l'expansion de la colonie de *Rhizobium* (**Hungria et Vargas, 2000 ; Florentino et al ; 2010**).

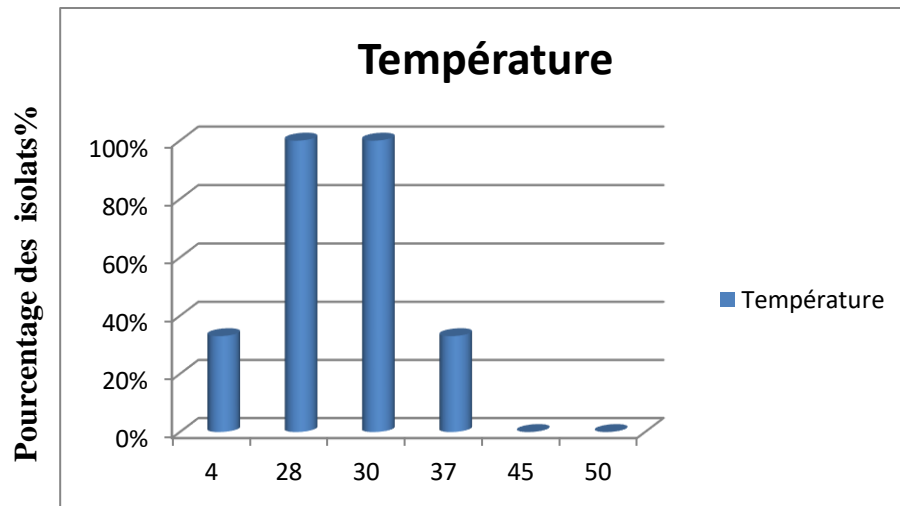


Figure 23 : Effet de la température sur la croissance des isolats

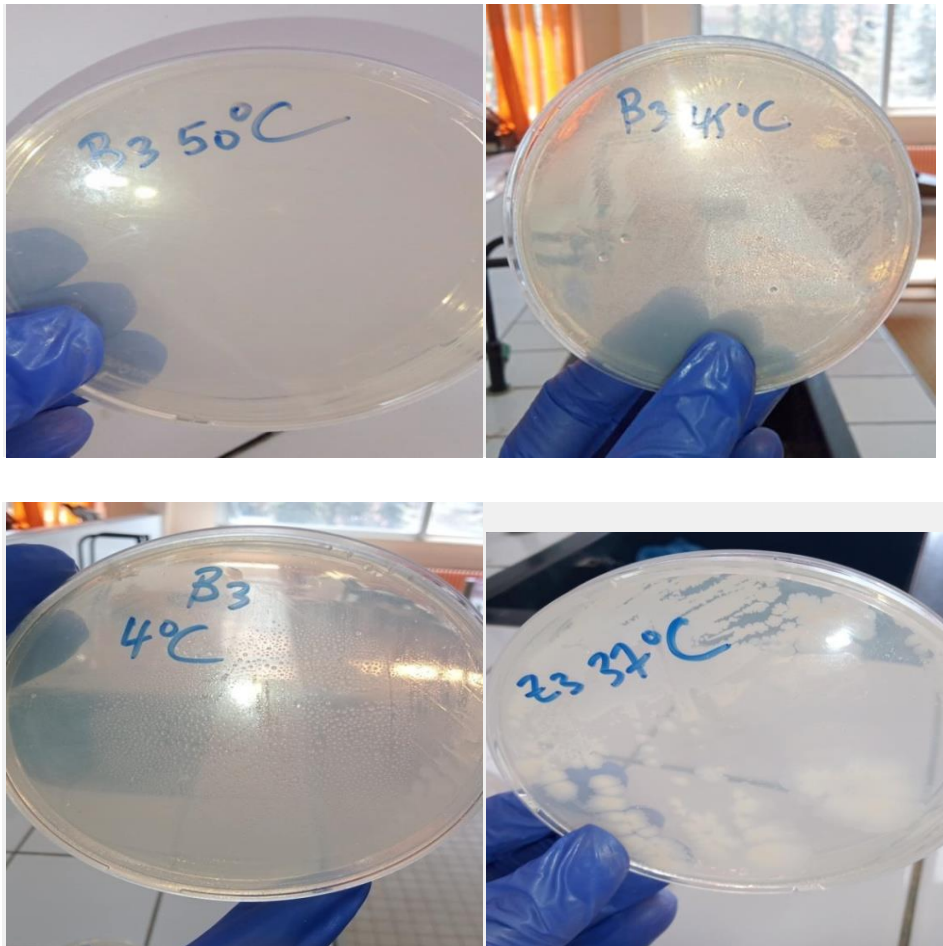


Figure 24 : Effet de la température sur la croissance des souches
(Photos personnelles).

5. Activité antagoniste in vitro des *Rhizobia* vis à vis des souches bactériennes testées

La méthode de **Barefoot et Klaenhammer (1983)** a été réalisée dans le but de détecter les souches de *Rhizobium* produisant des substances antimicrobiennes. Cette technique facilite le contact entre le surnageant des isolats et les souches pathogènes. L'apparition de zones d'inhibition autour des puits est le résultat de l'activité inhibitrice.

Les observations faites montrent qu'il n'y a pas eu de zones d'inhibition autour des puits, nous avons noté une expansion localisée de certaines souches de *Rhizobium* (la souche Z à la Figure 25) autour des puits contenant son propre surnageant sur une gélose inoculée avec des souches pathogènes. Ce constat pourrait être le résultat d'une contamination résiduelle du surnageant par des cellules viables de *Rhizobium*, en dépit de la centrifugation.

Elle peut également suggérer que le surnageant renfermait des métabolites propices à la croissance de la souche elle-même, dévoilant une activité d'autostimulation plutôt qu'antibactérienne.

Roslycky (1965 ; 1967) a signalé un composé antibactérien comme étant une rhizobiocine, ayant testé 136 souches de *Rhizobium* sp. issues de différents groupes d'inoculation croisée pour la production de bactériocines. Ce scientifique a étudié la production de méliloticine par deux souches de *R. meliloti*, de trifolicine par trois souches de *R. trifolii*, de phaséolique par six souches, de japonicine par treize souches et de lupinicine par trois souches.

Schwinghamer et Dudman. (1973) ont procédé à un criblage de 41 souches de *R. trifolii* ainsi que de 270 isolats issus de nodules de trèfle en vue d'étudier l'antagonisme intra-souche. Ces scientifiques ont noté que 35% des cultures produisaient des antibiotiques contre deux des six souches expérimentées dans le cadre des tests d'antagonisme intra-souche, tandis que 8% des cultures généraient des composés similaires à la bactériocine.

En outre, **Hafeez et al. (2005)** ont démontré que la souche LC-31 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* génère des bactériocines de taille modérée qui entravent certaines souches de *R. leguminosarum* bv. *Viciae* et *Agrobacterium* spp. Cette souche qui produit des bactériocines était comprise parmi les dix souches de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Agrobacterium* employées pour examiner l'antagonisme entre les combinaisons de souches

bactériennes de la famille des *Rhizobiaceae*. Ces scientifiques ont également identifié un polypeptide de bactériocine d'un poids moléculaire de 50 KDa.

Selon **McCardell *et al.*(1976)** certaines souches de *Rhizobium* ont la capacité de générer des bactériocines, des peptides antimicrobiens qui freinent le développement de bactéries similaires. La souche *Rhizobium rhizogenes* K84, par exemple, produit l'agrocine 84, une bactériocine qui s'avère efficace contre *Agrobacterium tumefaciens*, l'agent pathogène de la galle du collet. Cette caractéristique a été mise en œuvre dans la création du biopesticide K1026, employé pour défendre diverses cultures contre cette pathologie. Ces exemples illustrent le potentiel des bactériocines produites par *Rhizobium* dans la lutte biologique contre les pathogènes du sol.



Figure25 : Test d'antagonisme des souches de *Rhizobium* (Photo personnelle).

Conclusion

Conclusion

Les bactéries appartenant au genre *Rhizobium* jouent un rôle crucial dans l'écosystème de la rhizosphère en raison de leur aptitude à établir des symbioses fixatrices d'azote avec les légumineuses. Outre cette caractéristique bien établie, elles contribuent aussi à l'équilibre microbien du sol, stimulent la croissance des plantes grâce à la production de composés bioactifs et entretiennent une interaction complexe avec d'autres microorganismes.

Ce projet a abouti à l'isolement, à l'identification phénotypique et à la caractérisation de 24 souches de *Rhizobium*, prélevées à partir de nodules de légumineuses dans trois zones différentes de la Wilaya de Tlemcen. Les tests de la tolérance au pH nous a permis de classer nos souches parmi les bactéries neutrophiles supportant jusqu'à un pH 9. Elles se sont révélées aussi mésophiles se développant dans une gamme de températures allant de 10°C à 37°C.

Les tests de pouvoir antibactérien, effectués en utilisant la méthode des puits, ont indiqué que la plupart des souches examinées n'ont pas d'effet inhibiteur évident sur les bactéries pathogènes et de référence, que ce soit sous forme de cellules ou à travers le surnageant. Cependant, une souche s'est démarquée par un comportement inhabituel : sa multiplication autour des puits où se trouvent des bactéries pathogènes, laissant suggérer qu'elle produit des métabolites favorisant la prolifération microbienne ou qu'elle entretient une interaction spécifique.

Le fait que la majorité des souches ne présentent pas une activité antibactérienne marquée n'écarte pas l'éventualité d'une production de composés bioactifs à faible concentration, instables, ou manifestés sous des conditions particulières.

En perspectives de notre recherche, il serait judicieux de :

- D'explorer d'autres protocoles expérimentaux spécifiques à la détection des bactériocines.
- Elargir de la zone géographique de prélèvements pour avoir une plus grande diversité génétique de *Rhizobium*.

- Effectuer une PCR pour identifier les gènes responsables de la production de métabolites secondaires (par exemple : bactériocines, sidérophores).
- Recourir à des instruments d'analyse tels que la chromatographie (HPLC, GC-MS) afin de déterminer les substances secrétées.
- Évaluer le potentiel de la souche proliférante en tant qu'agent de biostimulation ou de biocontrôle en la testant par co-culture ou in planta.

Ces études à venir favoriseront une meilleure valorisation du potentiel biotechnologique des souches rhizobiennes, notamment dans le cadre d'une approche agroécologique durable.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aarons, S. R., & Graham, P. H. (1991).** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli to acidity. *Plant and Soil*, 134, 145–151.
- ADEME. (2015).** Cultiver des légumineuses : Pour réduire l'utilisation d'intrants de synthèse (p. 5). Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie.
- Adolphe, A., Saïd, B.-M. L., Gustave, D., de Recherche, M., Aliou, S., Fatiou, T. (2017).** Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole (1re éd., p. 76). Bénin.
- Agrichem Algérie. (2021).** Intérêts des légumineuses alimentaires.
<https://agrichem.dz/33/interets-des-legumineuses-alimentaires>
- Ahlawat, O. P., & Dadarwal, K. R. (1996).** Bacteriocin production by *Rhizobium* sp. cicer and its role in nodule competence. *Indian Journal of Microbiology*, 36, 17–24.
- Akrimi, N. (1996).** Étude de la nodulation des légumineuses pastorales autochtones des régions arides de Tunisie. *Revue des Régions Arides*, (9), 3–10.
- Almihyawi, R. A. H., Musazade, E., Alhussany, N., Zhang, S., Chen, H. (2024).** Production and characterization of bacterial cellulose by *Rhizobium* sp. isolated from bean root. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61619-w>.
- Ambika, R., Kavitha, P., Panneerselvam, A., Sengottaian, N. (2014).** Production of bacteriocin by *Rhizobium* isolated from rhizosphere soil of maize in Lalgudi Taluk, Trichy District, Tamil Nadu, India. *International Journal of Current Research*, 6, 5346–5348. -
- Ammour, A. (s.d.).** Préparation de solutions tampons : théorie, méthodes et applications physiologiques. SNPTES. <https://www.snptes.org>.
- Amrani, N. M. M., Yahaya, N. (2022).** Advanced development of bio-fertilizer formulations using microorganisms as inoculant for sustainable agriculture and environment – A review. *Malaysian Journal of Science, Health & Technology (MJOSHT)*, 8(1), 92–101.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. (2008).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1–2), 7. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Arnould, C., Morandi, D., Barker, D. G., Gianinazzi-Pearson, V. (2001).** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 737–748.
- Atlas, R. M. (2010).** *Handbook of Microbiological Media* (4th ed.). CRC Press.

- Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1808–1815.
- Beringer, J. E. (1974).** R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, 188–198.
- Bernaerts, J. E., De Ley, J. (1963).** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, 199*(4896), 406–407. - Beraud, A. (2007). Étude des effets écotoxiques et de l'induction des phytochélatines chez *Vicia faba* L. (Fabaceae) exposée au cadmium [Thèse de doctorat, Université de Metz].
- Bélangier, R. R. (1999).** Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: Predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology*, 48(1), 66–76.
- Benselama, A. (2015).** Réhabilitation de la culture du Lablab purpureus L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique [Thèse de doctorat, Université d'Oran ES SENIA]. -
- Berrada, H., Benbrahim, K. (2014).** Taxonomy of the rhizobia: Current perspectives. *British Microbiology Research Journal, 4(6), 616–639.
- Boulila, F., Depert, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. (2009).** Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 245–255.
- Braun, V., Pilsel, H., Grob, P. (1994).** Colicins: Structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology*, 161(3), 199–206.
- Briggs, G. M. (2021).** Rhizobium: Nitrogen fixing bacteria. In *Inanimate Life*. Milne Open Textbooks. <https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/rhizobium/>
- Burns, T. A., Bishop, P. E., Israel, D. W. (1981).** Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 62(3), 399–412.
- Burdman, S., Vedder, D., German, M., Itzigsohn, R., Kigel, J., Jurkevitch, E., Okon, Y. (1998).** Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (pp. 609–612). Springer.
- Cenatiempo, Y., Berjeaud, J. M., Biet, F., Frémaux, C., Héchard, Y., Robichon, D. (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques : Données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le Lait*, 76(1–2), 169–177.
- Chacón, J. M., Möbius, W., Harcombe, W. R. (2018).** The spatial and metabolic basis of colony size variation. *The ISME Journal*, 12(3), 669–680.

- Chao, W. L. (1990).** Antagonistic activity of Rhizobium spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 10(5), 213–215.
- Checucci, A., DiCenzo, G. C., Bazzicalupo, M., Mengoni, A. (2017).** Trade, diplomacy, and warfare: The quest for elite rhizobia inoculant strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2207.
- Chen, W. M., James, E. K., Prescott, A. R., Kirans, M., Sprent, J. I. (2003).** Nodulation of Mimosa spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 1051–1061.
- Correa, O. S., Barneix, A. J. (1997).** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 153–157.
- Daoui, K. (2007).** Recherche de stratégies d'amélioration de l'efficience d'utilisation du phosphore chez la fève (*Vicia faba* L.) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc [Mémoire de thèse, Maroc], pp. 156–201.
- Daubech, B., Remigi, P., de Moura, G. D., Marchetti, M., Pouzet, C., Auriac, M. C., Capela, D. (2017).** Spatio-temporal control of mutualism in legumes helps spread symbiotic nitrogen fixation. *eLife*, 6, e28683.
- Degefu, T., Wolde-Meskel, E., Ataro, Z., Fikre, A., Amede, T., Ojiewo, C. O. (2018).** Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) growing in Ethiopia are nodulated by diverse rhizobia. *African Journal of Microbiology Research*, 12*(9), 200–217.
- Degefu, T., Endalkachew, W. M., Adem, M., Fikre, A., Amede, T., Ojiewo, C. (2018).** Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) growing in Ethiopia. *African Journal of Agricultural Research*, 17(6), 167–177.
- DelPapa, M.F., Balagué, L.J., Sowinski, S.C., Wegener, C., Segundo, E., Abarca, F.M.,**
- Elbadry, M., Taha, R. M., Eldougoug, K. A., Gamal-Eldin, H. (2006).** Induction of systemic resistance in fababean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of plant diseases and protection*, 113(6), 247-251.
- Dhane Fitouri, S. (2011).** Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) et sélection de souches Rhizobiales efficaces [Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Tunisie].
- Dixon, R., Kahn, D. (2004).** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(621–631).
- Djebali, N. (2008).** Étude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches* [Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier].

- Djili, K. (2000).** Contribution à la connaissance des sols du Nord de l'Algérie [Thèse de doctorat, INA Alger], 243 p.
- Domergue, O. (2006).** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens [Mémoire, École Pratique des Hautes Études], 78 p. -
- Dommergues, Y., Dreyfus, B., Hoang, G. D., Duhoux, E. (1985).** Fixation de l'azote et agriculture tropicale. La Recherche, 162 p.
- Dortu, C., Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143–154.
- Duc, G. (1997).** Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*, 53, 99–109.
- El Hilali, I. (2006).** La symbiose Rhizobium–Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus* [Mémoire de master, université non précisée].
- Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., Udupa, S. M. (2010).** Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt-affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*, 10, 1–13.
- El-Haloui, N. E., Ochin, D., Tailliez, R. (1986).** Compétitivité pour l'infection entre souches de *Rhizobium meliloti* : rôle de la mobilité. *Plant and Soil*, 95(3), 337–344.
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., Sanjuán, J. (2009).** Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1088–1098.
- Fabiano, E., Arias, A. (1991).** Competition between a native isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and two commercial inoculant strains for nodulation of clover. *Plant and Soil*, 137*(2), 293–296.
- Faghire, M. (2012).** Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin [Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad].
- Ferry, M. (1990).** Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis. *Options Méditerranéennes, CIHEAM – Institut National de la Recherche Agronomique*, 1, 261–270.
- Fitouri, D. S., Ben Jeddi, F., Rezgui, S., Mhandi, R. (2011).** Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de *Rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *Journal of Applied Biosciences*, 3642–3651.
- Florentino, L. A., Sousa, P. M. D., Silva, J. S., Silva, K. B., Moreira, F. M. D. S. (2010).** Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples. (Titre du journal ou éditeur manquant – à compléter).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022).** The state of the world's land and water resources for food and agriculture 2021 – Systems at breaking point. FAO.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023).** World Pulses Day 2023 highlights how pulses are at the core of sustainability. FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024).** World Pulses Day 2024: Shining the spotlight on the vital role of pulses in promoting soil health and nourishing people. FAO.
- Fujihara, S., Yoneyama, T. (1993).** Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1104–1109.
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., Cosby, B. J. (2003).** The nitrogen cascade. *Bioscience*, 53(4), 341–356.
- Ghalem, M. (2009).** Contribution à l'étude du développement de la culture du soja : effets du sol et l'inoculation, rendement et caractérisation des bactéries associées [Mémoire de magistère en biotechnologie, Université d'Oran Es-Senia, Algérie].
- Giraud, E. (2007).** Symbiose rhizobium/légumineuse : Un nouveau sésame. *Médecine/Sciences*, 23(6-7), 663–666. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072367663>
- Goel, A. K., Sindhu, S. S., Dadarwal, K. R. (1999).** Bacteriocin-producing native rhizobia of green gram (*Vigna radiata*) having competitive advantage in nodule occupancy. *Microbiological Research*, 154*(1), 43–48.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., Krishnamurthy, L. (2015).** Plant growth promoting rhizobia: Challenges and opportunities. *Biotech*, 5*(4), 355–377.
- Graham, P., Vance, C. (2003).** Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131, 872–877.
- Graham, P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38*(6), 475–484.
- Graham, P. H. (1994).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(5), 528–535.
- Graham, T. E., MacLean, D. A. (1992).** Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(1),
- Gratia, A. (1925).** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 93, 1040-1041.
- Gray, K. M., Pearson, J. P., Downie, J. A., Boboye, B. E., Greenberg, E. P. (1996).** Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: Autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *Journal of Bacteriology*, 178(2), 372–376.

- Gross, D. C., Vidaver, A. K. (1978).** Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6), 936–943.
- Hafeez, F. Y., Naeem, F. I., Naeem, R., Zaidi, A. H., Malik, K. A. (2005).** Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agricultural soils in Faisalabad. *Environmental and Experimental Botany*, 54(2), 142–147.
- Harris, D. C. (2015).** *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. (2010).** Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15–25.
- Hilali, I. (2006).** La symbiose *Rhizobium-Lupin* : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus* (Thèse de doctorat, Université Mohamed V-Agdal, Rabat).
- Hiltner, L. (1904).** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft*, 98, 59–78.
- Hirsch, P. R. (1979).** Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 113(2), 219–228.
- Hodgson, A. L., Roberts, W. P., Waid, J. S. (1985).** Regulated modulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4), 475–478.
- Howieson, J. G., Ewing, M. A., D'Antuono, M. F. (1988).** Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, 105(2), 179–188.
- Hungria, M., Vargas, M. A. (2000).** Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2–3), 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2)
- Iruthayathas, E. E., Gunasekaran, S., Vlassak, K. (1983).** Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂-fixation of winged bean and soybean. *Scientia Horticulturae*, 20(3), 231–240
- Joffin, J. N., Leyral, G. (2006).** *Microbiologie technique* (2e éd.). Collection Biologie Technique, CRDP d'Aquitaine, Bordeaux. 304 p.
- Joseph, M. V., Desai, J. D., Desai, A. J. (1983).** Production of antimicrobial and bacteriocin-like substances by *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 532–535.
- Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Jordan, D. C. (1984).** International committee on systematic bacteriology subcommittee on

the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* : minutes of the meeting, 11 August 1982, Boston, Massachusetts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2), 248.

Kaye, J. P., Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(4), 139–143.

Kbede, E., Amsalu, B., Agraw, A., Tamiru, S. (2022). Nodulation potential and phenotypic diversity of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from agriculture soils of Lower Eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2017(4), 1–9.

Kelsic, E. D., Zhao, J., Vetsigian, K., Kishony, R. (2015). Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. *Nature*, 521(7553), 516–519.

Khare, A., Tavazoie, S. (2015). Multifactorial competition and resistance in a two-species bacterial system. *PLoS Genetics*, 11(12), e1005715.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337–349.

Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355–377.

Kumawat, K. C., Sharma, P., Sirari, A., Singh, J., Gill, B. S., Singh, U., Saharan, K. (2019). Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* (LSE-2) nodule endophyte with *Bradyrhizobium* sp. (LSBR-3) for improving plant growth, nutrient acquisition and soil health in soybean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 1–17.

Kwon, S., 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.

Kyei-Boahen, S., Savala, C. E. N., Chikoye, D., Abaidoo, R. (2017). Growth and yield responses of cowpea to inoculation and phosphorus fertilization in different environments. *Frontiers in Plant Science*, 8, 646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00646>

Lagares, A. (1999). Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1420–1427.

Laranjo, M. C., Branco, R., Soares, L., Alho, M. D. E., Carvalho, S., Oliveira, S. (2002). Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations.

Lazrek Benfriha, F. (2008). Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France. 254 p.

Legesse, S. (2016). Isolation, identification and authentication of root nodule bacteria (*Rhizobia*) in promoting sustainable agriculture. *Studies*, 6(1), 87–93.

Lévy, E., Eyal, Z., Chet, J., Hochman, A. (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(3), 163–171.

- Li, A., Hindmarch, C. C., Nattie, E. E., Paton, J. F. (2013).** Antagonism of orexin receptors significantly lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Physiology*, 591(17), 4237–4248.
- López-Bellido, F. J., López-Bellido, L., López-Bellido, R. J. (2005).** Competition, growth and yield of faba bean and barley under mixed cropping. *European Journal of Agronomy*, 22(2), 179–189.
- Lotz, W., Mayer, F. (1972).** Isolation and characterization of a bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of *Rhizobium*. *Journal of Virology*, 9(1), 160–173.
- Lucinski, R., Polcyn, W., Ratajczak, L. (2001).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), 537–546.
- Lynch, J. M., Brimecombe, M. J., De Leij, F. A. A. M., Smith, L. S. (2001).** The rhizosphere. In J. M. Lynch (Ed.), *The rhizosphere* (pp. xx–xx). Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com>
- Marchall, N., Bourdon, J. L., Richard, C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris.
- Massawe, I., Mtei, K. M., Munishi, L. K., Ndakidemi, P. A. (2017).** Effects of intercropping systems and *Rhizobium* inoculation on yields of maize (*Zea mays*) and two legumes (*Phaseolus vulgaris* and *Dolichos lablab*). *International Journal of Biosciences*, 10, 188–200.
- McCardell, B. A., Jones, D. G., Hirsch, P. R. (1976).** Bacteriocin production by *Rhizobium* species. *Journal of General Microbiology*, 96(2), 335–344.
- McNear, D. H. Jr. (2013).** La rhizosphère : racines, le sol et tout le reste. *Nature Education Knowledge*, 4(1). <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617>
- Meena, K. R., Kanwar, S. S. (2015).** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015.
- Mei, P. P., Gui, L. G., Wang, P., Huang, J. C., Long, H. Y., Christie, P. (2012).** Maize/faba bean intercropping with rhizobia inoculation enhances productivity and recovery of fertilizer P in a reclaimed desert soil. *Field Crops Research*, 130, 19–27.
- Mezani, S. (2011).** Bioécologie de la fève *Bruchus rufimanus* Boh. (Coleoptera : Bruchidae) dans les parcelles de variétés de fève différentes et de féverole dans la région de Tizi-Rached. Mémoire de master.
- Miao, J., Zhang, N., Liu, H., Wang, H., Zhong, Z., Zhu, J. (2018).** Soil commensal rhizobia promote *Rhizobium etli* nodulation efficiency through CinR-mediated quorum sensing. *Archives of Microbiology*, 200(5), 685–694.

Mir, I., Mukkamula, N., Kumar, B. K., Parvay, J. A. (2024). Impact of microbial consortium of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium majense* on the growth of *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 168(1), 562–572.

Mishra, R. P., Singh, R. K., Jaiswal, H. K., Kumar, V., Maurya, S. (2006). Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (**Oryza sativa* L.). *Current Microbiology*, 52(5), 383–389.

Moreira, F., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., Franco, A. A. (1993). Characterisation of Rhizobia isolated from different groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 135–146.

Morgan, J. A. W., Bending, G. D., White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729–1739.

Mulder, L., Hogg, B., Bersoult, A., Cullimore, J. V. (2005). Integration of signalling pathways in the establishment of the legume–rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum*, 123, 207–218.

Müller, C., Clough, T. J. (2014). Advances in understanding nitrogen flows and transformations: gaps and research pathways. *The Journal of Agricultural Science*, 152(S1), 34–44. - Munns, D. N. (1977). In: Bose (Ed.), *Acidity and related factors*, pp. 211–236.

Munns, R. (1977). Comparative physiology of salt and water stress." *Plant, Cell & Environment*, 1(2), 197-230.

Madigan M.T., Martinko, J.M. (2007). Brock Biologie des microorganismes. Edition : Person Education France. PP, 599-601. acidity and related factors. Bose (Ed). PP, 211- 236.

Mwenda, G. M., Hill, Y. J., O'Hara, G. W., Reeve, W. G., Howieson, J. G., Terpolilli, J. J. (2023). Competition in the *Phaseolus vulgaris*–*Rhizobium* symbiosis and the role of resident soil rhizobia in determining the outcomes of inoculation. *Plant and Soil*, 487(1–2), 61–77. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05903-0>

Nangul, A., Moot, D. J., Brown, D., Ridgway, H. J. (2013). Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual *Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 56(3), 215–223.

Ndoye, I. (1990). Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata* (Thèse de doctorat, Lille 1).

Oldroyd, G. E., Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519-546.

Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144.

Ondieki, K., Nyaboga, E., Wagacha, M., Mwaura, F. B. (2017). Morphological and genetic diversity of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from agricultural soils of lower eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2017(4), 1-9.

Ongena, M. A. R. C., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C., Onishchuk, O. P., Vorobyov, N. I., Provorov, N. A. (2017). Nodulation competitiveness of nodule bacteria: Genetic control and adaptive significance. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(2), 131-139.

Oresnik, I. J., Twelker, S., Hynes, M. F. (1999). Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2833-2840.

Pinto, P. P., Raposeiras, R., Macedo, A. M., Seldin, L., Paiv, E., Sá, N. M. H. (s.d.). Effets de la température élevée sur la survie, la performance symbiotique et les modifications génomiques des souches de *Rhizobium* nodulant le haricot. *Revista de Microbiologie*. ISSN 0001.

Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires, 2, 541-572.

Perrin, J. F. (2019). Assimilation du diazote.
http://www.perrin33.com/microbiologie/azote/entree-n_3.php

Perry, J. J., Staley, J. T., Lory, S. (2004). *Microbiologie: Cours et questions de révision*. Édition Dunod, France, p. 891.

Pesson, P. (1984). *Pollinisation et productions végétales*. Éditions Quae.

Pierre, J., Suso, M. J., Moreno, M. T., Esnault, R., Le Guen, J. (1999). Diversité et efficacité de l'entomofaune pollinisatrice (Hymenoptera : Apidae) de la féverole (*Vicia fabae* L.) sur deux sites, en France et en Espagne. *Annales de la Société Entomologique de France*, 35, 312-318.

Poole, P., Ramachandran, V., Terpolilli, J. (2018). Rhizobia : from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291-303.

Previn, S., Jannat, B., Al Sanjee, S., 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.

Rahman, A., Mancini, M., Nadon, C., Perez, I. A., Farsamin, W. F., Lampe, M. T., Le, T. H., Torres Martínez, L., Weisberg, A. J., Chang, J. H., Sachs, J. L. (2023). Competitive interference among rhizobia reduces benefits to hosts. *Current Biology*, 33(17), 3804–3815.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.06.081>.

Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., Hill, C. (2011). Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In *Prokaryotic antimicrobial peptides* (pp. 29–53). Springer, New York, NY. Riley, M. A. (2009). Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 32–44).

- Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002).** Bacteriocins : evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117–137.
- Rispail, N., Kalo, P., Kiss, J. B., Noel Ellis, T. H., Gallardo, K., Thompson, R. D., Prats, E., Larrainainzar, E., Ladrera, R., Gonzalez, E. M., Arese-Igor, C., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M., Rubiales, D. (2010).** Model legumes contribute to faba bean breeding. *Field Crops Research*, 115, 253–269.
- Rodelas, B., González-López, J., Martínez-Toledo, M. V., Pozo, C., Salmerón, V. (1999).** Influence of Rhizobium/Azotobacter and Rhizobium/Azospirillum combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 29(2), 165–169.
- Rodelas, B., Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Martínez-Toledo, M. V., Pozo, C. (1998).** Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum bv. viceae isolated from agricultural soils in Spain. *Applied Soil Ecology*, 8(1–3), 51–60.
- Rodrigues, C. S., Laranjo, M., Oliveira, S. (2006).** Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Current Microbiology*, 53(1), 1–7.
- Rodriguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., Ruiz-Sainz, J. E. (2007).** Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272, 127–136.
- Ronner, E., Franke, A. C., Vanlauwe, B., Dianda, M., Edeh, E., Ukem, B. (2016).** Understanding variability in soybean yield and response to P fertilizer and Rhizobium inoculants on farmers' fields in Northern Nigeria. *Field Crops Research*, 186, 133–145.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.10.023>
- Roslycky, E. B. (1967).** Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 13(4), 431–432.
- Roslycky, E. B. (1965).** Lysogeny in the rhizobia bacteria. *Canadian Society of Microbiology*, 15th Annual Meeting, 47.
- Russel, J., Røder, H. L., Madsen, J. S., Burmølle, M., Sørensen, S. J. (2017).** Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10684–10688.
- Sachs, J. L., Quides, K. W., Wendlandt, C. E. (2018).** Legumes versus rhizobia: A model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytologist*, 219(4), 1199–1206.
- Saoudi, M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (BNLP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri de Constantine, 99 p.
- Sarig, S., Kapulnik, Y., Okon, Y. (1986).** Effect of Azospirillum inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant and Soil*, 90(1), 335–342.
- Schripsema, J., De Rudder, K. E., Van Vliet, T. B., Lankhorst, P. P., De Vroom, E., Kijne, J. W., Van Brussel, A. A. (1996).** Bacteriocin small of Rhizobium leguminosarum

belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *Journal of Bacteriology*, 178(2), 366–371.

Schumpp, O., Deakin, W. J. (2010). How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science*, 15(4), 189–195.

Schwinghamer, E. A. (1975). Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *Microbiology*, 91(2), 403–413.

Schwinghamer, E. A., Belkengren, R. P. (1968). Inhibition of rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii* : some properties of the antibiotic and of the strain. *Archiv für Mikrobiologie*, 64(2), 130–145.

Schwinghamer, E. A., Dudman, W. F. (1973). Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(2), 263–272.

Schwinghamer, E. A. (1971). Antagonism between strains of *Rhizobium trifolii* in culture. *Soil Biology and Biochemistry*, 3(4), 355–363.

Schwinghamer, E. A., Brockwell, J. (1978). Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(5), 383–387.

Sebihi, F. (2008). Les bactéries nodulantes des légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des Plantes, Université Mentouri Constantine, Algérie, 110 p.

Shetta, N. D., Al-Shaharani, T. S., Abdel-Aal, M. (2011). Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia conditions. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 10(3), 410–418.

Shree, K. S., Prasad, N., Prakruthi, G., Siddaligeswara, K. G., Patil, S. J. (2022). Isolation, biochemical characterization of *Rhizobium* sp. SN 01 strain from root nodules of *Mimosa pudica* and their impact on agriculture crops. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 11(1), 200–205.

Sillero, J. C., Villegas-Fernández, A. M., Thomas, J., Rojas-Molina, M. M., Emeran, A. A., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D. (2010). Fababean breeding for disease resistance. *Field Crops Research*, 115(3), 297–307.

Silva, C. C., Silva, S. P., Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 594.

Sindhu, S. S., Sehrawat, A., Sharma, R., Dahiya, A. (2016). Biopesticides : use of rhizosphere bacteria for biological control of plant pathogens. *Strain*, 90, 166.

Somasegaram, P., Hoben, H. J. (s.d.). *The Manuel for Rhizobia*. Springer-Verlag, Berlin.

- Spaink, H. P. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 257–288.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York, Inc., 450 p.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1985).** Methods in legume-Rhizobium technology. 365 p.
- Sousou, S. (2013).** Adaptation de la symbiose Fabacées-Rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d’*Hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Parasitologie / Agriculture Durable, Institut Supérieur Agronomique de Chott Meriem, Université de Sousse, Tunis.
- Sridevi, M., Mallaiah, K. V. (2008).** Production of bacteriocins by root nodule bacteria. *International Journal of Agricultural Research*, 3, 161–165.
- Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C., Straight, P. D. (2016).** Bacterial communities : interactions to scale. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1234.
- Sutton, W. D. (1983).** Nodule development and senescence. In Broughton, W. J. (Ed.), *Nitrogen Fixation, Volume 1 (Legumes)* (pp. 144–212). Oxford : Clarendon Press.
- Thami-Alami, I., Elboutahiri, N., Udupa, S. M. (2010).** Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. In *The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity* (pp. 265–269). Zaragoza : CIHEAM/CIBIO/FAO/SEEP.
- Tortora, G. J., Funk, B. R., Case, C. L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 945 p.
- Triplett, E. W. (1988).** Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii T24. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(11), 3810–3814.
- Triplett, E. W. (1990).** Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with increased nodulation competitiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 98–103.
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013).** Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805.
- Ulzen, J., Abaidoo, R. C., Ewusi-Mensah, N., & Masso, C. (2018).** On-farm evaluation and determination of sources of variability of soybean response to *Bradyrhizobium* inoculation and phosphorus fertilizer in Northern Ghana. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 267, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.007>
- Upadhyay, A. K., Chatterjee, D., Swain, M., & Ray, L. (2020).** Evaluation of a potential antibacterial produced by *Streptomyces cinereoruber* sp. isolated from Chilika Lake. *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 9(3), 188.

Van Brussel, A. A., Zaat, S. A., Wijffelman, C. A., Pees, E., & Lugtenberg, B. J. (1985). Bacteriocin small of fast-growing rhizobia is chloroform soluble and is not required for effective nodulation. *Journal of Bacteriology*, 162(3), 1079–1082.

Vincent, B. (2019). Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés : Le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes. Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 87–88 p.

Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Vitousek, P. M., Porder, S., Houlton, B. Z., Chadwick, O. A. (2010). Terrestrial phosphorus limitation: Mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecological Applications*, 20(1), 5–15.

Wang, Y., Hsu, P. K., Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, 17(458–467).

Werner, D. (1992). Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg, Germany: Chapman & Hall.

Wheatley, R. M., Poole, P. S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(4), 448–461.

Williams, M. P. (2009). Citrate de test protocol. American Society for Microbiology. *Agronomy*, 12, 3149. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123149>

Yajima, A., van Brussel, A. A., Schripsema, J., Nukada, T., & Yabuta, G. (2008). Synthesis and stereochemistry-activity relationship of small bacteriocin, an autoinducer.

Yamamoto, S., Okazaki, S., Monica, N. D., Ohkama-Ohtsu, N., Tanaka, H., Sugihara, S. (2022). Rhizobium inoculation improved the rhizosphere P dynamics and P uptake capacity of pigeon pea plants grown in strongly weathered soil only under P fertilized conditions. *Agronomy*.

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 241.

Yuan, Z. C., Zaheer, R., Finan, T. M. (2005). Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 877–894.

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989.

Zhang, X., Wu, J., Kong, Z. (2024). Cellular basis of legume–rhizobium symbiosis. *Plant Communications*, 5(11), 101045. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.101045>.



Annexe

Annexe 01

Milieux de culture utilisés

Composition de milieu YMA (YeastManitol Agar) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)

YMB	1000 ml
Agar	18
PH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMB (YeastManitolBroth) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
Na Cl	0.10
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0.20
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1.00 L
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+RC(Rouge Congo) en g/l (Somasegaran et Hoben,1985)

YMB	1.00 L
Solution stock de RC	10.00 ml
Agar	18.00
PH	6.80

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

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

**Composition de milieu YMA+BTB (Bleu de Bromothymol) en g/l
(Somasegaran et Hoben ,1985)**

YMB	1.00 L
Solution stock de bleu de BTB	5.00 ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0.50g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Additionner 5ml de la solution de pourpre de Bromocrésol (BCP) à 1 Litre du milieu GPA après autoclavage.

Composition de milieu Glucose Peptone Agar (GPA) (Somasegaran et Hoben ,1985)

Glucose	5g
Peptone	10g
Agar	15g
Eau distillée	1L
Solution de BCP	100ml

Solution de pourpre de Bromocrésol (Bromocrésol Purple BCP)

Pourpre de Bromocrésol	0.5
Ethanol	100ml

Annexe 02

Coloration de Gram

Le protocole expérimental comprend les étapes suivantes:

- Placer une goutte d'eau distillée stérile au centre d'une lame propre.

- Prélever une petite quantité d'une colonie à l'aide d'une anse de platine.

- Mélanger la colonie avec la goutte d'eau, puis sécher en passant rapidement sur la flamme d'un bec Bunsen.

Voici le protocole expérimental détaillé :

- 1-Appliquer le Violet de Gentiane sur la lame et laisser agir pendant 1 minute.

- 2-Verser Lugol sur la lame et laisser agir pendant 30 secondes.

- 3-Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte le mélange "Alcool-Acétone".

- 4-Rincer abondamment à l'eau distillée.

- 5-Appliquer la fuchsine sur la lame et laisser agir pendant 1 minute.

- 6-Rincer à nouveau à l'eau distillée.

- 7-Sécher la lame avec un papier absorbant.

- 8-Observation au microscope (grossissement x100) en ajoutant de l'huile à immersion.

L'état frais

- ✓ Utiliser une pipette Pasteur stérile pour prélever un échantillon de la culture du bouillon.
- ✓ Déposer une goutte de la culture au centre d'une lame et recouvrir avec une lamelle.
- ✓ Examiner au microscope en utilisant l'objectif X 40.

Tampon phosphate-citrate (pH2,2-8,0)

- Préparer une solution d'acide citrique 0,50M (soit 105,06 g de C₆H₇O₈, H₂O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium di-sodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na₂HPO₄ sec par litre).

-Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml.

pH	Na ₂ HPO ₄ à 0,50M	Acidecitrique à 0,50M	pH	Na ₂ HPO ₄ à 0,50M	Acidecitrique à 0,50M
2,2	1,60 ml	39,20 ml	5,2	42,88 ml	18,56 ml
2,4	4,96 ml	37,52 ml	5,4	44,60 ml	17,70 ml
2,6	8,72 ml	35,64 ml	5,6	46,40 ml	16,80 ml
2,8	12,68 ml	33,66 ml	5,8	48,36 ml	15,82 ml
3,0	16,44 ml	31,78 ml	6,0	50,52 ml	14,74 ml
3,2	19,76 ml	30,12 ml	6,2	52,88 ml	13,56 ml
3,4	22,80 ml	28,60 ml	6,4	55,40 ml	12,30 ml
3,6	25,96 ml	27,12 ml	6,6	58,20 ml	10,90 ml
3,8	28,40 ml	25,80 ml	6,8	61,80 ml	9,10 ml
4,0	30,84 ml	24,58 ml	7,0	65,88 ml	7,06 ml
4,2	33,12 ml	23,44 ml	7,2	69,56 ml	5,22 ml
4,4	35,28 ml	22,36 ml	7,4	72,68 ml	3,66 ml
4,6	37,40 ml	21,30 ml	7,6	74,92 ml	2,54 ml
4,8	39,44 ml	20,28 ml	7,8	76,60 ml	1,70 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml	8,0	77,80 ml	1,10 ml

Tampon phosphate (pH 5,6 - 8,0)

- Préparer une solution de di-hydrogénophosphate de potassium à M/15 (soit 9,08 g de KH_2PO_4 par litre) et une solution de di-sodiumhydrogénophosphate (9,47g de Na_2HPO_4 par litre).

-Mélanger suivant les indications du tableau.

pH	Na_2HPO_4 à M/15	KH_2PO_4 4 à M/15
5,6	10,0 ml	190,0 ml
5,8	16,5 ml	183,5 ml
6,0	25,0 ml	175,0 ml
6,2	36,0 ml	164,0 ml
6,4	53,5 ml	146,5 ml
6,6	74,5 ml	125,5 ml
6,8	99,0 ml	101,0 ml
7,0	122,0 ml	78,0 ml
7,2	143,0 ml	57,0 ml
7,4	161,0 ml	39,0 ml
7,6	172,5 ml	27,5 ml
7,8	182,5 ml	17,5 ml
8,0	189,0 ml	11,0 ml