



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE 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 :

MALFI Aïda

En vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biologie Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

**Caractérisation de la production des
Exopolysaccharides (EPS)
Chez *Rhizobium***

Soutenu le : 24/06/2026

Devant le jury :

Président	Pr. REBIAHI SID AHMED	Université de Tlemcen
Encadrant	Dr. RAHMOUN MALIKA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. NAS FATIMA	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2025/2026

Remerciements :

Nous remercions tout d'abord **Allah**, qui nous a accordé la force, la patience et les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à notre promotrice, **Mme Rahmoun Malika**, pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils avisés ainsi que pour son soutien constant tout au long de ce projet. Nous avons particulièrement apprécié sa bienveillance et ses encouragements.

Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres du jury, le **Professeur Rebiahi Sid Ahmed**, pour avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'à **Mme Nes Fatima** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de lui consacrer de son temps.

Nous remercions chaleureusement toute l'équipe du **Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)**, pour leur aide et leur accompagnement.

Nous n'oublions pas de remercier l'ensemble de nos enseignants, qui ont contribué à notre formation et à l'enrichissement de nos connaissances tout au long de notre parcours universitaire.

Enfin, nous témoignons notre gratitude à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À ma mère

Pour son amour inconditionnel, sa tendresse, ses prières et tous les sacrifices qu'elle a consentis pour ma réussite. Elle est ma plus grande source de force et de motivation.

À mon père

Pour son soutien, sa patience et ses efforts constants afin de me permettre de poursuivre mes études dans les meilleures conditions.

À mes frères

Pour leur affection, leur soutien et leur présence tout au long de mon parcours.

À mes amis

Pour leur encouragement, leur compréhension et les beaux moments partagés durant mes études.

À toute ma famille

Qui m'a toujours entourée de soutien et d'amour.

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

الملخص

تؤدي السكريات المتعددة خارج الخلية التي تنتجها بكتيريا جنس الريزوبيوم دوراً محورياً في إقامة علاقات تعايشية مع النباتات البقولية، لا سيما في عمليات التصاق البكتيريا بالجذور وتكوين العقد الجذرية. تهدف هذه الدراسة إلى توصيف وتقدير إنتاجية السكريات المتعددة لدى سلالات من بكتيريا الريزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات الفول. وعليه تم اخذ العينات من منطقتين من الغزوات ولاية تلمسان.

كما اعتمدت منهجية العمل على عزل السلالات باستخدام وسط الزرع (YMA)، تلا ذلك توصيفها بناءً على خصائصها المظهرية والكيميائية الحيوية. ولتحديد كمية السكريات، تم استخلاصها وقياس كمية السكريات الكلية بالاعتماد على طريقة "الفينول -حمض الكبريت.

أظهرت النتائج تبايناً في القدرة على إنتاج السكريات الخارجية بين السلالات المدروسة؛ حيث سجلت السلالة AA7 أعلى قيمة إنتاجية (174.3 ميكروغرام/مل)، تلتها السلالة AA4 (100.7 ميكروغرام/مل)، ثم السلالة SAAA (87.4 ميكروغرام/مل)، بينما سجلت السلالة AA2 RC أدنى مستوى للإنتاج (37.7 ميكروغرام/مل). تُبرز هذه النتائج الأهمية البيولوجية للسكريات المتعددة لدى بكتيريا الريزوبيوم، وتفتح أفقاً واعدة لاستغلالها في تطوير حلول وتطبيقات زراعية حيوية.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيوم، السكريات المتعددة خارج الخلية، العقد الجذرية، نبات الفول، الأسمدة الحيوية.

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) produced by bacteria of the genus *Rhizobium* play an important role in symbiotic interactions with leguminous plants, particularly in bacterial adhesion and nodule formation. The objective of this study was to characterize EPS production in *Rhizobium* strains isolated from the root nodules of faba bean (*Vicia faba*). Within the framework of this study, three samples were collected from two different areas located in the commune of Ghazaouet, Tlemcen Province.

The isolates obtained on YMA medium were characterized based on morphological and biochemical criteria. EPS were then extracted, and their total carbohydrate content was determined using the phenol–sulfuric acid colorimetric method.

The results showed a variation in EPS production among the studied strains. The AA7 strain exhibited the highest content (174.3 µg/mL), followed by AA4 (100.7 µg/mL) and SAAA (87.4 µg/mL), while AA2 RC recorded the lowest value (37.7 µg/mL).

These results highlight the importance of EPS characterization in *Rhizobium* and their potential applications in agriculture.

Keywords: *Rhizobium*, exopolysaccharides, *Vicia faba*, root nodules, biofertilizers.

Résumé

Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries du genre *Rhizobium* jouent un rôle important dans les interactions symbiotiques avec les plantes légumineuses, notamment dans l'adhésion bactérienne et la formation des nodules. L'objectif de cette étude a été de caractériser la production des EPS chez des souches de *Rhizobium* isolées à partir des nodules racinaires de la fève (*Vicia faba*). Dans le cadre de cette étude, trois échantillons ont été prélevés dans deux zones différentes situées dans la commune de Ghazaouet, wilaya de Tlemcen.

Les isolats obtenus sur milieu YMA ont été caractérisés par des critères morphologiques et biochimiques. Les EPS ont ensuite été extraits et leur teneur en glucides totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique.

Les résultats ont montré une variation de la production des EPS entre les souches étudiées. La souche AA7 a présenté la teneur la plus élevée (174,3 µg/mL), suivie par AA4 (100,7 µg/mL) et SAAA (87,4 µg/mL), tandis que AA2 RC a enregistré la valeur la plus faible (37,7 µg/mL).

Ces résultats montrent l'importance de la caractérisation des EPS chez *Rhizobium* et leur potentiel dans les applications agricoles.

Mots clés : *Rhizobium*, exopolysaccharides, *Vicia faba*, nodules racinaires, biofertilisants.

Table des matières

المخلص	
Abstract	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Listes des tableaux.....	
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 :Symbiose rhizobium légumineuse.....	4
1. La rhizosphère	3
1.1. Définition	3
1.2. Importance microbiologique.....	3
2. Les légumineuses.....	3
2.1. Généralités.....	3
2.2. Importance agronomique et nutritionnelle	4
2.3. La plante Hôte : <i>Vicia faba. L</i>	5
3. Le genre <i>Rhizobium</i>	5
3.1. Généralités.....	5
3.2. Taxonomie actuelle du genre <i>Rhizobium</i>	6
3.3. Caractères morphologiques et cultureux	7
3.4. Caractères biochimiques et physiologiques	8
4. La symbiose <i>Rhizobium- légumineuse</i>	8
4.1. Formation des nodules	8
4.2. Fixation biologique de l'azote	9
4.3. Cycle de l'azote	10
CHAPITRE 2 :Les exopolysaccharide_Chez <i>rhizobium</i>	11

1. Définition des exopolysaccharides (EPS).....	12
1.1. Classification des EPS	12
2. Structure chimiques des EPS.....	12
3. Composition des EPS issus de <i>Rhizobium</i>.....	14
4. Rôles biologiques des EPS.....	12
4.1. Adhésion racinaire.....	12
4.2. Formation de biofilm.....	12
4.3. Protection contre les stress environnementaux	12
4.4. Rôle dans la nodulation.....	13
5. Facteurs influencent la production des EPS.....	13
5.1. pH.....	13
5.2. Température.....	13
5.3. Source de carbone.....	14
5.4. Salinité	14
6. Méthodes de dosage et de caractérisation des exopolysaccharides (EPS)	14
7. Applications biotechnologiques et industrielles des EPS bactériens	15
7.1. Applications Agricoles.....	15
7.2. Applications médicales et pharmaceutiques.....	16
Matériels et méthodes.....	17
1. Isolement des bactéries à partir des nodules	17
1.1. Description de la zone d'étude	17
1.2. Collecte des plantes.....	17
1.3. Prélèvement des nodules	18
1.4. Stérilisation des nodules	19
1.5. Ecrasement des nodules	19
1.6. Milieux de culture utilisés	20
1.7. Isolement et purification des isolats	20

2.	Caractérisation morphologique.....	20
2.1.	Examen macroscopique.....	20
2.2.	Examen microscopique	20
3.	Caractères biochimiques	21
3.1.	Test de catalase	21
3.2.	Test d'oxydase.....	21
3.3.	Test de rouge congo (RC).....	21
3.4.	Test GPA	21
3.5.	Test du citrate de Simmons.....	21
3.6.	Test de la nitrate réductase.....	22
4.	Conservation des isolats	22
5.	Extraction et purification des exopolysaccharide chez <i>rhizobium</i>	22
5.1.	Extraction des exopolysaccharides	22
6.	Dosage des glucides totaux.....	23
	Résultats et discussion	24
1.	Isolement et purification des isolats	25
2.	Caractères morphologiques	25
2.1.	Examen macroscopique.....	25
2.2.	Examen microscopique	26
3.	Test biochimiques	27
3.1.	Test de catalase	27
3.2.	Test d'oxydase.....	28
3.3.	Test de citrate de Simmons	28
3.4.	Test de la nitrate réductase.....	29
3.5.	Croissance sur le milieu YMA+RC	29
3.6.	Test de GPA	30
4.	Extraction des EPS	31

5. Dosage des glucides totaux.....	33
Conclusion	37
Références bibliographiques	38
Annexes.....	43

Liste des abréviations

EPS : Exopolysaccharide

YMA : Yeast Manitol Agar

YMB : Yeat Mannitol broth

GPA : Glucose peptone agar

RC : Rouge Congo

N₂ : Azote Atmosphérique

NaCl : Chlorure de sodium

ml : millilitre

g : gramme

°C : Celsius

CO₂ : dioxyde de carbone

H₂SO₄ : Acide sulfurique

TCA : Acide trichloroacétique

Liste des figures

Figure 01: Les fleurs et les fruits de <i>Vicia Faba L</i>	5
Figure 2: Observation microscopique de <i>Rhizobium trifolii</i>	6
Figure 3 : les étapes de la nodulation.....	9
Figure 4 : Représentation du cycle de l'azote et des principales transformations microbiennes dans le sol et la rhizosphère	10
Figure 5:Structure chimique de l'EPS produit par <i>Rhizobium leguminosarum bv.</i>	13
Figure 6 : Carte géographique de la zone d'étude	17
Figure 7 : Collecte des plantes.....	18
Figure 8 : Plante extraite avec son appareil racinaire	18
Figure 9 : La stérilisation des nodules	19
Figure 10 : L'écrasement des nodules.....	19
Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées à partir des nodules de <i>Vicia faba</i> sur milieu YMA après incubation à 28°C	26
Figure 12 : Résultat de coloration de Gram.....	27
Figure 13 : Résultat de test de catalase.....	28
Figure 14 : Résultat de test du citrate de Simmons	29
Figure 15 : Résultat de test nitrate réductase	29
Figure 16 : Résultat de croissance sur YMA-RC	30
Figure 17 : Résultat de croissance sur le milieu GPA	31
Figure 18: la déprotéinisation avec le TCA 10%.....	32
Figure 19: extraction et purification des exopolisaccharides chez <i>rhizobium</i>	32
Figure 20 : les EPS obtenus	33
Figure 21 : résultats de la méthode phenol-sulfuric acid.....	34
Figure 22 : Courbe étalon — D-glucose (Méthode Dubois, 485 nm).....	35

Listes des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique actuelle du genre <i>Rhizobium</i>	7
Tableau 2: présente quelques exemples des EPS produits par <i>Rhizobium</i>	12
Tableau 3 : Résultats des prélèvements	25
Tableau 4 : Gamme étalon D-glucose	33
Tableau 5 : Concentrations en EPS produite par les souches étudiées	36

INTRODUCTION

Les microorganismes constituent une composante essentielle des écosystèmes naturels en raison de leur diversité et de leurs nombreuses interactions avec les êtres vivants. Parmi eux, les bactéries occupent une place importante dans les équilibres biologiques, notamment dans les sols où elles participent à plusieurs processus tels que la décomposition de la matière organique, la transformation des éléments minéraux et l'amélioration de la disponibilité des nutriments pour les plantes. Certaines bactéries associées aux racines végétales jouent un rôle bénéfique dans la croissance et le développement des plantes (Berendsen *et al.*, 2012).

L'azote représente un élément indispensable à la croissance végétale, car il intervient dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques et de nombreux composés essentiels. Malgré son abondance dans l'atmosphère, l'azote sous forme moléculaire (N₂) n'est pas directement assimilable par les plantes. La fixation biologique de l'azote, réalisée par certains microorganismes, permet la conversion de cet azote en formes utilisables par les végétaux. Ce processus contribue ainsi au maintien de la fertilité des sols et présente un intérêt majeur pour une agriculture durable (Koch & Sessitsch, 2024).

Parmi les bactéries fixatrices d'azote, les bactéries du genre *Rhizobium* occupent une place particulière grâce à leur capacité à établir une relation symbiotique avec les plantes légumineuses. Cette association conduit à la formation de nodules racinaires dans lesquels les bactéries assurent la fixation de l'azote atmosphérique au bénéfice de la plante hôte. La réussite de cette symbiose repose sur une communication complexe entre la bactérie et la plante, impliquant différentes molécules produites par les deux partenaires (Oldroyd *et al.*, 2011).

Chez *Rhizobium*, les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères extracellulaires jouant un rôle important dans l'établissement et le maintien de cette interaction symbiotique. Ils interviennent notamment dans l'adhésion des bactéries aux surfaces racinaires, la formation du biofilm, la protection contre les conditions environnementales défavorables et la progression du processus de nodulation. La production des EPS peut varier selon les souches bactériennes, ce qui peut influencer leur efficacité dans l'interaction avec la plante hôte (Acosta-Jurado *et al.*, 2021).

Ainsi, l'étude des exopolysaccharides produits par les souches de *Rhizobium* présente un intérêt important pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la symbiose plante-bactérie et pour sélectionner des souches ayant un potentiel biologique intéressant.

L'objectif de cette étude a été de caractériser les exopolysaccharides produits par des souches de *Rhizobium* isolées à partir des nodules de *Vicia faba*. Ce travail vise à réaliser l'isolement et l'identification phénotypique des isolats obtenus, à extraire les EPS produits et à évaluer leur teneur en glucides totaux par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique, afin d'estimer la capacité des différentes souches à produire ces polymères extracellulaires.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 :

SYMBIOSE

RHIZOBIUM

LéGUMINEUSE

1. La rhizosphère

1.1. Définition

La rhizosphère, concept introduit par Lorenz Hiltner en 1904, désigne la zone du sol directement influencée par les racines des plantes et leurs interactions avec l'environnement. Cette mince couche de sol, généralement située à 1–3 mm autour des racines, comprend le rhizoplan, l'endorhizosphère et l'ectorhizosphère. Elle se caractérise par des propriétés physiques, chimiques et biologiques particulières liées à la libération d'exsudats racinaires riches en composés organiques, favorisant une activité microbienne intense appelée « effet rhizosphère ». Considérée comme l'un des écosystèmes les plus dynamiques de la biosphère terrestre, elle abrite une densité microbienne 10 à 100 fois supérieure à celle du sol environnant, dominée notamment par les protéobactéries, les actinobactéries, les bactéroïdètes, les firmicutes, les acidobactéries ainsi que par les champignons des phylums Ascomycota et Basidiomycota (Solanki *et al.*, 2024)

1.2. Importance microbiologique

La rhizosphère est une zone de forte activité microbiologique où les exsudats racinaires favorisent le développement de communautés microbiennes diversifiées (Chauhan *et al.*, 2023). Les interactions entre les racines et le microbiote rhizosphérique jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques, la croissance des plantes et leur tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Philippot *et al.*, 2013). Les microorganismes de la rhizosphère améliorent la nutrition végétale grâce à la fixation biologique de l'azote, à la solubilisation du phosphore et à la production de phytohormones (Solanki *et al.*, 2024). Certains groupes microbiens, notamment les «Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)», stimulent la croissance et la productivité des plantes. De plus, les microorganismes bénéfiques contribuent à la protection des végétaux contre les agents pathogènes du sol et participent au maintien de la fertilité des sols (Berendsen *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2024).

2. Les légumineuses

2.1. Généralités

La famille des Légumineuses (*Leguminosae*) est un taxon botanique qui regroupe environ 800 genres et 20 000 espèces. Selon (Stagnari *et al.* 2017), elle représente la troisième plus grande famille de plantes à fleurs au monde. Cette famille se caractérise par une grande diversité

morphologique et écologique, s'étendant des espèces herbacées aux espèces ligneuses, et occupant un large éventail de milieux naturels et agricoles.

Les légumineuses alimentaires, ou légumes secs, occupent une place prépondérante dans les systèmes de production agricole durable. leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en association symbiotique avec des bactéries du sol les rend particulièrement adaptées aux systèmes de culture à faibles intrants (Stagnari *et al.* 2017).

Une analyse approfondie des pratiques culturales à l'échelle mondiale a révélé que les espèces de plantes les plus fréquemment cultivées incluent le soja (*Glycine max*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*), le pois (*Pisum sativum*) et la fève (*Vicia faba*) (Stagnari *et al.*, 2017).

2.2. Importance agronomique et nutritionnelle

2.2.1. Agronomique

L'intégration des légumineuses dans les rotations agricoles permet de réduire l'utilisation des engrais azotés, la consommation d'énergie et les émissions de gaz à effet de serre, contribuant ainsi à une agriculture plus durable. Contrairement au CO₂ issu de la fabrication des engrais azotés à partir d'énergies fossiles, le CO₂ libéré par les légumineuses fixatrices d'azote est d'origine atmosphérique et recyclé par la photosynthèse. Les légumineuses participent également à l'amélioration de la fertilité des sols en augmentant leur teneur en carbone organique, notamment dans les sols sableux, où elles présentent des effets plus favorables que certaines cultures céréalières, comme l'avoine (Stagnari *et al.*, 2017).

2.2.2. Nutritionnelle

Les légumineuses jouent un rôle essentiel face aux défis mondiaux tels que la sécurité alimentaire, le changement climatique et la demande énergétique croissante. Elles contribuent à des systèmes agricoles durables grâce à leur importance nutritionnelle, en tant que source majeure de protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale, avec des effets bénéfiques sur la santé. Elles favorisent également la diversification des cultures, la limitation des maladies et des ravageurs, ainsi que la réduction du déficit en protéines dans plusieurs régions du monde (Stagnari *et al.*, 2017).

2.3. La plante Hôte : *Vicia faba*. L

Vicia faba L. (fève) est une légumineuse de saison froide appartenant à la famille des Fabaceae, cultivée principalement pour ses graines riches en protéines (Etemadi *et al.*, 2019). Cette plante annuelle herbacée se caractérise par un port dressé, une tige robuste et creuse pouvant atteindre une certaine hauteur, ainsi qu'un système racinaire développé portant des nodosités symbiotiques. Elle possède des feuilles composées formées de folioles ovales et des fleurs papilionacées généralement blanches avec des taches foncées. Après la floraison, elle produit des gousses allongées contenant plusieurs graines, qui constituent la partie alimentaire de la plante (Figure 01). Ces graines présentent une valeur nutritionnelle élevée, bien qu'elles contiennent également certains composés antinutritionnels (Crépon *et al.*, 2010). Cette espèce établit une symbiose avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, permettant la fixation biologique de l'azote atmosphérique et contribuant ainsi à l'amélioration de la fertilité des sols (Allito *et al.*, 2020).

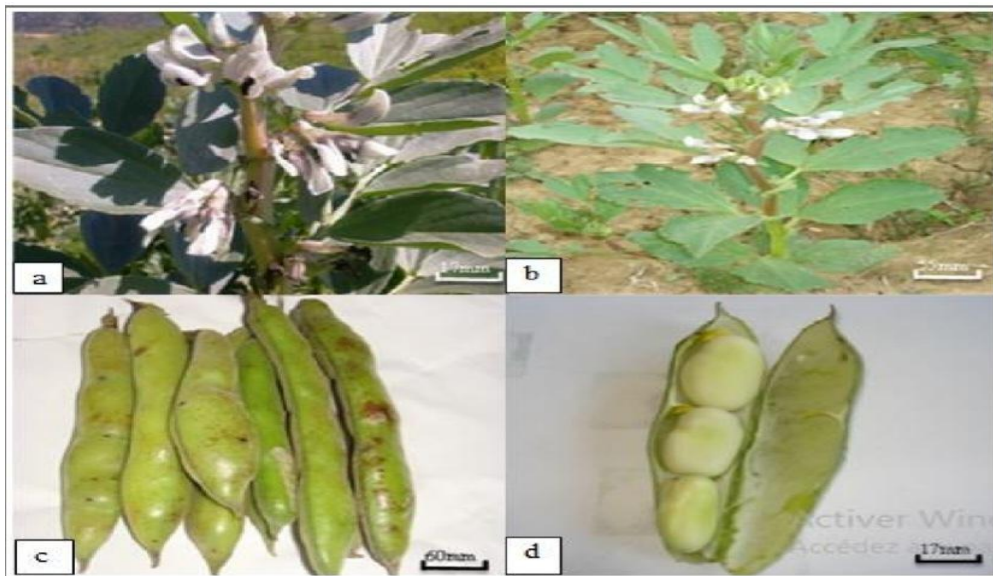


Figure 01: Les fleurs et les fruits de V. Faba L.

a: Feuilles et fleurs ; b : Tige ; c : gousses récoltées ; d : graines (Mezani, 2010).

3. Le genre *Rhizobium*

3.1. Généralités

Parmi la famille des rhizobactéries, les *rhizobiums* nodulant les légumineuses se distinguent par leur remarquable efficacité dans la stimulation de la croissance végétale. Ces bactéries

établissent des associations symbiotiques fixatrices d'azote avec les légumineuses, permettant ainsi un apport efficace en azote aux plantes hôtes (Zhao *et al.*, 2018).

Les rhizobia sont des bactéries du sol diazotrophes qui jouent un rôle essentiel dans la fertilisation des sols. Elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique après leur installation dans les nodules racinaires des légumineuses. Ces organismes, classés dans l'ordre des Rhizobiales, se distinguent par leur aptitude à infecter les poils absorbants des racines, ce qui conduit à la formation de nodules fixateurs d'azote (Mia et Shamsuddin, 2010).

Les rhizobia, entretiennent une relation symbiotique avec les légumineuses. Cette interaction s'effectue par le biais d'une communication chimique impliquant des flavonoïdes, des métabolites secondaires libérés par la plante hôte. Ces flavonoïdes activent les gènes de nodulation (nod), qui sont responsables de la synthèse des signaux nécessaires à la formation des nodules (Mia et Shamsuddin, 2010) (figure 02).

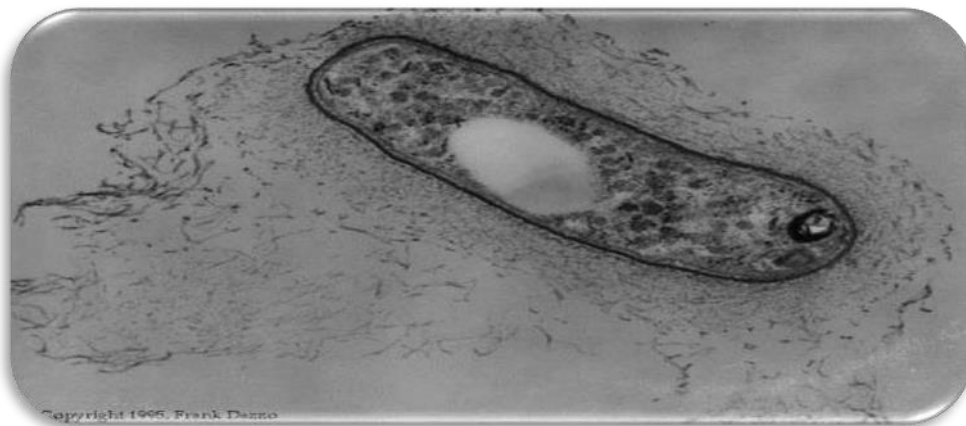


Figure 2: Observation microscopique de *Rhizobium trifolii*

3.2. Taxonomie actuelle du genre *Rhizobium*

Le genre *Rhizobium* appartient à la famille des Rhizobiaceae, à l'ordre des Hyphomicrobiales, à la classe des Alphaproteobacteria et au phylum des Proteobacteria. Les approches taxonomiques récentes basées sur la phylogénomique et l'analyse comparative des génomes ont montré que la classification traditionnelle fondée principalement sur le gène 16S rRNA présente certaines limites, en raison de la grande diversité génétique au sein de la famille des Rhizobiaceae (Ma *et al.*, 2023 ; Naranjo-Robayo *et al.*, 2025).

Ainsi, plusieurs réévaluations génomiques ont proposé une meilleure délimitation des genres et des espèces. Actuellement, les espèces du genre *Rhizobium* sont définies en combinant les données phylogénétiques, génomiques et les indices de similarité génétique tels que l'ANI et l'analyse du protéome central (tableau 1). Les bactéries appartenant à ce genre sont principalement connues pour leur capacité à établir une symbiose avec les légumineuses, formant des nodosités racinaires impliquées dans la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Ma *et al.*, 2023 ; Naranjo-Robayo *et al.*, 2025).

Tableau 1 : Position taxonomique actuelle du genre *Rhizobium* (adapté de Ma *et al.*, 2023).

Rang taxonomique	Classification
Domaine	Bacteria
Phylum	Pseudomonadota (<i>Proteobacteria</i>)
Classe	Alphaproteobacteria
Ordre	Hyphomicrobiales
Famille	Rhizobiaceae
Genre	<i>Rhizobium</i>
Espèces représentatives	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>R. Etli</i> , <i>R. Tropicum</i>

3.3. Caractères morphologiques et culturels

Les Rhizobia sont des bactéries aérobies à Gram négatif, bacillaires, mobiles et non sporulées, cultivées généralement sur milieu Yeast Manitol Agar (YMA à une température optimale d'environ 28 ± 2 °C. Elles présentent des colonies aux caractéristiques morphologiques variables, avec des formes circulaires à irrégulières et des marges entières ou lobées. Leur aspect et leur consistance peuvent varier de translucides à opaques et de sèches à muqueuses et brillantes, notamment en fonction de leur production d'exopolysaccharides (EPS). Sur le plan culturel, les isolats se distinguent par leur vitesse de croissance, permettant de différencier les souches à croissance rapide et celles à croissance lente (Ondieki *et al.*, 2017).

3.4. Caractères biochimiques et physiologiques

Les Rhizobia présentent des propriétés biochimiques et physiologiques diversifiées, caractérisées par des activités enzymatiques spécifiques telles que la catalase et l'oxydase, ainsi qu'une capacité à utiliser différentes sources de carbone et d'azote. Leur adaptation aux conditions environnementales se manifeste par des variations de tolérance aux contraintes du milieu. Leur importance physiologique repose principalement sur leur capacité à établir une symbiose avec les plantes légumineuses, conduisant à la formation de nodules racinaires et à la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Arora *et al.*, 2018).

4. La symbiose *Rhizobium*- légumineuse

La symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses est le résultat d'une interaction spécifique entre la plante hôte et les bactéries présentes dans le sol. Cette association débute par un échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires, permettant la reconnaissance mutuelle et l'établissement de la symbiose (Perret *et al.*, 2000).

À l'intérieur de ce nodule, les bactéries se différencient en bactéroïdes, formes spécialisées capables de transformer l'azote atmosphérique en ammoniac, une forme directement assimilable par la plante (Gibson *et al.*, 2008). Cette relation symbiotique constitue donc un mécanisme biologique essentiel, assurant l'apport en azote dans les systèmes agricoles et contribuant à l'amélioration de la fertilité des sols (Boddey *et al.*, 2000).

4.1. Formation des nodules

Une fois la reconnaissance mutuelle entre la plante et les rhizobia établie, les bactéries infectent les poils absorbants racinaires et pénètrent dans les tissus végétaux par l'intermédiaire du fil d'infection. Cette hypothèse est étayée par l'observation de divisions cellulaires au niveau du cortex racinaire, qui conduisent progressivement à la formation des nodules (Jones *et al.*, 2007). Selon (Oldroyd *et al.* 2011), les facteurs Nod produits par les rhizobia jouent également un rôle essentiel dans l'activation des mécanismes moléculaires responsables du développement nodulaire.

Les étapes des formations des nodules (Figure 3).:

1. La plante légumineuse sécrète des flavonoïdes qui attirent de façon spécifique les bactéries Rhizobium.
2. Les bactéries identifient la plante hôte et se fixent aux poils absorbants de la racine.
3. Cette interaction courbe le poil absorbant et favorise la formation d'un cordon d'infection.
4. Le cordon infectieux permet aux bactéries de pénétrer les tissus internes de la racine.
5. Le fil infectieux chemine ensuite dans les cellules du cortex racinaire où il se ramifie.
6. Les cellules du cortex se mettent à se diviser (mitose), ce qui déclenche la formation du nodule.
7. Un nodule racinaire visible se forme progressivement.
8. Le nodule devient alors fonctionnel, permettant la fixation biologique de l'azote atmosphérique au profit de la plante (Perrin, 2019).

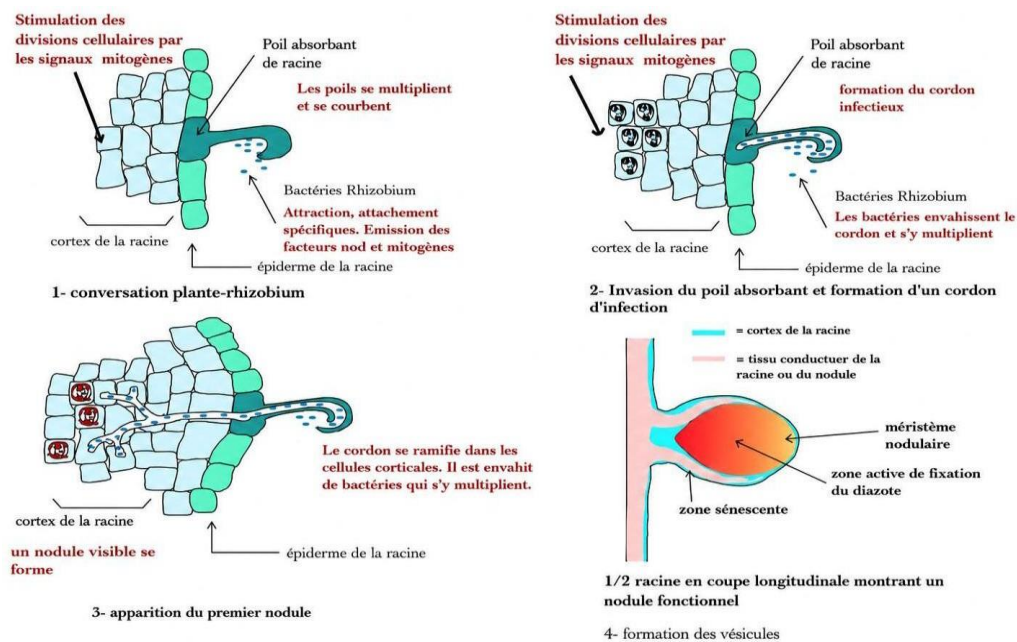


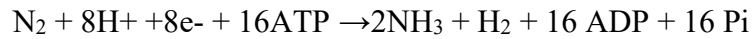
Figure 3 : les étapes de la nodulation (Perrin, 2019)

4.2. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus permettant la conversion de l'azote atmosphérique (N_2), non directement utilisable par les plantes, en formes azotées assimilables. Cette transformation est réalisée par certains microorganismes grâce à l'enzyme

nitrogenase(Koch et Sessitsch, 2024).

Chez les légumineuses, les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* établissent une association avec les racines, conduisant à la formation de nodules racinaires où se déroule la fixation de l'azote. Ce processus contribue à améliorer la nutrition azotée des plantes et à enrichir le sol en azote disponible (Koch et Sessitsch, 2024).



4.3. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote représente la circulation et la transformation de l'azote entre l'atmosphère, le sol et les organismes vivants. Il comprend plusieurs étapes biologiques assurées principalement par les microorganismes, notamment l'ammonification, qui libère l'azote minéral à partir de la matière organique, la nitrification qui convertit l'ammonium en nitrites puis en nitrates, ainsi que la dénitrification qui permet le retour de l'azote sous forme gazeuse vers l'atmosphère. Ce cycle joue un rôle essentiel dans le maintien de la fertilité des sols et la disponibilité de l'azote pour les plantes (figure 04) (Koch et Sessitsch, 2024).

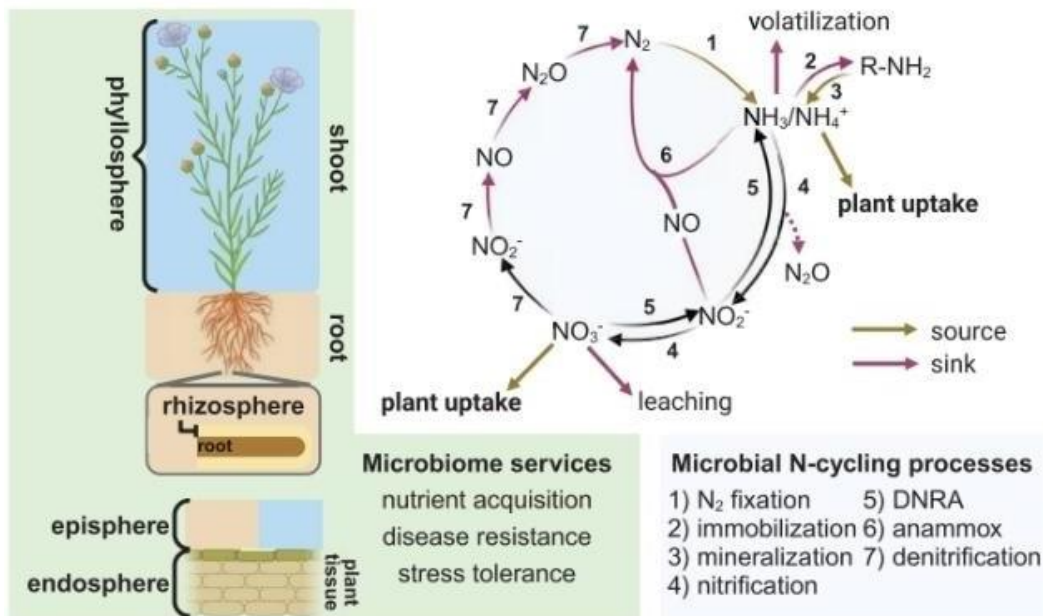


Figure 4 : Représentation du cycle de l'azote et des principales transformations microbiennes dans le sol et la rhizosphère (Koch & Sessitsch, 2024).

CHAPITRE 2 :

LES EXOPOLYSACCHARIDES

CHEZ *RHIZOBIUM*

Chapitre 2 : les exopolysaccharides chez *Rhizobium*

1. Définition des exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères glucidiques extracellulaires synthétisés par plusieurs microorganismes, notamment les bactéries du genre *Rhizobium*. Ils sont produits par la cellule bactérienne puis peuvent être libérés dans le milieu environnant ou rester associés à la surface cellulaire sous forme d'une matrice extracellulaire. Chez les rhizobia, les EPS jouent un rôle important dans les interactions avec la plante hôte en favorisant l'adhésion aux racines, la colonisation de la surface racinaire et l'établissement de la symbiose avec les légumineuses. La diversité de leur structure et de leur composition influence leurs fonctions biologiques (Marczak *et al.*, 2017 ; Acosta-Jurado *et al.*, 2021).

1.1. Classification des EPS

Les exopolysaccharides peuvent être différenciés selon la nature et la diversité des sucres qui composent leur structure. Ils comprennent principalement les **homopolysaccharides** et les **hétéropolysaccharides**.

Les homopolysaccharides présentent une structure formée par la répétition d'un seul type de monosaccharide. En revanche, les hétéropolysaccharides sont constitués de plusieurs monosaccharides différents associés dans une organisation plus complexe. Chez les bactéries du genre *Rhizobium*, les hétéropolysaccharides représentent une classe importante d'EPS en raison de leur implication dans les interactions plante-bactérie, notamment lors de la reconnaissance bactérienne et de la formation des nodules (Marczak *et al.*, 2017 ; Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Żebracki *et al.*, 2023).

2. Structure chimiques des EPS

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères extracellulaires constitués d'unités répétitives de monosaccharides reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Leur composition chimique varie selon l'espèce bactérienne et peut inclure différents sucres tels que le glucose, le galactose, le mannose et le rhamnose. Cette diversité structurale influence les propriétés physico-chimiques et les fonctions biologiques des EPS chez les bactéries du genre *Rhizobium* (Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Huang *et al.*, 2025).

La synthèse des EPS rhizobiens dépend de mécanismes génétiques spécifiques impliquant plusieurs enzymes, notamment les glycosyltransférases, qui participent à l'assemblage des

unités sucrées. Les voies de biosynthèse, telles que les systèmes Wzx/Wzy, contribuent à la formation et au transport des chaînes polysaccharidiques vers la surface cellulaire (Żebracki *et al.*, 2023).

Ainsi, la structure et la composition des EPS déterminent leurs propriétés et leur rôle dans les interactions entre *Rhizobium* et la plante hôte, notamment dans la colonisation racinaire et l'établissement de la symbiose (Acosta-Jurado *et al.*, 2021).

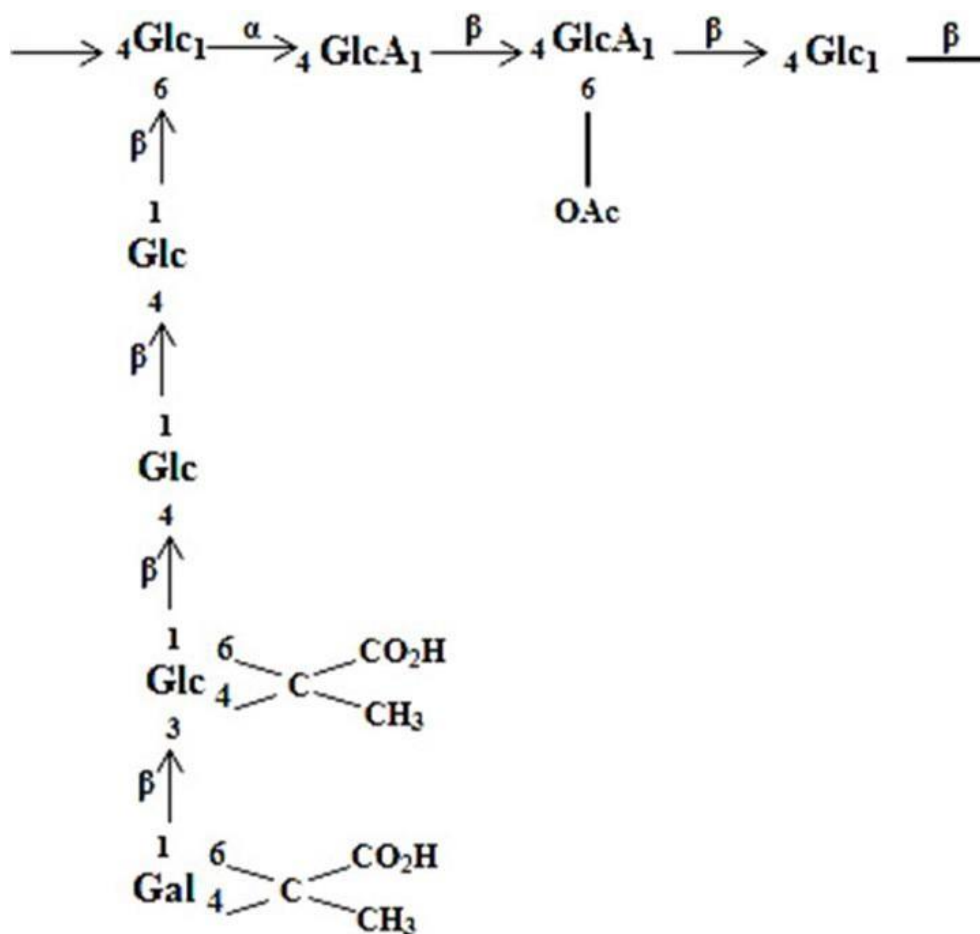


Figure 5: Structure chimique de l'EPS produit par *Rhizobium leguminosarum* bv.

Glu (glucose) ;Gal (galactose) ; Ac (acétyle)(Ghosh & Maiti, 2016).

3. Composition des EPS issus de *Rhizobium*

La composition chimique des exopolysaccharides (EPS) produits par le genre *Rhizobium* est hautement ordonnée et varie selon l'espèce ou la souche bactérienne, jouant un rôle clé dans la reconnaissance spécifique et la symbiose avec les plantes légumineuses. La composition des EPS produits par *Rhizobium* est réduite à quelques monosaccharides, dont le glucose, le galactose, le mannose, le rhamnose, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique (Tableau02) (Castellane *et al.*, 2015 ; Ghosh & Maiti, 2016).

Tableau 2: présente quelques exemples des EPS produits par Rhizobium

Micro-organisme	Variables étudiées	Conditions établies	Production d'EPS	Caractérisation des composants	Propriétés
<i>Rhizobium sp.</i> LBMP-C04	-	-	6,63 g L ⁻¹	Rhamnose Glucose Mannose Galactose Acide glucuronique Acide galacturonique	Comportement pseudoplastique Activité émulsifiante
<i>Rhizobium sp.</i> VMA301	Source de carbone Source d'azote Vitamines	Mannitol 1% p/v L-asparagine 0,3% p/v Biotine 1,5 mg L ⁻¹	346 mg L ⁻¹	-	-
<i>Rhizobium</i> D1 10	Source de carbone Source d'azote Vitamines Ions métalliques	Mannitol 2% p/v KNO ₃ 0,1% p/v Hydrochlorure de thiamine 1 mg mL ⁻¹	1 122 mg mL ⁻¹	Xylose Rhamnose Glucose Galactose Arabinose	-
<i>Rhizobium sp.</i> PRIM-18	-	-	2,1 g L ⁻¹	-	Émulsifiant, antioxydant et chélateur de métaux Augmentation de la prolifération cellulaire (fibroblastes dermiques humains)
<i>Rhizobium</i> radiobacter S10	Source de carbone	Lactosérum 10% p/p	2 834 mg L ⁻¹	Galactose Glucose Glucosamine Mannose	Comportement pseudoplastique
<i>Rhizobium tropici</i> LBMP-C01	-	-	3,48 g L ⁻¹	Rhamnose Glucose Galactose	Comportement pseudoplastique Activité émulsifiante
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Source de carbone pH Rapport C/N	Saccharose 55 mM pH 6,9 C/N 20	4,08 g L ⁻¹	-	-
<i>Rhizobium tropici</i> Semia 4077	-	-	7,45 g L ⁻¹	Mannose Rhamnose Acide glucuronique Acide galacturonique Glucose Galactose	Comportement pseudoplastique Activité émulsifiante

4. Rôles biologiques des EPS

4.1. Adhésion racinaire

Les exopolysaccharides (EPS) constituent des déterminants majeurs dans les premières étapes de l'interaction symbiotique entre *Rhizobium* et les plantes légumineuses. Ils interviennent dès les phases initiales de reconnaissance et d'adhésion bactérienne à la surface des poils absorbants racinaires, condition indispensable à l'établissement de la symbiose.

Cette interaction repose sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire finement régulés impliquant des récepteurs végétaux spécifiques, notamment EPR3, capables de détecter les polysaccharides bactériens et d'évaluer la compatibilité symbiotique. Ainsi, les EPS ne se limitent pas à un rôle structural, mais agissent également comme signaux biologiques participant à la sélection du partenaire symbiotique (Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Yang *et al.*, 2022).

4.2. Formation de biofilm

Les EPS représentent la composante principale de la matrice extracellulaire du biofilm bactérien, assurant la cohésion cellulaire et l'organisation tridimensionnelle des communautés microbiennes à la surface des racines. Cette matrice confère aux bactéries une meilleure capacité d'adhésion, une protection accrue et une adaptation optimale aux conditions fluctuantes de la rhizosphère (Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Janczarek *et al.*, 2024).

Chez *Rhizobium*, la production d'EPS est directement corrélée à l'efficacité de colonisation racinaire et à la stabilité du biofilm, favorisant ainsi la persistance bactérienne dans l'environnement racinaire et augmentant le potentiel symbiotique. Ce rôle structurant des EPS dans la formation du biofilm et l'adaptation environnementale a été largement mis en évidence (Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Janczarek *et al.*, 2024).

4.3. Protection contre les stress environnementaux

Les EPS jouent un rôle essentiel dans la protection des cellules bactériennes contre divers stress abiotiques, notamment le stress osmotique, la dessiccation et la salinité. Grâce à leur nature hydrophile et leur capacité à retenir l'eau, ils contribuent à la formation d'un microenvironnement hydraté autour des cellules bactériennes.

Cette matrice extracellulaire agit comme une barrière physique et chimique, réduisant l'impact des conditions environnementales défavorables et améliorant significativement la survie des rhizobia dans les sols soumis à des contraintes hydriques ou salines. Plusieurs études ont confirmé l'implication des EPS dans l'adaptation des bactéries aux stress abiotiques (Sashidhar *et al.*, 2022 ; Maswada *et al.*, 2022 ; Pham *et al.*, 2024).

4.4. Rôle dans la nodulation

Les EPS occupent une place centrale dans le processus de nodulation chez les légumineuses, en participant activement aux étapes précoces de la formation du filament d'infection et à la progression de l'infection bactérienne vers les tissus corticaux de la racine.

Ils interviennent également dans la signalisation symbiotique entre la bactérie et la plante hôte, notamment via l'interaction avec des récepteurs végétaux tels que EPR3, permettant à la plante de contrôler la compatibilité de l'infection et de réguler la formation des nodules fixateurs d'azote. Ainsi, les EPS apparaissent comme des facteurs essentiels à la réussite et à la spécificité de la symbiose *légumineuse-Rhizobium* (Acosta-Jurado *et al.*, 2021 ; Yang *et al.*, 2022).

5. Facteurs influencent la production des EPS

5.1. pH

Le pH du milieu de culture influence la production des EPS en agissant sur la croissance bactérienne et l'activité enzymatique impliquée dans leur biosynthèse. Un pH optimal favorise une production plus élevée, tandis que les conditions acides ou alcalines peuvent la réduire (Pham *et al.*, 2024).

5.2. Température

La température est un facteur important qui influence à la fois la croissance des Rhizobia et la synthèse des EPS. Chaque souche présente une plage de température optimale permettant une production maximale, alors que les températures non adaptées entraînent une diminution de cette production (Janczarek *et al.*, 2024 ; Pham *et al.*, 2024).

5.3. Source de carbone

La source de carbone joue un rôle clé dans la production des EPS, car elle fournit les éléments nécessaires à leur synthèse. Selon sa nature, elle peut soit stimuler la production des EPS, soit favoriser la croissance cellulaire au détriment de leur synthèse (Pham *et al.*, 2024).

5.4. Salinité

La salinité est un facteur de stress qui influence la production des EPS chez les rhizobia. En conditions salines, une augmentation de la production des EPS est souvent observée, car ils participent à la protection des cellules contre le stress osmotique et les conditions défavorables (Maswada *et al.*, 2022 ; Sashidhar *et al.*, 2022 ; Huang *et al.*, 2025).

6. Méthodes de dosage et de caractérisation des exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides (EPS) produits par les microorganismes peuvent être étudiés à l'aide de plusieurs méthodes qui permettent d'évaluer leur quantité et leurs caractéristiques. Parmi les méthodes utilisées pour le dosage des EPS, la méthode colorimétrique au **phénol-acide sulfurique** décrite par (Dubois *et al.*, 1956) est l'une des plus fréquemment appliquées.

Elle est basée sur la transformation des glucides en un composé coloré après l'ajout d'acide sulfurique et de phénol, ce qui permet d'estimer la concentration globale des sucres présents dans l'échantillon par mesure spectrophotométrique.

D'autres méthodes peuvent également être utilisées pour le dosage des glucides, comme la méthode à l'**anthrone** proposée initialement par (Dreywood, 1946) et utilisée pour la quantification des sucres par (Morris, 1948). Cette méthode repose aussi sur une réaction colorée et permet une estimation de la teneur totale en glucides.

En complément du dosage, certaines techniques sont utilisées pour mieux comprendre la composition et la structure des EPS. La méthode au **bleu Alcian** permet notamment de mettre en évidence les polysaccharides présentant des groupements acides (Steedman, 1950).

Des méthodes plus avancées comme la **HPLC** permettent d'identifier les différents sucres constituant les EPS, alors que la **FTIR** fournit des informations sur les principales fonctions chimiques présentes dans leur structure (Coates, 2000).

7. Applications biotechnologiques et industrielles des EPS bactériens

Les exopolysaccharides (EPS) sont des biopolymères produits par de nombreux microorganismes et présentent un intérêt majeur dans divers domaines biotechnologiques.

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques telles que la viscosité élevée, la capacité de rétention d'eau, la formation de matrices protectrices et leurs propriétés rhéologiques, ils sont largement exploités dans plusieurs secteurs industriels (Freitas et al., 2011 ; Yildiz et Karataş, 2018).

Ils jouent également un rôle important dans la protection des cellules microbiens contre divers stress environnementaux tels que la dessiccation, le stress osmotique et la présence d'agents toxiques, ce qui augmente leur intérêt en biotechnologie et en agriculture durable (Freitas et al., 2011).

7.1. Applications Agricoles

Dans le domaine agricole, les EPS jouent un rôle central dans les interactions entre les bactéries symbiotiques du sol et les plantes- légumineuses.

Chez les bactéries du genre *Rhizobium*, ils participent à l'adhésion des cellules bactériennes aux racines, facilitent la reconnaissance plante-bactérie et contribuent à l'établissement et au développement des nodules fixateurs d'azote. (Frayssé et al., 2003 ; Ghosh et Maiti, 2016).

Ces fonctions sont essentielles pour la réussite de la symbiose et font des EPS des molécules d'intérêt pour l'amélioration des inoculants microbiens et le développement de biofertilisants destinés aux cultures de légumineuses (Frayssé et al., 2003 ; Ghosh et Maiti, 2016).

De plus, les EPS améliorent la colonisation des racines et la persistance des bactéries dans le sol, ce qui augmente l'efficacité des interactions symbiotiques et la stabilité des associations plante-microorganisme (Ghosh et Maiti, 2016).

7.2. Applications dans l'industrie alimentaire

Les EPS microbiens sont utilisés dans l'industrie alimentaire en tant qu'additifs naturels améliorant la texture, la stabilité et les propriétés rhéologiques des produits. Ils agissent principalement comme agents épaississants, stabilisants et modificateurs de viscosité. Leur efficacité dépend de leur stabilité face aux variations de pH, de température et de composition des formulations alimentaires (Freitas et al., 2011 ; Yildiz et Karataş, 2018).

Ils permettent également d'améliorer les propriétés sensorielles des produits alimentaires, notamment la texture et la sensation en bouche, ce qui les rend utiles dans les formulations à teneur réduite en matières grasses (Yildiz et Karataş, 2018).

7.2. Applications médicales et pharmaceutiques

Certains EPS présentent des activités biologiques intéressantes, ce qui leur confère un potentiel d'application dans les domaines médical et pharmaceutique. Ils peuvent être exploités pour leurs propriétés antioxydantes, immunomodulatrices et anti-inflammatoires, ainsi que pour le développement de biomatériaux et de molécules à valeur ajoutée (Moscovici, 2015).

Ils sont également étudiés comme systèmes de libération contrôlée de médicaments et comme matrices d'encapsulation de composés bioactifs, ce qui renforce leur intérêt en ingénierie biomédicale (Moscovici, 2015).

MATÉRIELS
ET
MÉTHODES

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1. Description de la zone d'étude

Dans le cadre de cette étude, trois échantillons ont été prélevés dans deux zones différentes situées dans la commune de Ghazaouet, wilaya de Tlemcen. Les deux premiers échantillons, désignés respectivement par AA et SA, proviennent de la région de Sidi Aïssa, tandis que le troisième échantillon a été collecté dans la zone de Stade. Ces prélèvements ont été réalisés afin d'obtenir des échantillons représentatifs destinés aux analyses expérimentales (figure 06).



Figure 6 : Carte géographique de la zone d'étude

1.2. Collecte des plantes

La collecte des plantes a été réalisée au cours du mois de février, période durant laquelle les nodules racinaires sont suffisamment développés et facilement observables sur les racines. Les plantes ont été extraites en creusant le sol jusqu'à une profondeur d'environ 20 centimètres, afin de récupérer l'ensemble du système racinaire tout en évitant d'endommager les nodules (Figure 07).



Figure 7 : Collecte des plantes

1.3. Prélèvement des nodules

Dans le cadre de l'expérimentation, la partie aérienne des plantes est méticuleusement isolée du système racinaire, permettant ainsi l'extraction des nodules destinés à des analyses ultérieures. Dans un second temps, les racines portant les nodules sont délicatement rincées à l'eau du robinet, ce qui permet d'éliminer les traces de sol et les impuretés. Dans un second temps, les nodules sont méticuleusement prélevés à l'aide de ciseaux, puis séchés à l'aide d'un papier absorbant afin d'éviter toute altération (figure 08).



Figure 8 : Plante extraite avec son appareil racinaire

1.4. Stérilisation des nodules

Les nodules sont d'abord lavés plusieurs fois à l'eau stérile pour enlever les saletés superficielles. Ensuite, elles sont stérilisées en étant immergées dans de l'éthanol à 70 % et traitées à l'hypochlorite de sodium pendant environ 2 à 5 minutes. Après, on rince les nodules plusieurs fois à l'eau stérile pour enlever tout résidu de produit de stérilisation (figure 09).



Figure 9 : La stérilisation des nodules

1.5. Ecrasement des nodules

Dans un environnement stérile, à proximité d'un bec Bunsen, chaque nodule est méticuleusement broyé dans un tube à hémolyse stérile contenant deux gouttes d'eau distillée stérile, à l'aide d'une tige préalablement stérilisée (figure 10). Cette procédure permet d'obtenir une suspension de bactéroïdes. Une goutte de cette suspension est ensuite prélevée avec une anse de platine stérile, puis étalée sur un milieu approprié (Benidire *et al.*, 2018).



Figure 10 : L'écrasement des nodules

1.6. Milieux de culture utilisés

Dans le cadre de cette étude, quatre milieux de culture ont été préparés selon le protocole de Legesse (2016) : (annexe I).

- **YMA (Yeast Mannitol Agar)** : milieu solide sélectif dédié à l'isolement des bactéries du genre *Rhizobium*.
- **YMB (Yeast Mannitol broth)**: milieu liquide
- **YMA + Rouge Congo** : milieu YMA additionné de 10 mL de solution de Rouge Congo.
- **Milieu GPA** : milieu permettant la différenciation entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

1.7. Isolement et purification des isolats

Pour isoler les *rhizobiums*, chaque nodule a été préalablement broyé, puis la suspension obtenue a été étalée sur un milieu solide YMA. Cette étape permet d'obtenir des colonies bien individualisées, facilitant ainsi leur identification et leur caractérisation. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C durant 3 jours. À l'issue de cette période, les colonies présentant un aspect similaire ont été sélectionnées, repiquées et purifiées, avant d'être ensemencées sur de nouvelles boîtes contenant le même milieu YMA.

2. Caractérisation morphologique

2.1. Examen macroscopique

L'observation à l'œil nu des colonies a porté sur plusieurs critères descriptifs, notamment leur morphologie, leur texture ainsi que leur diamètre.

2.2. Examen microscopique

2.2.1. Observation à l'état frais

Une culture bactérienne prélevée à partir d'un bouillon YMB a été déposée sur une lame en verre. La préparation a ensuite été recouverte d'une lamelle et observée au microscope optique à l'objectif $\times 40$ (Denis *et al.*, 2016).

2.2.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique différentielle permettant de distinguer les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, sur la base de leur morphologie et de la composition de leur paroi cellulaire. Le protocole de coloration suivi est décrit en annexe III (Putrie *et al.*, 2016). L'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif $\times 100$, en immersion à l'huile.

3. Caractères biochimiques

3.1. Test de catalase

Le test de catalase permet de détecter la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries. Une colonie bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée. L'apparition de bulles indique une réaction positive (Gordon&McLeod.,1928).

3.2. Test d'oxydase

Le test d'oxydase met en évidence l'enzyme cytochrome oxydase. Une colonie bactérienne est étalée sur une bandelette d'oxydase humidifiée. Une coloration violette ou bleu foncé indique une réaction positive (Kovacs.,1956).

3.3. Test de rouge congo (RC)

Le test a été réalisé sur milieu YMA additionné d'une solution de Rouge Congo à 1%. La coloration rouge des colonies indique l'absorption du colorant et la production de polysaccharides (Freeman *et al.*,1989).

3.4. Test GPA

Ce test permet de confirmer l'identité des souches de *Rhizobium*. Les colonies purifiées sur YMA ont été ensemencées en stries sur milieu GPA, puis incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours.

L'absence de croissance confirme qu'il s'agit bien de *Rhizobium*, ces bactéries étant incapables d'utiliser la peptone comme source de carbone. En revanche, un changement de couleur du milieu traduit la présence de contaminants, notamment *Agrobacterium* (Hugh et Leifson.,1953).

3.5. Test du citrate de Simmons

Ce test évalue la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme unique source de carbone. Une colonie isolée a été ensemencée en stries sur gélose inclinée au citrate de Simmons à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubée à 28°C pendant 72 heures.

Un virage de couleur du vert au bleu indique un résultat positif, tandis qu'une couleur verte persistante traduit une réaction négative (Simmon.,1926).

3.6. Test de la nitrate réductase

La nitrate réductase est une enzyme bactérienne catalysant la réduction du nitrate en nitrite. Ce test vise à détecter sa présence chez les souches de *Rhizobium* étudiées.

La souche est ensemencée dans 5 mL de bouillon nitraté, puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, 3 gouttes du réactif nitrate 1 et 3 gouttes du réactif nitrate 2 sont ajoutées. En absence de coloration, de la poudre de zinc est ajoutée et la couleur du milieu est observée (Griess.,1879).

4. Conservation des isolats

Court terme : les souches de *Rhizobium* ont été ensemencées sur gélose inclinée YMA dans des tubes à essai, incubées à 28°C jusqu'à apparition de croissance, puis stockées à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 1 à 6 mois (Vincent, 1970).

Long terme : les souches ont été cultivées dans 5 mL de bouillon YMB, puis additionnées de glycérol stérile à 50% (v/v) comme cryoprotecteur, transférées dans des tubes Eppendorf stériles et conservées à -20°C (Shetta *et al.*, 2011).

5. Extraction et purification des exopolysaccharide chez *rhizobium*

5.1. Extraction des exopolysaccharides

L'extraction des EPS a été réalisée selon un protocole standard décrit dans la littérature (Marczak *et al.*, 2017 ; Yadav *et al.*, 2024), complété par des méthodes classiques de purification des polysaccharides impliquant la centrifugation, la déprotéinisation au TCA et la précipitation à l'éthanol (Dubois *et al.*, 1956 ; Pham *et al.*, 2024).

- **Pré-culture** : Une colonie pure de *Rhizobium* sp. A été inoculée dans 50 mL de milieu YMB et incubée à 28°C sous agitation à 150 rpm pendant 24 à 48 heures .
- **Culture principale** : Un inoculum de 4% (v/v) a été transféré dans 100 mL de milieu YMB frais et incubé à 28–30°C sous agitation à 150–200 rpm pendant 48 à 72 heures .
- **Récupération du surnageant** :Après fermentation, la culture a été centrifugée à 10 000 g pendant 15–20 minutes à 4°C afin d'éliminer la biomasse cellulaire. Le surnageant obtenu a été filtré sur membrane de 0,45 µm.
- **Déprotéinisation** : De l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% a été ajouté au surnageant (10 mL pour 100 mL), puis incubé à 4°C pendant 2 heures. Les protéines précipitées ont été

éliminées par centrifugation à 8 000 g pendant 15 minutes .

- **Précipitation des EPS** :Trois volumes d'éthanol froid (95–99%) ont été ajoutés au surnageant déprotéinisé, suivis d'une incubation à 4°C pendant 12 à 24 heures. Le précipité d'EPS a été récupéré par centrifugation à 8 000 g pendant 20 minutes.
- **Lavage** : Le précipité a été lavé avec de l'eau distillée stérile et re-précipité à l'éthanol afin d'éliminer les impuretés résiduelles .

6. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique au phénol–acide sulfurique décrite par (Dubois *et al.*, 1956). Cette méthode est basée sur la déshydratation des glucides par l'acide sulfurique concentré, suivie de leur condensation avec le phénol, formant un complexe coloré jaune-orangé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en glucides.

Une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution mère de D-glucose à 200 µg/mL, couvrant des concentrations comprises entre 25 et 175 µg/mL dans un volume final de 5 mL complété avec de l'eau distillée.

Un volume de 1 mL du surnageant a été mélangé avec 1 mL de solution de phénol à 5 %, puis 5 mL d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄, 95–98 %) ont été ajoutés rapidement. Le mélange a été homogénéisé immédiatement et incubé à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante. Les solutions étalons ont été traitées dans les mêmes conditions. L'absorbance a été mesurée à 485 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant l'eau distillée comme blanc. La concentration en glucides a été déterminée par interpolation à partir de la courbe d'étalonnage selon l'équation de régression linéaire obtenue.

RéSULTATS
ET
DISCUSSION

1. Isolement et purification des isolats

Après une incubation à 28 °C, l'isolement des bactéries à partir des nodules de *Vicia faba* a permis d'obtenir plusieurs isolats aux caractères culturels similaires, a orienté leur identification vers le genre *Rhizobium* (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des prélèvements

Prélèvement	Nombre des souches
AA	6
SA	4
STADE	4

2. Caractères morphologiques

2.1. Examen macroscopique

Après une incubation de 2 à 3 jours à 28 °C sur milieu YMA, des colonies bactériennes ont été isolées. Ces colonies présentent un aspect blanc crème, une forme généralement circulaire, une surface lisse et brillante, ainsi qu'une texture muqueuse. Ces observations sont compatibles avec les caractéristiques généralement attribuées aux bactéries du genre *Rhizobium*. L'aspect visqueux des colonies est généralement associé à la production d'exopolysaccharides (EPS) (Skorupska *et al.*, 2006 ; Acosta-Jurado *et al.*, 2021) (figure11).

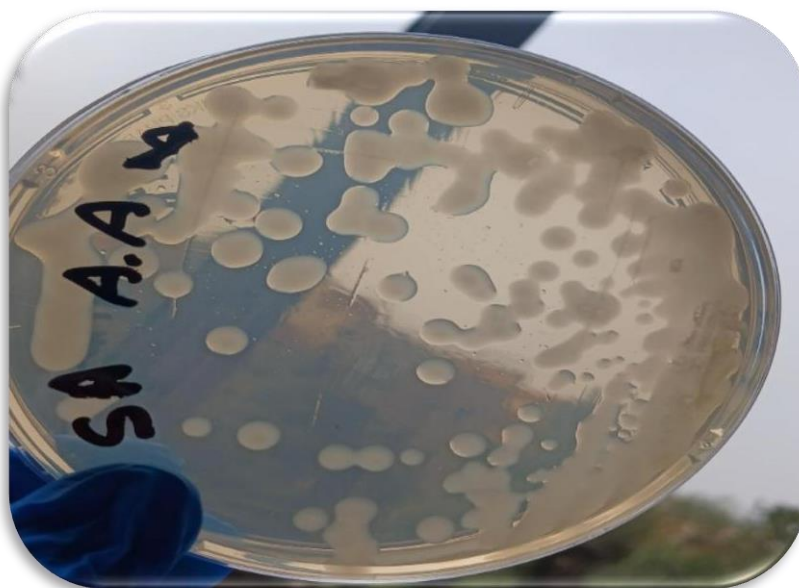


Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées à partir des nodules de *Vicia faba* sur milieu YMA après incubation à 28°C.

2.2. Examen microscopique

2.2.1. Observation à l'état frais

L'observation réalisée au microscope optique (Objectif 40) a mis en évidence des coccobacilles mobiles. Cette mobilité est assurée par la présence de flagelles situés à la surface cellulaire. Grâce à cette caractéristique, ces bactéries peuvent se déplacer et coloniser les racines, contribuant ainsi à la fixation symbiotique de l'azote. Par ailleurs, elles sont capables d'établir différentes interactions avec d'autres microorganismes, soit de type symbiotique, notamment avec les bactéries PGPR, soit de type compétitif, exerçant alors un effet antagoniste vis-à-vis des bactéries phytopathogènes responsables de maladies chez les plantes (El-Haloui *et al.*, 1986).

2.2.2. Coloration de Gram

Après la coloration de Gram, l'ensemble des souches isolées a présenté une morphologie homogène sous forme de bacilles à Gram négatifs (figure12). Ce résultat est en accord avec de nombreuses études antérieures, qui décrivent ce caractère comme typique du genre *Rhizobium*. La teinte rose observée s'explique par l'architecture de leur paroi cellulaire, caractérisée par une fine couche de peptidoglycane associée à des lipopolysaccharides. Cette structure ne retient pas le complexe cristal violet-iode lors de l'étape de décoloration à l'alcool, ce qui permet la

fixation du contre-colorant, la fuchsine, responsable de la coloration rose (Degefu *et al.*, 2018 ; Wulandari *et al.*, 2024).

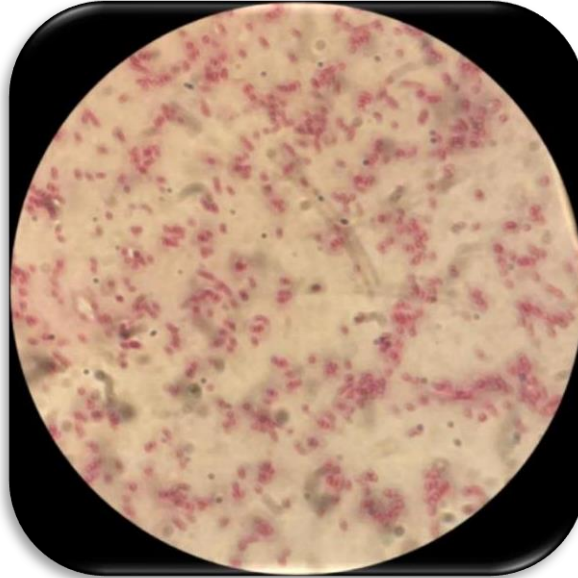


Figure 12 : Résultat de coloration de Gram

3. Test biochimiques

3.1. Test de catalase

Les souches bactériennes isolées ont présenté une réaction positive au test de la catalase, mise en évidence par l'apparition immédiate de bulles après addition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure13). Cette réaction traduit la présence de l'enzyme catalase impliquée dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Ce caractère est fréquemment observé chez les bactéries du genre *Rhizobium* et constitue un critère important dans leur identification phénotypique. Des études ont montré que la majorité des isolats de rhizobia présentent une activité catalase positive dans les tests biochimiques classiques (Sadowsky *et al.*, 1983 ; Khandelwal et Vyas, 2024).



Figure 13 : Résultat de test de catalase

3.2. Test d'oxydase

Le test de l'oxydase a révélé une réaction positive chez les isolats, mise en évidence par l'apparition rapide d'une coloration violette. Ce résultat indique la présence de la cytochrome c oxydase, caractéristique de la chaîne respiratoire aérobie. Ainsi, les souches étudiées présentent un profil oxydase positif, conforme aux caractéristiques généralement rapportées chez les bactéries du genre *Rhizobium* et aux travaux antérieurs (Sadowsky *et al.*, 1983 ; Arthikala *et al.*, 2017).

3.3. Test de citrate de Simmons

La (figure 14) représente des résultats variables selon les souches, avec un changement de couleur du milieu de vert à bleu pour certaines d'entre elles. Ce changement indique la capacité de certaines souches à utiliser le citrate grâce à des enzymes spécifiques du cycle métabolique. Toutefois, cette caractéristique n'est pas constante chez toutes les espèces de *Rhizobium* et peut varier selon les souches étudiées. Cette variabilité a également été rapportée dans des études de caractérisation biochimique des rhizobia (Panwar *et al.*, 2012).

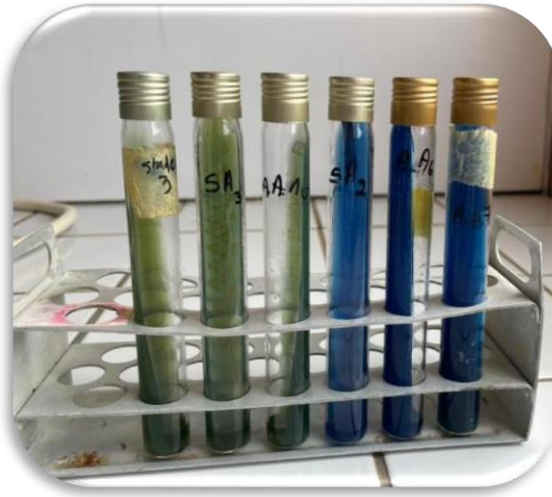


Figure 14 : Résultat de test du citrate de Simmons

3.4. Test de la nitrate réductase

Le test de réduction des nitrates a révélé une réaction positive chez les souches étudiées, mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge après l'ajout des réactifs de Griess (figure 15). Ce résultat indique la capacité des isolats à réduire les nitrates en nitrites grâce à l'activité de la nitrate réductase. Des résultats similaires ont été rapportés chez des isolats de *Rhizobium* lors de leur caractérisation biochimique (Panwar *et al.*, 2012).



Figure 15 : Résultat de test nitrate réductase

3.5. Croissance sur le milieu YMA+RC

Les colonies obtenues après purification sur le milieu YMA additionné de rouge Congo présentaient un aspect visqueux, bombé et mucilagineux, avec une légère coloration rosée (figure 16). Cette faible absorption du rouge Congo constitue une caractéristique généralement

associée au genre *Rhizobium*. Des observations similaires ont été rapportées par Somasegaran *et* Hoben (1994), qui indiquent que les colonies de *Rhizobium* absorbent peu ou pas ce colorant après une incubation de 48 à 72 heures à 28 °C. Ces résultats confirment ainsi l'appartenance probable des isolats étudiés au groupe des rhizobia.



Figure 16 : Résultat de croissance sur YMA-RC

3.6. Test de GPA

Après une incubation de 3 jours à 28 °C sur le milieu GPA, aucune croissance bactérienne n'a été observée chez les isolats étudiés. La plupart des boîtes n'ont présenté aucun changement de couleur du milieu, tandis que certaines ont montré une légère coloration jaunâtre (figure 17). Cependant, cette modification est demeurée faible et n'a été associée à aucune croissance bactérienne. Ces observations suggèrent que les isolats étudiés présentent les caractéristiques généralement attribuées aux bactéries du genre *Rhizobium* sur ce milieu. Des résultats similaires ont été rapportés par (Singh *et al.*, 2008) et (Pervin *et al.*, 2017), qui ont utilisé le milieu GPA pour distinguer les Rhizobia des bactéries du genre *Agrobacterium*.

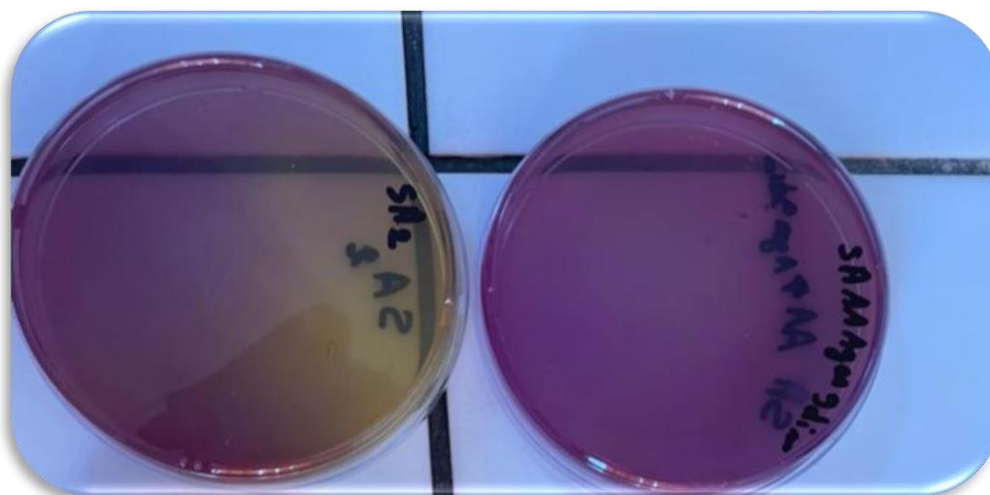


Figure 17 : Résultat de croissance sur le milieu GPA

4. Extraction des EPS

Après la phase de préculture et de culture de *Rhizobium sp.*, une modification visible du milieu de culture a été observée, traduisant une activité métabolique active de la souche et la production de composés extracellulaires, notamment les exopolysaccharides (EPS).

Suite à la centrifugation initiale, une diminution du volume du surnageant a été constatée après séparation de la biomasse cellulaire. Le surnageant récupéré présentait un aspect légèrement trouble, ce qui peut être attribué à la présence de macromolécules solubles et de résidus cellulaires non totalement éliminés.

L'ajout de l'acide trichloroacétique (TCA) (figure18), à 10 % a permis la déprotéinisation du surnageant par précipitation des protéines. Après une incubation de 2 heures à 4°C, une seconde centrifugation a conduit à l'élimination du précipité protéique, laissant un surnageant plus clarifié. Cette étape est essentielle pour améliorer la pureté des EPS, comme l'ont rapporté (Pham *et al.*,2024), qui ont montré que le TCA permet une séparation efficace des protéines contaminantes dans les extraits polysaccharidiques bactériens.

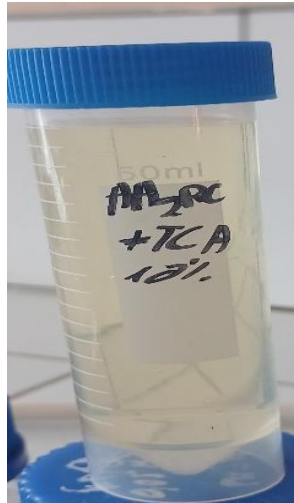


Figure 18: la déprotéinisation avec le TCA 10%

La précipitation des EPS par l'éthanol froid a ensuite permis la récupération d'une quantité relativement faible mais visible de polysaccharides sous forme de précipité blanc. Cette faible quantité peut être liée aux conditions de culture ou à la capacité intrinsèque de la souche utilisée à produire des EPS. Selon (Marczak *et al.*, 2017), la précipitation à l'éthanol est une méthode classique et efficace pour la récupération des exopolysaccharides bactériens, bien que le rendement puisse varier fortement selon la souche et les conditions de croissance (figure 19).

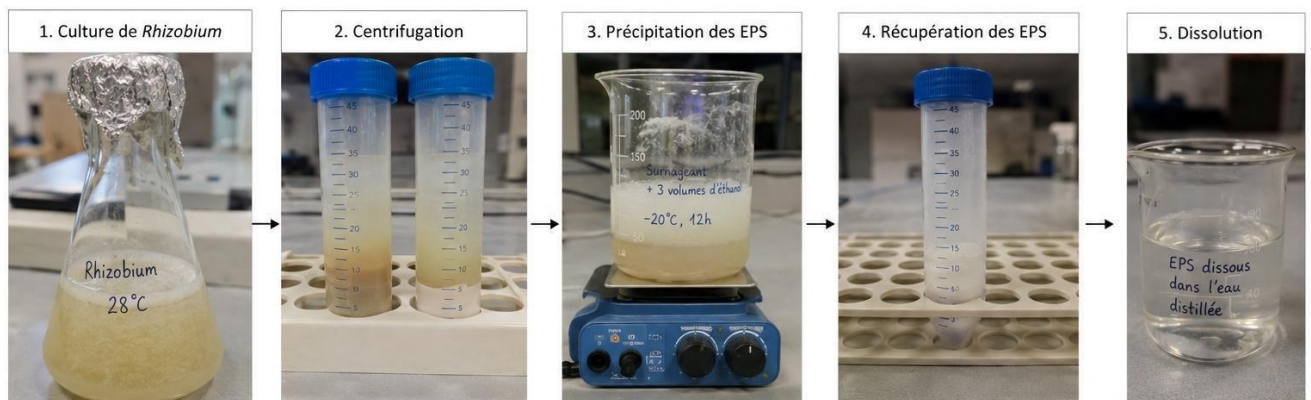


Figure 19: extraction et purification des exopolysaccharides chez rhizobium

Enfin, l'ensemble des fractions obtenues a été regroupé afin de constituer l'échantillon total d'EPS destiné au dosage des sucres totaux par la méthode au phénol-acide sulfurique (figure20).

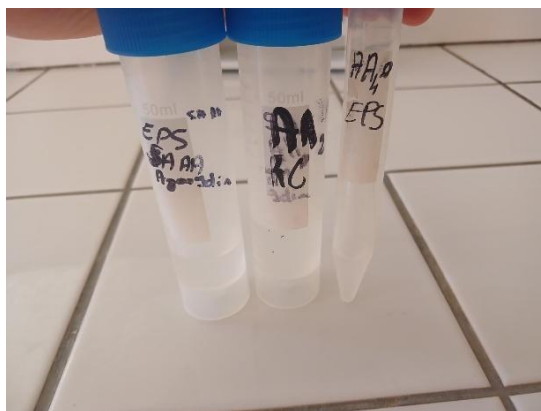


Figure 20 : les EPS obtenus

5. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux des exopolysaccharides (EPS) des quatre souches de *Rhizobium* isolées a été réalisé par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Les résultats ont été obtenus par interpolation sur une courbe étalon établie avec une gamme de D-glucose (0–175 µg/mL), présentant un coefficient de détermination de $R^2 = 0,954$, ce qui témoigne d'une bonne linéarité de la relation entre la concentration et l'absorbance mesurée à 485 nm (Tableau 4, Figure22).

Tableau 4 : Gamme étalon D-glucose

Tube	C (µg/mL)	DO (485 nm)
Blanc	0	0
1	25	0,51
2	50	0,54
3	75	0,88
4	100	0,97
5	125	1,30
6	150	1,97
7	175	2,00

La coloration obtenue après la méthode “phénol–acide sulfurique” confirme la présence des glucides dans les extraits EPS (Figure21). L’intensité de la coloration varie selon les souches étudiées. D’après les résultats du dosage, la souches AA7 présente la meilleure production d’EPS contrairement aux autres souches qui montrent une production plus faible.

Le dosage des glucides totaux par la méthode au phénol–acide sulfurique a permis de confirmer la présence des EPS produits par les différentes souches étudiées. Cette méthode est basée sur la réaction des glucides avec l’acide sulfurique concentré et le phénol, conduisant à la formation d’une coloration proportionnelle à la quantité de sucres présents dans l’échantillon (Dubois *et al.*, 1956). Ainsi, l’intensité de la coloration obtenue permet d’estimer la concentration en EPS produite par chaque souche.

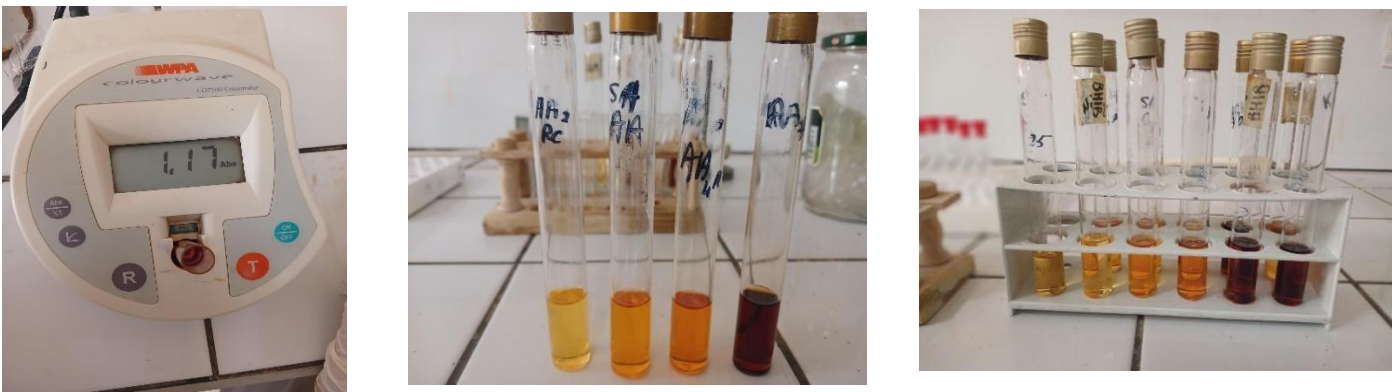


Figure 21 : résultats de la méthode phenol-sulfuric acid

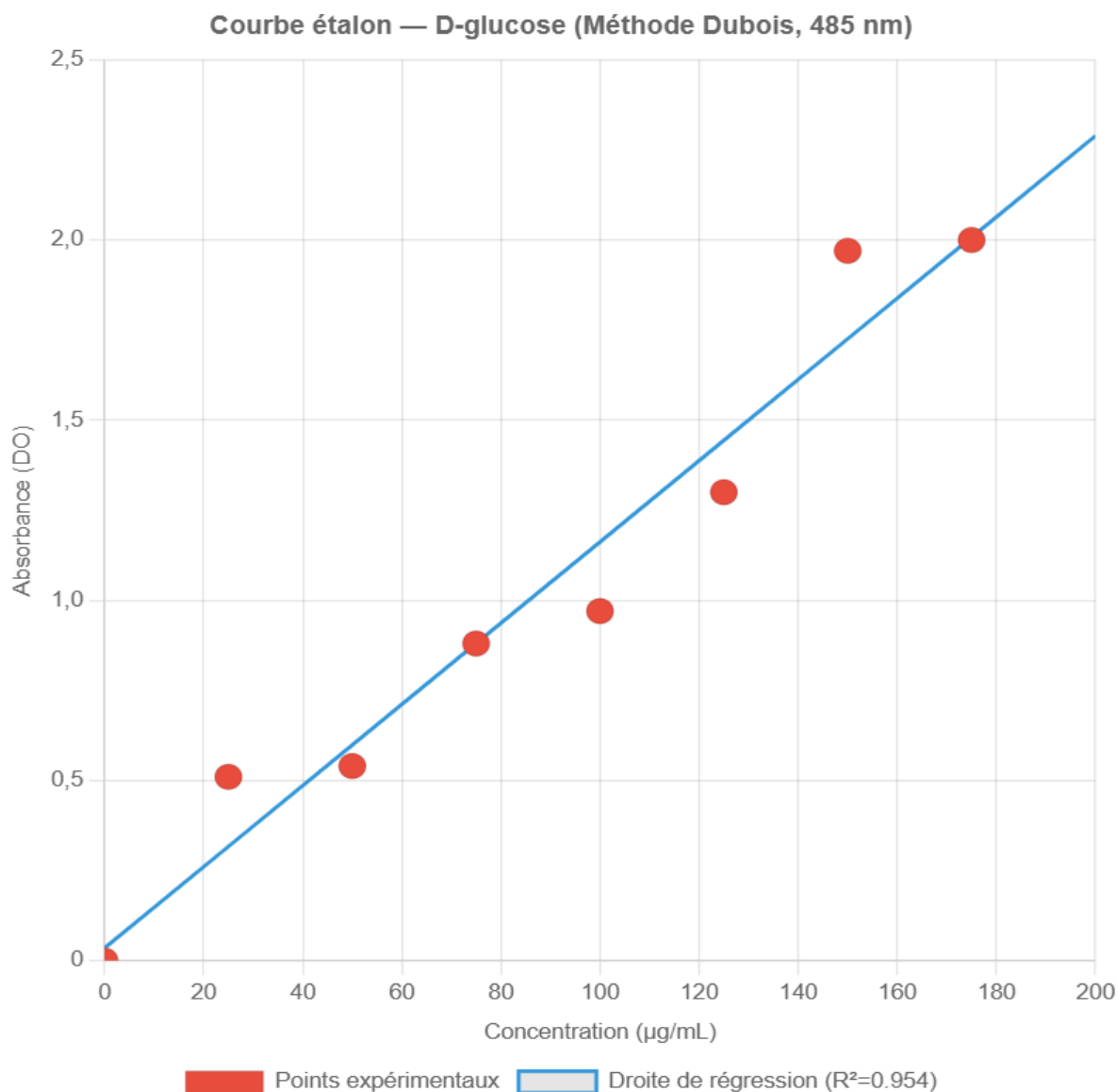


Figure 22 : Courbe étalon — D-glucose (Méthode Dubois, 485 nm)

Les concentrations en glucides totaux des EPS obtenues pour les quatre souches sont présentées dans le tableau 5. La souche AA7 présente la concentration la plus élevée avec 174,3 µg/mL, suivie de la souche AA4 avec 100,7 µg/mL, puis de la souche SAAA avec 87,4 µg/mL. La souche AA2 RC enregistre la concentration la plus faible avec 37,7 µg/mL.

Tableau 5 : Concentrations en EPS produite par les souches étudiées

Souche	DO (485 nm)	C EPS (µg/mL)
AA7	2.00	174.3
AA4	1.17	100.7
SAAA	1.02	87.4
AA2 RC	0.46	37.7

Ces résultats mettent en évidence une variabilité inter-souches dans la production d'EPS, phénomène également observé chez *Rhizobium tropici*, où différentes souches et mutants présentent des niveaux de production d'exopolysaccharides nettement différents (Almeida *et al.*, 2016).

Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la capacité intrinsèque des souches à synthétiser les EPS ainsi que par l'influence des conditions de culture, qui modulent la quantité et la composition des polysaccharides produits chez les bactéries du genre *Rhizobium* (Ribeiro et Burkert, 2016).

La concentration élevée observée pour la souche AA7 suggère une forte capacité de production d'EPS, en accord avec les observations rapportées chez des souches de *Rhizobium* isolées de nodules de *Vicia faba*, décrites comme produisant des quantités importantes d'exopolysaccharides mucilagineux. Cette production élevée pourrait être associée à une meilleure aptitude à la colonisation racinaire et à l'établissement de la symbiose avec la plante hôte.

À l'inverse, la faible concentration enregistrée pour la souche AA2 RC pourrait refléter une capacité plus limitée de synthèse d'EPS chez cette souche. Ces différences entre isolats confirment l'intérêt de poursuivre leur caractérisation afin d'identifier les souches présentant le meilleur potentiel symbiotique et biotechnologique.

CONCLUSION

Les microorganismes du sol représentent un élément essentiel dans les interactions entre les plantes et leur environnement. Parmi eux, les bactéries du genre *Rhizobium* occupent une place importante grâce à leur capacité à établir une relation symbiotique avec les légumineuses et à contribuer à la fixation biologique de l'azote. Les exopolysaccharides (EPS) produits par ces bactéries interviennent dans plusieurs étapes de cette interaction, notamment l'adhésion aux racines, la formation du biofilm et l'établissement d'une symbiose efficace avec la plante hôte.

Dans cette étude, des souches de *Rhizobium* ont été isolées à partir des nodules racinaires de *Vicia faba*. La caractérisation morphologique et biochimique des isolats obtenus a permis de confirmer leurs principaux caractères phénotypiques compatibles avec le genre *Rhizobium*. L'extraction des exopolysaccharides suivie du dosage des glucides totaux par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique a permis d'évaluer la capacité des différentes souches à produire ces polymères extracellulaires.

Les résultats obtenus ont montré une variation de la production des EPS entre les souches étudiées. La souche AA7 a présenté la teneur la plus élevée en glucides totaux, suivie par les souches AA4 et SAAA, tandis que la souche AA2 RC a enregistré la production la plus faible. Cette différence met en évidence l'existence d'une variabilité entre les souches de *Rhizobium* concernant leur capacité de synthèse des EPS.

Ainsi, l'étude des EPS chez *Rhizobium* présente un intérêt important, car ces molécules peuvent contribuer à l'adaptation des bactéries dans le milieu racinaire et favoriser l'établissement des interactions bénéfiques avec les plantes. Les souches présentant une production élevée d'EPS pourraient constituer des candidates intéressantes pour des applications dans le domaine des biotechnologies agricoles, notamment pour le développement de biofertilisants.

Afin d'approfondir ce travail, il serait intéressant d'étudier l'influence des conditions de culture telles que le pH, la température, la source de carbone et la durée d'incubation sur la production des EPS, afin d'optimiser leur synthèse. Une caractérisation plus approfondie de la structure et de la composition chimique des EPS permettrait également de mieux comprendre leurs propriétés biologiques.

Par ailleurs, il serait pertinent d'envisager d'autres méthodes de dosage des EPS, telles

que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), qui permettent une analyse plus précise de la composition et de la structure des exopolysaccharides. Ces techniques pourront être envisagées dans le cadre de travaux futurs afin de compléter et d'affiner les résultats obtenus par la méthode colorimétrique.

De plus, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la biosynthèse des EPS, notamment par l'analyse des gènes responsables de leur production, pourrait apporter des informations supplémentaires sur leur rôle dans la symbiose *Rhizobium*–*légumineuse*.

Enfin, une meilleure compréhension du fonctionnement des bactéries symbiotiques telles que *Rhizobium* dans la fixation biologique de l'azote pourrait contribuer au développement d'approches agricoles plus durables, permettant de réduire l'utilisation excessive des engrais chimiques. Dans cette perspective, l'étude d'autres microorganismes bénéfiques capables de mobiliser des éléments nutritifs essentiels comme le phosphore et le potassium pourrait favoriser le développement de biofertilisants améliorant durablement la croissance des plantes.

RéféRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Acosta-Jurado, S., Marczak, M., Żebracki, K., Huang, X., Yang, J., & Janczarek, M.(2021). Exopolysaccharides in *Rhizobium*-legume interactions: Structure, biosynthesis, and biological roles. *Microbial Biotechnology*, 14(5), 1234–1248.
2. Allito, B. B., Mengistu, T., & Hailemariam, A. (2020). Symbiotic efficiency of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in faba bean (*Vicia faba* L.). *Agronomy Journal*, 112(3), 1456–1465.
3. Almeida, J. R., Silva, R. F., & Souza, R. (2016). Exopolysaccharide production variability in *Rhizobium tropici* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5435–5445.
4. Arora, N. K., Khare, E., & Mishra, J. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. *Applied Soil Ecology*, 125, 283–291.
5. Arthikala, M. K., Montiel, J., & Quinto, C. (2017). Oxidase activity in rhizobial symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 123.

B

6. Benidire, L., et al. (2018). Isolation of rhizobia from Moroccan soils. *African Journal of Microbiology Research*, 12(4), 89–97.
7. Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.
8. Boddey, R. M., Peoples, M. B., Palmer, B., & Dart, P. J. (2000). Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 57(3), 235–270.

C

9. Chauhan, H., Sharma, A., & Singh, R. (2023). Rhizosphere microbiome: Diversity, functions, and applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 112345.
10. Crèpon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Duc, G., & Joubert, R. (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115(3), 329–339.

D

11. Degefu, T., Wolde-Meskel, E., & Frostegård, A. (2018). Characterization of rhizobia from Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(5), 453–463.
12. Denis, F., et al. (2016). Techniques microscopiques en microbiologie. *Revue de Biologie Appliquée*, 12(2), 45–52.
13. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

E

14. El-Haloui, M., et al. (1986). Étude des rhizobia au Maroc. *Revue Marocaine de Microbiologie*, 2(1), 45–52.
15. Etemadi, F., Hashemi, M., & Zandvakili, O. (2019). Faba bean (*Vicia faba* L.): A multipurpose crop. *Agronomy*, 9(6), 123.

F

16. Fraysse, N., Couderc, F., & Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*–legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1365–1380.
17. Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872–874.
18. Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398.

G

19. Ghosh, P. K., & Maiti, T. K. (2016). Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume–bacteria symbiosis: A review. *Achievements in Life Sciences*, 10(2), 136–143.
20. Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413–441.
21. Gordon, J., & McLeod, J. W. (1928). The practical application of the direct oxidase reaction

in bacteriology. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 31, 185–190.

22. Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 12, 426.

H

23. Huang, X., Żebracki, K., & Janczarek, M. (2025). Environmental regulation of exopolysaccharide biosynthesis in rhizobia. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 456–468.

24. Hugh, R., & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66(1), 24–26.

J

25. Janczarek, M., Żebracki, K., & Huang, X. (2024). Biofilm formation in rhizobia: Role of exopolysaccharides. *Microorganisms*, 12(1), 45.

26. Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium*-legume symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619–633.

K

27. Khandelwal, R., & Vyas, A. (2024). Catalase activity in rhizobia. *Journal of Microbial Biochemistry*, 56(2), 234–240.

28. Koch, M., & Sessitsch, A. (2024). Nitrogen fixation and the rhizosphere microbiome: Advances and perspectives. *Soil Biology and Biochemistry*, 178, 108945.

29. Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.

L

30. Legesse, H. (2016). Isolation and characterization of rhizobia. *African Journal of Biotechnology*, 15(12), 234–242.

M

31. Ma, Y., Naranjo-Robayo, D., & Zhao, L. (2023). Phylogenomics and taxonomy of *Rhizobium*: Insights from comparative genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(2), 125–136.
32. Marczak, M., et al. (2017). Structure and function of rhizobial exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5435–5445.
33. Maswada, H. F., Pham, T. T., & Sashidhar, B. (2022). Role of exopolysaccharides in rhizobial tolerance to salinity stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(7), 2895–2908.
34. Mia, M. A. B., & Shamsuddin, Z. H. (2010). *Rhizobium* as biofertilizer for sustainable agriculture. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3), 117–124.
35. Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1012.

N

36. Naranjo-Robayo, D., Ma, Y., & Zhao, L. (2025). Taxonomic updates in *Rhizobium*. *International Journal of Systematic Microbiology*, 75(1), 45–56.

O

37. Oldroyd, G. E. D., 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.

P

38. Panwar, J., et al. (2012). Biochemical characterization of rhizobia. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 345–352.
39. Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180–201.
40. Perrin, R. (2019). Nodulation in legumes: Mechanisms and regulation. *Plant Physiology*, 181(2), 345–356.
41. Pervin, R., et al. (2017). Isolation and characterization of rhizobia from Bangladesh soils. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 34(2), 145–152.

42. Pham, T. T., et al. (2024). Stress tolerance mechanisms in rhizobia. *Frontiers in Microbiology*, 15, 2345.
43. Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799.
44. Putrie, R., et al. (2016). Isolation and biochemical characterization of rhizobia. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 987–995.

S

45. Sadowsky, M. J., et al. (1983). Genetic diversity of rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1), 68–74.
46. Sashidhar, B., Maswada, H. F., & Pham, T. T. (2022). Exopolysaccharide-mediated stress tolerance in rhizobia. *Frontiers in Plant Science*, 13, 987654.
47. Shetta, N. D., et al. (2011). Symbiotic efficiency of rhizobia in Egyptian soils. *African Journal of Biotechnology*, 10(12), 2345–2352.
48. Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon group. *Journal of Infectious Diseases*, 39(3), 209–214.
49. Singh, R. K., et al. (2008). Plant growth-promoting rhizobacteria in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1237–1245.
50. Skorupska, A., et al. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 7(6), 104–112.
51. Solanki, M. K., Wang, F., & Singh, R. K. (2024). Plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. *Frontiers in Agronomy*, 2, 112233.
52. Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology*. New York: Springer.
53. Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: An overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 2.

Y

54. Yildiz, H., & Karataş, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41–46

ANNEXES

Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisées

Le milieu YMA :

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

Le milieu YMB

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

Le milieu YMA +RC

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

Le milieu GPA

- Glucose : 5 g
- Peptone : 10 g
- Violet de bromocrésol : 10 g
- Agar : 10 g
- L'eau distillée : 1000 mL
- PH : 6,8

Annexe II : Acide trichloroacétique.(TCA)à 10%

Acide trichloroacétique: 10g

Eau distillée: 100ml

Annexe III : coloration de Gram

Cristal violet : 1 min

Rinçage à l'eau distillée : 5 s

Lugol : 1 min

Rinçage à l'eau distillée : 5 s

Alcool 95% (décoloration) : 15-20 s

Rinçage à l'eau distillée : immédiat

Safranine : 30 s

Rinçage à l'eau distillée : 5 s

Séchage à l'aide de papier

المخلص

تؤدي السكريات المتعددة خارج الخلية التي تنتجها بكتيريا جنس الريزوبيوم دوراً محورياً في إقامة علاقات تعايشية مع النباتات البقولية، لا سيما في عمليات التصاق البكتيريا بالجذور وتكوين العقد الجذرية. تهدف هذه الدراسة إلى توصيف وتقدير إنتاجية السكريات المتعددة لدى سلالات من بكتيريا الريزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات الفول. وعليه تم اخذ العينات من منطقتين من الغزوات ولاية تلمسان.

كما اعتمدت منهجية العمل على عزل السلالات باستخدام وسط الزرع (YMA)، تلا ذلك توصيفها بناءً على خصائصها المظهرية والكيميائية الحيوية. ولتحديد كمية السكريات، تم استخلاصها وقياس كمية السكريات الكلية بالاعتماد على طريقة "الفينول-حمض الكبريت".

أظهرت النتائج تبايناً في القدرة على إنتاج السكريات الخارجية بين السلالات المدروسة؛ حيث سجلت السلالة AA7 أعلى قيمة إنتاجية (174.3 ميكروغرام/مل)، تلتها السلالة AA4 (100.7 ميكروغرام/مل)، ثم السلالة SAAA (87.4 ميكروغرام/مل)، بينما سجلت السلالة AA2 RC أدنى مستوى للإنتاج (37.7 ميكروغرام/مل).

تُبرز هذه النتائج الأهمية البيولوجية للسكريات المتعددة لدى بكتيريا الريزوبيوم، وتفتح آفاقاً واعدة لاستغلالها في تطوير حلول وتطبيقات زراعية حيوية. الكلمات المفتاحية: الريزوبيوم، السكريات المتعددة خارج الخلية، العقد الجذرية، نبات الفول، الأسمدة الحيوية.

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) produced by bacteria of the genus *Rhizobium* play an important role in symbiotic interactions with leguminous plants, particularly in bacterial adhesion and nodule formation. The objective of this study was to characterize EPS production in *Rhizobium* strains isolated from the root nodules of faba bean (*Vicia faba*). Within the framework of this study, three samples were collected from two different areas located in the commune of Ghazaouet, Tlemcen Province.

The isolates obtained on YMA medium were characterized based on morphological and biochemical criteria. EPS were then extracted, and their total carbohydrate content was determined using the phenol-sulfuric acid colorimetric method.

The results showed a variation in EPS production among the studied strains. The AA7 strain exhibited the highest content (174.3 µg/mL), followed by AA4 (100.7 µg/mL) and SAAA (87.4 µg/mL), while AA2 RC recorded the lowest value (37.7 µg/mL).

These results highlight the importance of EPS characterization in *Rhizobium* and their potential applications in agriculture.

Keywords: *Rhizobium*, exopolysaccharides, *Vicia faba*, root nodules, biofertilizers.

Résumé

Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries du genre *Rhizobium* jouent un rôle important dans les interactions symbiotiques avec les plantes légumineuses, notamment dans l'adhésion bactérienne et la formation des nodules. L'objectif de cette étude a été de caractériser la production des EPS chez des souches de *Rhizobium* isolées à partir des nodules racinaires de la fève (*Vicia faba*). Dans le cadre de cette étude, trois échantillons ont été prélevés dans deux zones différentes situées dans la commune de Ghazaouet, wilaya de Tlemcen.

Les isolats obtenus sur milieu YMA ont été caractérisés par des critères morphologiques et biochimiques. Les EPS ont ensuite été extraits et leur teneur en glucides totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique.

Les résultats ont montré une variation de la production des EPS entre les souches étudiées. La souche AA7 a présenté la teneur la plus élevée (174,3 µg/mL), suivie par AA4 (100,7 µg/mL) et SAAA (87,4 µg/mL), tandis que AA2 RC a enregistré la valeur la plus faible (37,7 µg/mL).

Ces résultats montrent l'importance de la caractérisation des EPS chez *Rhizobium* et leur potentiel dans les applications agricoles.

Mots clés : *Rhizobium*, exopolysaccharides, *Vicia faba*, nodules racinaires, biofertilisants.