

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENVIRENNEMENT MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT

SUPÉRIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

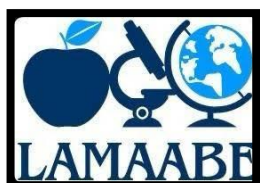
UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, DE LA TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à

L'environnement « LAMAABE »



Mémoire de Master

Présenté par :

ZEGHOUDI AMIRA

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en biologie

Option : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Caractérisation de la production de biofilm chez *Rhizobium*

Soutenu le 24/06/2026, devant le jury composé de :

Président	Pr. REBIAHI Sid Ahmed	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. MEZIANI Zahira	Université de Tlemcen
Encadrante	Dr. RAHMOUN Malika	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2025/2026



Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Dieu, pour la force, la patience et la persévérance qu'Il m'a accordées tout au long de ce travail.

*Je remercie sincèrement mon encadrante de mémoire, « **Madame Rahmoun Malika** » pour son accompagnement, ses conseils précieux, sa disponibilité et son soutien scientifique tout au long de ce projet.*

*Monsieur le professeur « **Rebiahi Sid Ahmed** » le président de jury pour l'honneur qu'il me fait en présidant cette soutenance et pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.*

*J'adresse également mes vifs remerciements à **Madame « Meziani Zahira » l'examinatrice du jury** pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et pour ses remarques pertinentes et ses précieux conseils*

*J'adresse également mes remerciements aux enseignants du département de « **Biologie** » pour la qualité de la formation et les connaissances qu'ils m'ont transmises durant mon parcours universitaire.*

*Je remercie chaleureusement les membres du laboratoire « **LAMAABE** » pour leur aide technique et leur collaboration.*

Enfin, je remercie profondément ma famille et mes proches pour leur soutien moral, leur encouragement constant et leur patience tout au long de mes études.



Dédicace

*C'est avec une profonde gratitude que je dédie ce
mémoire à ceux qui ont éclairé mon chemin*

*À mon père, **Radouene**, L'exemple de rigueur et
de persévérance. Merci d'avoir toujours cru en
moi.*

*À ma mère, **Mounia**, La source de tendresse et de
bienveillance. Tes prières ont été mon plus beau
guide.*

*À **Walid** et **Abire**, mon frère et ma sœur :
Pour votre amour fraternel et l'énergie positive
que vous m'apportez au quotidien.*

*À **Asma**, ma meilleure amie, Plus qu'une amie, une
véritable sœur de cœur sur qui j'ai toujours pu
compter.*

*À toute ma grande **famille**, Pour votre soutien
indéfectible et votre fierté qui m'honorent.*

الملخص:

يعتمد التكافل المثبت للنتروجين بين بكتيريا الريزوبيوم والبقوليات، وهو ضروري للزراعة المستدامة، بشكل مباشر على التكوين الأولي للغشاء الحيوي البكتيري الذي يضمن الالتصاق واستعمار الجذور بكفاءة والقدرة التنافسية للسلالة.

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف سلالات بكتيريا الريزوبيوم من عُقيدات الفاصوليا التي جُمعت من منطقة الغزوات، ولاية تلمسان، ثم تقييم قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية في المختبر تحت تراكيز مختلفة من الجلوكوز. بعد التأكد من الخصائص البكتيرية القياسية، تم قياس إنتاج الأغشية الحيوية باستخدام طريقة الزرع على الأطباق وطريقة الأنايب بعد 48 ساعة من الحضانة.

تُظهر النتائج التأثير الكبير لمحتوى الجلوكوز على حركية وكثافة تكوين الأغشية الحيوية. يُتيح تحديد السلالات عالية الأداء آفاقاً واعدة لاختيارها كأسمدة حيوية طبيعية لتحسين إنتاجية محاصيل البقوليات.

الكلمات المفتاحية: ريزوبيوم، التكافل، تكوين العقد، الغشاء الحيوي، الجلوكوز، الأسمدة الحيوية.

Résumé :

La symbiose fixatrice d'azote entre *Rhizobium* et les légumineuses, essentielle pour l'agriculture durable, dépend directement de la formation initiale d'un biofilm bactérien qui assure l'adhésion, la colonisation efficace des racines et la compétitivité des souches

L'objectif de cette étude était d'isoler et de caractériser des souches de *Rhizobium* à partir de nodules de fèves prélevés sur la région de Ghazaouet, la wilaya de Tlemcen, puis d'évaluer in vitro leur capacité de formation de biofilm sous l'effet de différentes concentrations de glucose. Après confirmation des caractéristiques bactériologiques classiques, l'aptitude à produire un biofilm a été quantifiée par la méthode de culture sur microplaque (TCP) et la technique des tubes après 48 heures d'incubation.

Les résultats démontrent l'impact significatif de la teneur en glucose sur la cinétique et l'intensité de la biofilmisation. L'identification de souches hautement performantes ouvre des perspectives prometteuses pour leur sélection en tant que biofertilisants naturels afin d'optimiser le rendement des cultures de légumineuses.

Mots-clés : *Rhizobium*, symbiose, nodulation, biofilm, glucose, biofertilisants.

Abstract:

The nitrogen-fixing symbiosis between *Rhizobium* and legumes, essential for sustainable agriculture, depends directly on the initial formation of a bacterial biofilm which ensures adhesion, efficient root colonization and strain competitiveness.

The objective of this study was to isolate and characterize *Rhizobium* strains from bean nodules collected in the Ghazaouet region of Tlemcen Province, and then to evaluate their biofilm-forming capacity in vitro under different glucose concentrations. After confirming classic bacteriological characteristics, biofilm production ability was quantified by the plate culture method (PCM) and the tube technique after 48 hours of incubation.

The results demonstrate the significant impact of glucose content on the kinetics and intensity of biofilm formation. The identification of high-performing strains opens promising prospects for their selection as natural biofertilizers to optimize legume crop yields.

Keywords: *Rhizobium*, symbiosis, nodulation, biofilm, glucose, biofertilizers

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
INTRODUCTION	1

Première partie Etude Bibliographique

Chapitre 1 :Symbiose Rhizobium -Légumineuses.....	4
1.Rhizobium :.....	5
1.1.Historique et taxonomie de Rhizobium :	5
1.2. Caractères généraux de Rhizobium :	6
1.2.1.Caractères morphologiques :	6
1.2.2. Caractères biochimiques :	7
1.2.3. Caractères culuraux :	7
1.2.4. Caractères physiologiques :	8
2. Les légumineuses :	8
2.1. Généralités :	8
2.2. Intérêt des légumineuses :	8
2.3. La plante légumineuse Vicia faba.L :	9
2.3.1. Origine et répartition géographique :	9
2.3.2. Description :	10
Chapitre 2 :Fixation biologique de l'azote et symbiose Rhizobium -Légumineuses	11
1.L'azote atmosphérique :	12
1.2.La symbiose fixatrice de l'azote :	12
2. Nodulation :	13
2.1. Définition :	13
2.2. Types des nodules :	14
2.3. Les étapes de formation des nodules :	15
2.3.1. Pré-infection:.....	15
2.3.2. Infections :	15
2.3.3. Développement des nodules :	15
Chapitre 3 : Les Biofilms Bactériens	17
1. Biofilms bactériens :	18

1.1. Définition	18
1) Adhésion initiale réversible :	18
2) Adhésion irréversible :	18
3) La formation de microcolonies :	18
4) La maturation du biofilm :	18
5) La dispersion du biofilm :	19
2. Biofilm chez Rhizobium	19
2.1. Importance du biofilm dans la symbiose Rhizobium -légumineuse :	19
2.2. Facteurs influençant la formation de biofilm :	20
2.1. Facteurs génétiques et moléculaires propres à la plante :	20
2.2. Facteurs environnementaux et physicochimiques :	21
2.3. Signaux chimiques de l'hôte et chimiotactisme :	21

Deuxième partie :Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir de la fève (Vicia faba.L) :	24
1.1. Description de la zone d'étude :	24
1.2.Collecte des plantes :	24
1.3.Prélèvement des nodules :	24
.1.4La stérilisation des nodules :	25
1.5. Écrasement des nodules :	25
1.6Conservation des nodules :	26
1.8.Isolement et purification des isolats :	26
2. Caractères morphologiques :	27
2.1. Examen macroscopique :	27
2.2. Examen microscopique :	27
2.2.1. L'état frais :	27
2.2.2. Coloration de Gram :	27
3. Caractères biochimiques :	27
3.1. Test d'oxydase :	27
3.2. Test de la catalase :	28
3.3. Citrate de Simmons:	28
3.4. Nitrate réductase:	28
3.5. Test de GPA :	29
4. Conservation des souches :	29

5. L'étude de formation de biofilm in-vitro d'isolats :.....	30
5.1. Méthode de plaque de culture (TCP) :.....	30
5.2. Méthodes des tubes :.....	31
5.3. L'étude de la formation du biofilm de sous l'effet de différentes concentrations de glucose :	32

Troisième partie :Résultats et Discussion

1. Isolement et purification des isolats :.....	34
2. Caractères morphologiques :.....	34
2.1. Examens macroscopiques :.....	34
2.2. Examens microscopiques :.....	35
2.2.1. État frais :.....	35
2.2.2. Coloration de Gram :	35
2.3. Études des caractères biochimiques des souches isolées:.....	35
2.3.1. Test d'oxydase :	35
2.3.2. Test de catalase :	36
2.3.3. Citrate de Simmons :.....	36
2.3.4. Nitrate réductase :	37
2.3.5. Test de GPA:	38
2.3.6. Croissance sur le milieu YMA+RC:	39
3. Étude de la formation de biofilm d'un 48h sous l'effet de glucose :.....	39
3.1. Technique de microplaque 96 puits (TCP) :	39
3.2. Méthodes des tubes :.....	42
Conclusion	45
Références Bibliographiques	48
Annexes.....	59

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

atm : atmosphérique

PH: potentiel hydrogène

Kg :Kilogramme

N₂ :Diazote

NH₂ :Nitrite

NH₃ :Nitrate.

NO₄ :Ammonium

ha⁻¹ : Par hectare (hectare⁻¹)

an⁻¹: Par an (année⁻¹)

MoFe: Protéine molybdène-fer de la
nitrogénase

NifD: Protéine de fixation de l'azote
D

NifK: Protéine de fixation de l'azote
K

NifH: Protéine de fixation de l'azote
H

H⁺ : Cation hydrogène.

e⁻:Électron

ATP : Acide adénosine
triphosphorique

ADP : Acide adénosine diphosphate

Pi : Phosphate inorganique

CO₂ : Dioxyde de carbone

V.faba : La plante *Vicia.faba*

NodD : Protéine régulatrice

EPS :Exopolysacharides

QS :Quorum Sensing

LPS :Lipopolysacharide

CPS : Polysaccharides capsulaires

AHL : N-acyl homosérine lactones

AIA : Acide indole-3-acétique

°C : Degré Celsius.

Cm : Centimètre

Mm :Millimètre

YMA :Yeast Mannitol Agar

YMB :Yeast Mannitol Broth

GPA : Glucose Peptone-Agar.

RC : Rouge Congo

TM : Transmembranaire

H : Heure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂O : Eau

O₂ : Dioxygène

PBS : Tampon phosphate salin
(Phosphate Buffered Saline)

PVC :Polychlorure de vinyle

DO :Densité optique

TCP :Méthode de la plaque de
culture tissulaire

mL :Millilitre

µL:Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Observation microscopique de <i>Rhizobium trifolii</i>	6
Figure 2: Aspect des colonies de <i>Rhizobium</i> sur le milieu YMA	7
Figure 3 : Production mondiale de légumineuses à graines (2010-2024).....	9
Figure 4 : Présentation schématique des différents constituants de la fève	10
Figure 5: Schéma montrant le mécanisme général de la fixation symbiotique de l'azote.....	13
Figure 6: Nodosités sur les racines de Soja	14
Figure 7: Schéma structurel du nodule de type indéterminé A et de type déterminé B.	14
Figure 8: Schéma présentant le processus de formation de nodules	16
Figure 9: Les étapes de formation du biofilm	19
Figure 10 : Localisation géographique des sites de prélèvement (a) : localisation de Tlemcen en Algérie /(b) Localisation de Ghazaouet ;région Sidi Aïssa (SA) et Stade.....	24
Figure 11: le prélèvement des nodules.....	25
Figure 12: Stérilisation des nodules.....	25
Figure 13: Nodules stériles écrasés.....	26
Figure 14: Résultats du test d'utilisation du citrate de Simmons	31
Figure 15: Les étapes de formation du biofilm par la technique des tubes	31
Figure 16: Croissance des souches de <i>Rhizobium</i> sur YMA	34
Figure 17: Résultat de coloration de Gram ($G \times 100$)	35
Figure 18: Résultat de test de catalase	36
Figure 19: Résultat positif et négatif de test de citrate de Simmons.....	37
Figure 20: Résultat de test Nitrate réductase	38
Figure 21: Résultat de croissance sur milieu GPA	38
Figure 22: Croissance sur le milieu YMA+RC.....	39
Figure 23: Résultat de l'effet du glucose sur la formation de biofilm des souches étudiées	40
Figure 24: Résultat de l'effet du glucose sur la formation de biofilm des souches étudiées	43

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification taxonomique des Rhizobia d'après Jean et ces collaborateurs	6
Tableau 2: Production mondiale de légumineuses à graines	9
Tableau 3:Résultat des prélèvements.	34
Tableau 4: Classification des souches de Rhizobium selon leur capacité de formation de biofilm, sous différentes concentrations de glucose après 48 h d'incubation.....	41
Tableau 5:Classification des souches de Rhizobium selon leur capacité de formation de biofilm sous différentes concentrations de glucose (Méthode des tubes).....	42

INTRODUCTION

Le sol est un écosystème vivant où s'effectuent de nombreuses réactions biologiques essentielles, en particulier les cycles biogéochimiques et les relations entre microorganismes et plantes. Le cycle de l'azote constitue un processus central parmi eux, où des bactéries sont à même de transformer l'azote atmosphérique en des formes que les plantes peuvent assimiler. Les bactéries du genre *Rhizobium* sont surtout connues pour leur aptitude à former une symbiose spécifique avec les légumineuses, comme la fève (*Vicia faba*), ce qui aboutit à la formation de nodules racinaires dans lesquels la fixation biologique de l'azote s'effectue grâce à l'enzyme nitrogénase (**Graham et Vance, 2003**).

La symbiose entre *Rhizobium* et les légumineuses résulte d'une série complexe d'interactions moléculaires qui conduisent à l'infection des racines et à la formation de nodules.

Ces structures spécialisées créent un micro environnement propice à l'activité microbienne et elles sont déterminantes pour la nutrition azotée de la plante hôte (**Oldroyd et al., 2011**). Cette association est particulièrement importante pour l'agriculture chez la fève car elle permet d'améliorer la fertilité des sols et de diminuer l'utilisation des engrais azotés.

Chez *Rhizobium*, la formation de biofilm est essentielle dans les premiers stades de l'interaction avec la plante hôte. Il facilite notamment l'adhésion aux racines, la colonisation de la rhizosphère et la communication intercellulaire grâce au quorum sensing. Cette capacité participe à l'amélioration de l'efficacité de l'infection nodulaire et de la compétitivité des souches (**Fujishige et al., 2006; Rinaudi et González, 2009**).

L'isolement à partir des nodules de la fève de souches de *Rhizobium* est une méthode adaptée pour l'étude de bactéries déjà adaptées à la symbiose. En étudiant leur capacité à produire du biofilm, on peut mieux saisir leurs stratégies d'adaptation et repérer des souches qui ont du potentiel pour des usages en agriculture durable, par exemple en tant que biofertilisants capables d'optimiser la nodulation et la croissance des plantes tout en diminuant sur l'environnement (**Bogino et al., 2013**).

Ainsi, l'étude de la production de biofilm chez *Rhizobium* isolé de *Vicia faba* représente un axe important pour optimiser les interactions plante-microorganisme et promouvoir des systèmes agricoles durables.

L'objectif de ce travail a été l'isolement et la caractérisation des souches de rhizobium nodulant la plante *Vicia faba.L*, ainsi que l'étude de la capacité de formation de biofilm sous l'effet de différentes concentrations de glucose.

Ce contexte a été structuré en trois parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique qui vise les principales informations sur la symbiose des plantes légumineuses « la fève » avec les micro-organismes (Rhizobium), ainsi que la formation de biofilm.
- La deuxième partie a été consacrée à la partie « matériel et méthodes ».
- La troisième partie a été consacrée à la présentation des résultats obtenus, les interprétations et les discussions.

Première partie
Etude Bibliographique

Chapitre 1 :
Symbiose Rhizobium -
Légumineuses

1.Rhizobium :

1.1.Historique et taxonomie de *Rhizobium* :

L'appellation Rhizobium dérive du grec rhiza, signifiant «racine», et bio, qui veut dire «vie». Ce terme fait référence au premier genre bactérien identifié comme vivant dans le sol et ayant la capacité de noduler une plante légumineuse. Cette dénomination remonte à la fin du XIXe siècle (**Beijerinck, 1888**). L'année après, cette bactérie à été nommée *Rhizobium leguminosarum* (**Frank, 1889**). Elle a la capacité de provoquer des nodules sur les légumineuses et de fixer l'azote atmosphérique (**Zakhia et Philippe, 2006**).

La famille des Rhizobiaceae regroupe une multitude d'espèces de « rhizobia », comprenant à présent 19 genres et 181 espèces nommées (**Tengfei et al., 2023**). D'un point de vue phylogénétique, elles appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries. Il a été reconnu que le spectre des hôtes n'était pas le seul facteur à prendre en compte pour classer les Rhizobium, mais aussi en fonction de leur temps de génération et leur rythme de croissance sur un milieu de culture (**Jordan, 1982**). Initialement, les espèces de Rhizobium ont été classées en deux genres distincts, le genre révisé Rhizobium regroupant les souches à croissance rapide et le nouveau genre Bradyrhizobium, créé pour celles à croissance lente (**Zakhia et Philippe, 2001**).

Le total précis d'espèces de Rhizobia n'est pas constant, car de nouvelles espèces sont constamment identifiées et documentées.

Les espèces suivantes peuvent servir d'exemple: Bradyrhizobium, Azorhizobium, Mesorhizobium, Sinorhizobium, Pararhizobium et Allorhizobium (tableau 1) (**Banerjee et Heidjan, 2022**).

Tableau 1: Classification taxonomique des Rhizobia d'après Naranjo-Robayo et ses collaborateurs (2026)

Rang taxonomique	Classification
Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria(Pseudomonadota)
Classe	Alphaproteobacteria
Ordre	Hyphomicrobiales
Famille	Rhizobiaceae
Genre	<i>Rhizobium</i>
Espèce type	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

1.2. Caractères généraux de Rhizobium :

1.2.1. Caractères morphologiques :

Il s'agit d'une bactérie du sol, de type bâtonnet Gram négatif, mobile et non sporulante (Kaddour et *al.*, 2010).

Selon Hoben et Somasegaram (1994), cette bactérie se décline en deux formes :

- **La forme végétative** : On les observe sous la forme de bâtonnets uniformes mesurant entre 1.2 et 3 μm de longueur pour une largeur de 0.5 à 0.9 μm (**figure 1**).
- **La forme bactéroïde**: Lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur des nodules, ces dernières se métamorphosent en bactéroïde, prenant des formes variées telles que : branchées, sphérique ou en massue) (Perry et *al.*, 2004).

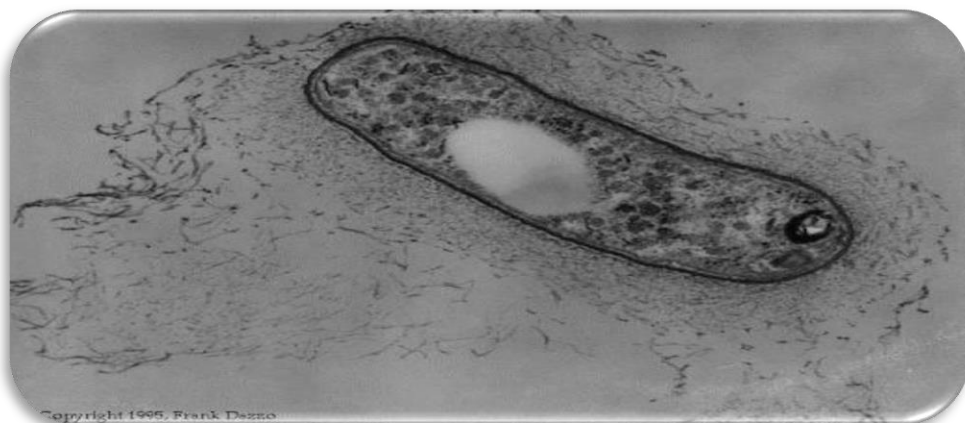


Figure 1 : Observation microscopique de Rhizobium trifolii

1.2.2. Caractères biochimiques :

Les **Rhizobia** sont classées comme des bactéries chimio-organohétérotrophes, aérobie strict (**Garrity et al., 2005**). D'un point de vue biochimique, elles peuvent exploiter différents types de glucides tels que le glucose, le saccharose et le mannitol comme source de carbone lorsqu'elles sont en culture (**Vincent, 1970**). Elles sont généralement dotées d'une activité catalase et oxydase positive, illustrant leur aptitude à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène et à maintenir une chaîne respiratoire active (**Garrity et al., 2005**). De plus, elles sont défavorables à l'emploi du citrate, à la synthèse de l'urée et à la gélatinase. Il a également été observé que certaines souches possèdent une activité de réduction du nitrate (**Gachande et Khansola, 2011**).

1.2.3. Caractères cultureux :

Le milieu de culture YAM (Agar Mannitol à levure) est l'un des milieux solides les plus couramment employés pour cultiver le rhizobium (**Vincent, 1970**). Dans cet environnement, les colonies se manifestent sous une forme circulaire, de couleur blanche, opaque ou laiteuse, humide avec texture visqueuse, translucide et présentent parfois une brillance (Figure 2). Selon **Somasegaran et Hoben (1994)**, on rencontre généralement des colonies de couleur jaune pâle dans les cultures plus âgées.

Ils existe deux groupes de *Rhizobium* selon leurs vitesse de croissance :

- **Une croissance rapide** : qui engendrent une turbidité du milieu liquide en 2-3 jours et un taux de multiplication chaque 2-4 heures.
- **Une croissance lente** : généralement ce sont les Bradyrhizobium, ils créent une turbidité dans le milieu liquide en 3 à 5 jours et leur taux de reproduction est de 6 à 8 heures (**Somasegaran et Hoben, 1994**).



Figure 2 : Aspect des colonies de *Rhizobium* sur le milieu YMA (**Boubekri, 2017**) .

1.2.4. Caractères physiologiques :

Les rhizobia sont des bactéries aérobies ou microaérophiles qui peuvent survivre avec une faible pression d'oxygène (0,01 atm). Leur température idéale pour la croissance est de 28°C et leur pH optimal se situe entre 6 et 7, plus précisément à 6,8. Cependant, certaines souches comme *Rhizobium japonicum* ont la capacité de tolérer les milieux acides (pH =4) (Somasegaran et Hoben, 1994).

2. Les légumineuses :

2.1. Généralités :

Les légumineuses font partie de la famille des Fabacées (ou légumineuses), C'est une vaste famille botanique qui comprend 18000 espèces de plantes dicotylédons (Caroline, 2017) reconnues pour leur teneur élevée en protéines ; ce qui leur confère une importance majeure dans l'alimentation humaine et animale (Valérie et al., 2010).

Dans l'agriculture, on distingue habituellement deux grandes familles des légumineuses : d'une part, les légumineuses fourragères notamment la luzerne et les trèfles, qui servent surtout d'aliment pour le bétail, et, d'autre part, les légumineuses à graines, telles que le haricot, le pois et la fève, qui sont consommées par les humains (Jean, 2017). Et selon Lewis et al., 2005, les légumineuses sont classées comme suit :

•Règne : Plantae.

•Division : Magnoliophyta.

•Classe : Magnoliopsida.

•Ordre : Fabales.

•Famille : Fabaceae.

2.2. Intérêt des légumineuses :

Les légumineuses à grains présentent un enjeu nutritionnel, agronomique et économique important. Ce sont d'excellentes sources de protéines végétales, de glucides complexes, de fibres alimentaires, de vitamines du groupe B et de minéraux (fer, zinc, magnésium), rendant

les légumineuses indispensables à une alimentation saine et équilibrée (Valérie et *al.*, 2010; Duranti, 2006). Sur le plan agronomique, elles sont essentielles pour améliorer la fertilité des sols grâce à leur capacité à former une symbiose avec les bactéries du genre *Rhizobium*, ce qui permet la fixation biologique de l'azote atmosphérique et diminue ainsi l'utilisation des engrais azotés de synthèse (Graham et Vance, 2003).

A l'échelle mondiale, la production de légumineuses à graines (pulses) a progressé régulièrement au cours des dernières années, passant d'environ 72 millions de tonnes en 2010 à près de 97 millions de tonnes en 2024, soit une hausse de plus de 30 %, traduisant un intérêt croissant pour ces cultures dans les systèmes agricoles durables et dans l'alimentation humaine (figure 3) (FAO, 2025).



Figure 3 : Production mondiale de légumineuses à graines (2010-2024)

[FAOSTAT – Agricultural Production Statistics 2010–2024](#)

2.3. La plante légumineuse *Vicia faba*.L :

2.3.1. Origine et répartition géographique :

Le genre *Vicia* regroupe environ 140 espèces, dont *Vicia faba* (la fève), une plante cultivée de type dicotylédone. Elle est originaire surtout d'Asie occidentale et s'est largement diffusée en Europe, en Afrique et en Asie centrale, avec des centres de diversité secondaires en Éthiopie et en Afghanistan. Aujourd'hui, elle est cultivée dans plusieurs zones du monde, notamment les régions tempérées, subtropicales et les zones d'altitude tropicales. En Afrique tropicale, sa culture est principalement concentrée au Soudan et en Éthiopie (FAOSTAT , 2026).

2.3.2. Description :

La fève est une plante herbacée annuelle appartenant à la sous famille des *Papilionaceae* (Pierre et *al*, 1999), utilisée pour la consommation humaine et animale (Goyoaga et *al.*, 2011). Elle présente une hauteur allant jusqu'à 1 mètre. Ses tiges sont dressées, quadrangulaires, assez robustes et ramifiées, elles atteignent 30 à 80 centimètres de haut. Ses feuilles sont épaisses, avec des folioles ovales gris-vert. La plante n'a pas de vrilles à accrocher (**Figure 4**). La fleur est blanche avec une grande tache noire centrale. Le fruit est une grande gousse verte, 10 à 20 centimètres de long. Les graines sont grosses , et chaque graine se compose de deux cotylédons (Jarso et Keneni, 2026).

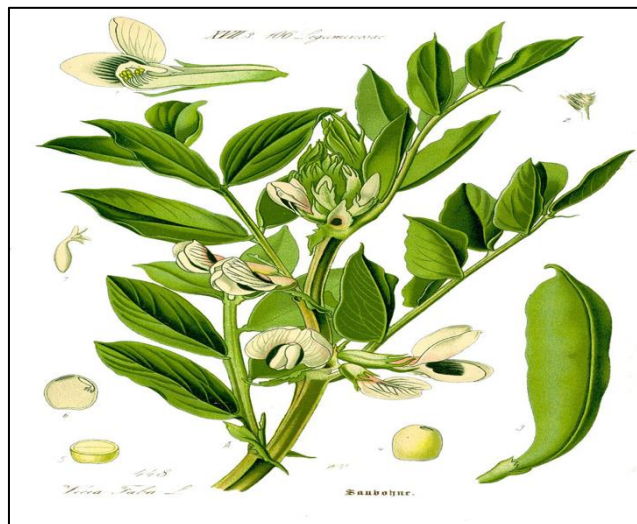


Figure 4 : Présentation schématique des différents constituants de la fève (*Vicia faba*.L).

Chapitre 2 :
Fixation biologique de
l'azote et symbiose
Rhizobium -
Légumineuses

1. L'azote atmosphérique :

1.1. Définition :

L'atmosphère terrestre est majoritairement constituée d'azote N₂ (**Ravan, 2008**)), représentant près de 80% de sa composition.

Ce dernier est jugé fondamental pour la croissance des plantes (**Carroll, 2001**). En effet, l'azote est un élément clé pour les plantes. On le retrouve dans tous les acides aminés, et donc toutes les protéines, ainsi que dans certains pigments et divers composés hétérocycliques. De plus, il est présent dans des métabolites secondaires qui sont cruciaux pour l'équilibre agro-socio-environnemental des végétaux (**Christian, 2011**).

1.2. La symbiose fixatrice de l'azote :

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique, les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des décomposeurs ou des bactéries du sol et les rendent disponibles aux plantes telles que : Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium, Azorhizobium et Sinorhizobium (**Michael, 2014**).

La contribution la plus importante de fixation de l'azote est représentée par l'association symbiotique entre les bactéries du genre Rhizobium et les légumineuses (**Emma et Philip, 2003**), Cette symbiose se structure au sein d'organes racinaires spécialisés appelés nodosités. Cette association symbiotique apporte des quantités importantes d'azote au sol, pouvant fournir entre 50 et plus de 300 kg N ha⁻¹ an⁻¹ selon l'espèce végétale et les conditions de culture (**Peoples et al., 2009**).

Grâce à un complexe enzymatique bactérien spécifique, , ces bactéries réduisent à l'intérieur de leurs cellules le diazote atmosphérique (N₂) en azote ammoniacal (NH₃), qui à son tour se combine avec les acides organiques résultant de la décomposition de la matière organique formant des acides aminés qui en bénéficient (figure 5) (**Shetta et al., 2011**).

La nitrogénase est un enzyme extrêmement sensible à l'oxygène, constitué de deux protéines principales : la dinitrogénase (protéine MoFe) , codée par les gènes *nifD* et *nifK*, qui contient le site de réduction du nitrogène en ammoniac et la dinitrogénase réductase (protéine Fe), codée par le gène *nifH* qui permet le transfert d'électrons libérés (**Dixon et Kahn, 2004**).

La réaction catalysée par la nitrogénase peut être résumée comme suit :

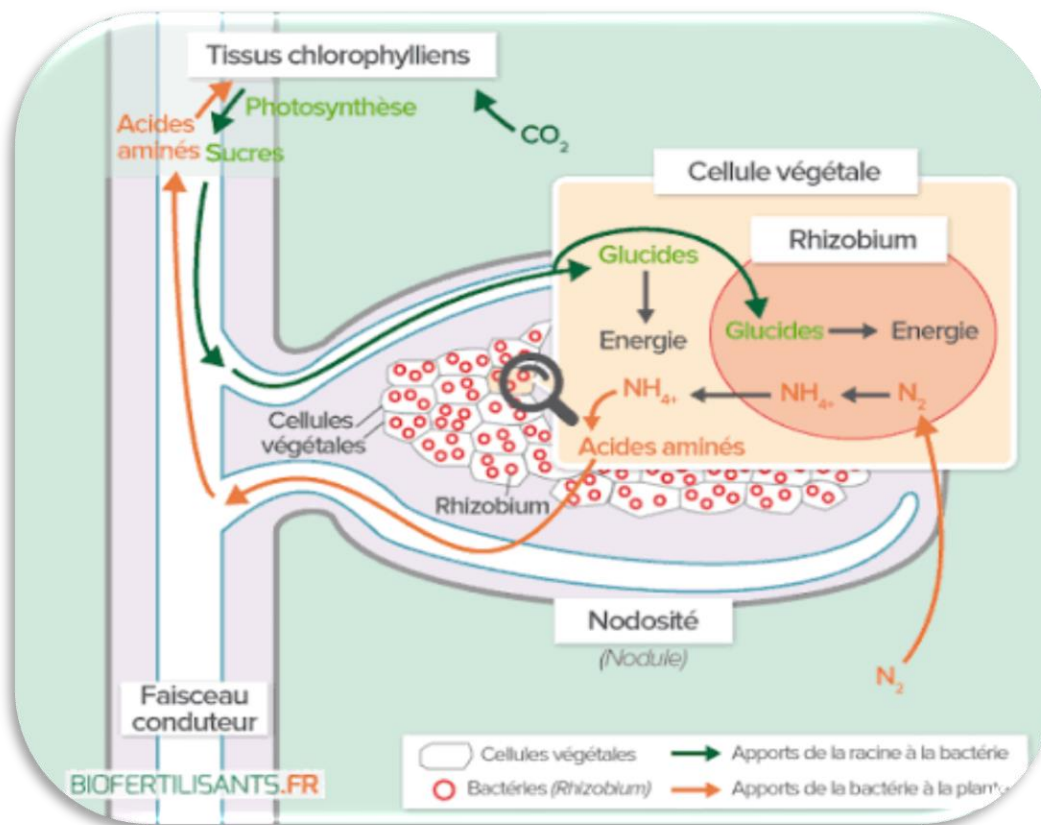
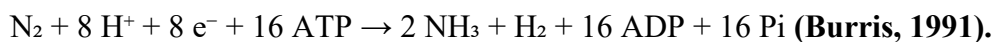


Figure 5: Schéma montrant le mécanisme général de la fixation symbiotique de l'azote.

2. Nodulation :

2.1. Définition :

Les nodules des légumineuses sont des petites vésicules qui se forment principalement sur les racines des plantes de la famille des *Fabaceae* (**Figure 6**), elles résultent d'une interaction symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote généralement du genre *Rhizobium* et des genres apparentés tels que *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) et *Mesorhizobium* (Oldroyd et al., 2011).

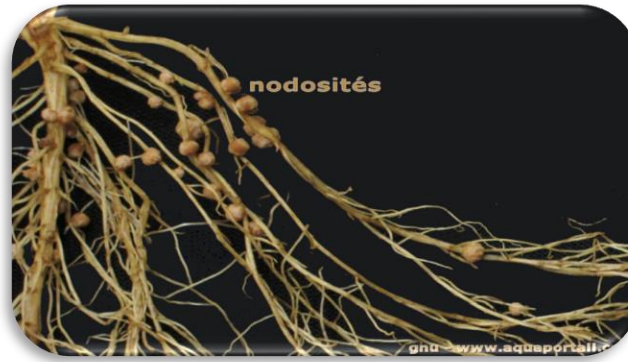


Figure 6: Nodosités sur les racines de Soja.

2.2. Types des nodules :

Les nodules peuvent être de type déterminé, généralement sphériques comme chez le soja (*Glycine max*), ou indéterminé, allongés et possédant un méristème persistant comme chez la fève (*V. faba*) et la luzerne (*Medicago sativa*) (Sprent, 2009). Ainsi, les nodules des légumineuses sont des organes symbiotiques hautement spécialisés assurant une contribution majeure à la nutrition azotée des plantes et à la fertilité des sols agricoles (figure 7) (Herridge et al., 2008).

De plus, elles sont perçues comme un lieu d'échanges nutritifs entre les deux partenaires (plan

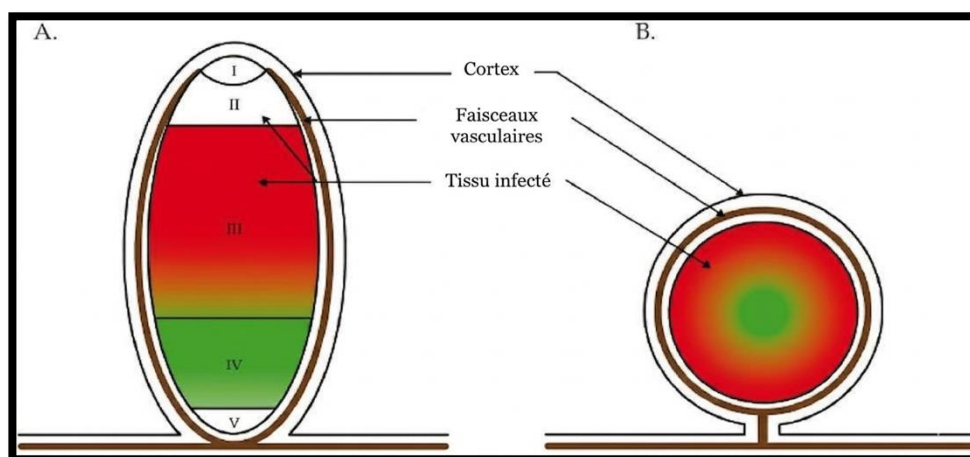


Figure 7: Schéma structurel du nodule de type indéterminé A et de type déterminé B.

2.3. Les étapes de formation des nodules :

2.3.1. Pré-infection:

La phase de préinfection commence avec la libération par les racines des légumineuses de composés phénoliques, des flavonoïdes, qui servent d'indicateurs chimiques et attirent spécifiquement les bactéries du genre *Rhizobium* présentes dans la rhizosphère (**Perret *et al.*, 2000**). Ces flavonoïdes activent la protéine bactérienne NodD qui induit l'expression des gènes de nodulation (Nod genes) qui synthétisent les facteurs Nod, C'est ainsi que se constitue le système de reconnaissance *Rhizobium*- légumineuse (**Oldroyd et Downie, 2008**).

2.3.2. Infections :

La phase infectieuse commence par une déformation, un enroulement des poils absorbants en forme de « crosse de berger » ce qui permet aux bactéries de les pénétrer (**Long, 1996**). Une invagination de la paroi cellulaire aboutit ensuite à la formation d'un filet d'infection (infection thread), dans lequel les bactéries se multiplient et progressent vers les tissus internes de la racine (**Gage, 2004**). Dans le même temps, des signaux provenant de l'épiderme activent la division cellulaire du cortex racinaire et préparent la formation du primordium nodulaire (**Oldroyd, 2013**).

Quand le filet d'infection atteint ce primordium, les bactéries sont libérées dans les cellules végétales par endocytose et se retrouvent entourées d'une membrane d'origine végétale, formant des symbiosomes (**Jones *et al.*, 2007 ; Udvardi et Poole, 2013**).

2.3.3. Développement des nodules :

Le nodule se forme grâce aux divisions actives des cellules corticales et péricycliques, ce qui aboutit à un organe spécialisé doté d'un système vasculaire pour les échanges entre la plante et les bactéries (**Murray, 2011 ; totocka *et al.*, 2012**).

Dans les symbiosomes, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes à même d'exprimer l'enzyme nitrogénase, laquelle réduit l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃) que la plante peut assimiler (**Oldroyd et Downie, 2008**). La légémoglobine, protéine comportant un groupement hème, maintient une faible concentration en oxygène dans le nodule afin de protéger la nitrogénase tout en assurant la respiration des bactéroïdes (**Udvardi et Poole, 2013**).

Chapitre 2 Fixation biologique de l'azote et symbiose Rhizobium -Légumineuse

Ainsi, le nodule se transforme en un organe fonctionnel: la plante y apporte les composés carbonés issus de la photosynthèse et en retire l'azote réduit nécessaire à sa croissance (figure 8) (Oldroyd, 2013).

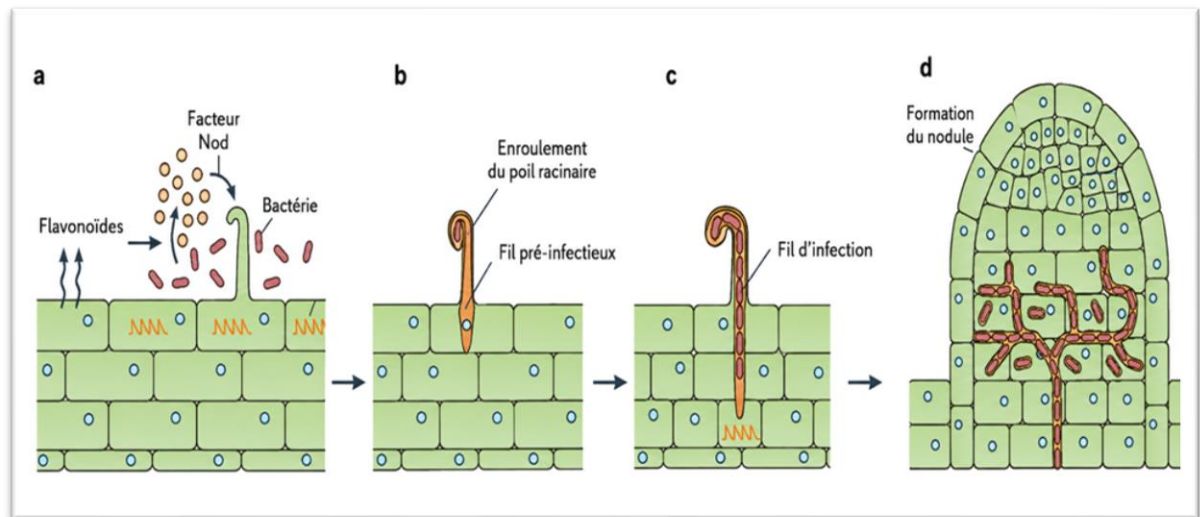


Figure 8: Schéma présentant le processus de formation de nodules (Jean, 2017).

Chapitre 3 : Les Biofilms Bactériens

1. Biofilms bactériens :

1.1. Définition

Un biofilm est un ensemble organisé de micro-organismes fixés à une surface et entourés d'une matrice extracellulaire qu'ils produisent eux-mêmes et qui est principalement composée de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire (**Fleming et Wengender, 2010**). Chez les bactéries du genre *Rhizobium*, la formation de biofilm à la surface des racines de légumineuses favorise la colonisation racinaire, protège les cellules des stress environnementaux et renforce l'établissement d'une relation symbiotique pour la fixation de l'azote (**Rinaudi et Giordano, 2010 ; Bogino et al., 2013**).

1.2. Les étapes de formation du biofilm :

Le processus de formation du biofilm se passe en plusieurs étapes (figure 9):

1) Adhésion initiale réversible :

La formation du biofilm chez **Rhizobium** commence par l'attraction des bactéries vers les exsudats racinaires riches en flavonoïdes, sucres et acides organiques, par des mécanismes de chimiotactisme (**Caetano-Anollés et al., 1988; Miller et al., 2007**).

L'adhésion initiale à la surface des poils absorbants est réversible et met en jeu les flagelles, les pili et certaines protéines de surface bactériennes (**anczarek, 2011 ; Bogino et al., 2013**).

2) Adhésion irréversible :

Après le premier contact , les bactéries synthétisent des exopolysaccharides (EPS) et des protéines d'adhésion qui assurent une fixation stable et irréversible sur la surface racine (**Frayse et al., 2003 ; Rinaudi et Giordano, 2010**).

3) La formation de microcolonies :

Les cellules bactériennes fixées se multiplient localement et forment des agrégats nommés les microcolonies, premières structures organisées du biofilm (**Stoodley et al., 2002 ; Rinaud et Giordano, 2010**).

4) La maturation du biofilm :

Les biofilms matures présentent une structure tridimensionnelle complexe, caractérisée par une matrice extracellulaire abondante et des canaux qui facilitent la diffusion des nutriments et l'élimination des déchets (**Fleming et Wengender, 2010**).

Cette organisation renforce la résistance de la zone racinaire des rhizobiums, à la dessiccation, aux variations de pH et à d'autres stress abiotiques (**Bogino et al., 2013**). Les biofilms bien développés favorisent également la capacité des souches à entrer en compétition pour la formation de nodules racinaires (**Rinaudi et Giordano, 2010**).

5) La dispersion du biofilm :

Quand l'épaisseur maximale du biofilm est obtenue, il est sujet à des processus de dispersion (**Bezoui, 2016**). Il est donc possible que des bactéries isolées ou des fragments de biofilm soient libérés et puissent par la suite créer de nouveaux biofilms sur d'autres surfaces (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

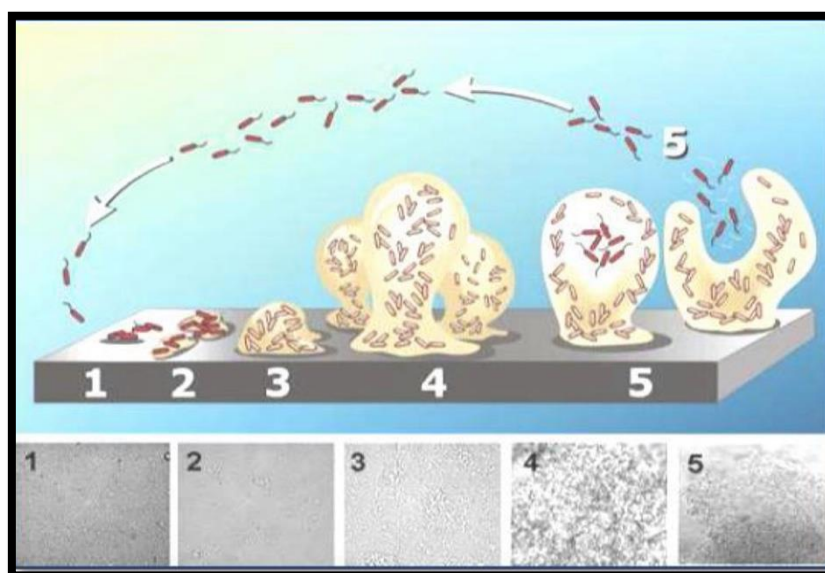


Figure 9: Les étapes de formation du biofilm (**Besassier et al., 2005**).

2. Biofilm chez Rhizobium

2.1. Importance du biofilm dans la symbiose *Rhizobium* -légumineuse :

Le biofilm est essentiel à la symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses puisqu'il permet l'adhésion des bactéries à la surface des racines et garantit une colonisation stable de la rhizosphère, étape indispensable à l'initiation de l'infection symbiotique (**Rinaudi et Giordano, 2010**).

La matrice extracellulaire du biofilm, constituée principalement d'exopolysaccharides, protège les cellules bactériennes contre la dessiccation et d'autres stress environnementaux, augmentant ainsi leur survie dans le sol et au voisinage des racines (**Flemming et Wingender, 2010**). Le biofilm facilite également la communication cellulaire et permet de coordonner l'expression des gènes impliqués dans la production de polysaccharides de surface et dans la formation des nodules fixateurs d'azote (**González et Marketon, 2003 ; Giordano, 2010**).

Chez de nombreuses espèces de rhizobia, les souches produisant des biofilms très structurés sont plus compétitives pour infecter les racines et possèdent une efficacité symbiotique plus élevée, ce qui se traduit par une nodulation plus importante et une fixation d'azote plus efficace (**Rinaudi et Giordano, 2010**).

2.2. Facteurs influençant la formation de biofilm :

La biofilmisation est une étape indispensable à la colonisation efficace des racines des légumineuses et à l'engagement dans une symbiose fixatrice d'azote de tout organisme bactérien appartenant au genre *Rhizobium* (et les genres apparentés *Synorhizobium* ou *Bradyrhizobium*). Mais cette formation est sujette à plusieurs facteurs qui pourront l'entraver : facteurs génétiques et moléculaires, facteurs environnementaux et physicochimiques, facteurs chimiques et interactions avec la plante hôte (**Liu et al., 2023**).

2.1. Facteurs génétiques et moléculaires propres à la plante :

L'aptitude du *Rhizobium* à se fixer et à créer une matrice est largement déterminée par ses structures superficielles et ses signaux de communication.

- **Production d'exopolysaccharides (EPS) :**

Les EPS, tels que le succinoglycane ou le galactoglucane, constituent les éléments principaux de la matrice du biofilm. Les mutations dans les gènes responsables de leur synthèse (par exemple les gènes *exo*) diminuent considérablement ou éliminent la création de biofilm chez *Sinorhizobium meliloti* (**Russo et al., 2006 ; Fujishige et al., 2006 ; Castellani et al., 2024**).

- **Lipopolysaccharides (LPS) et polysaccharides capsulaires (CPS) :**

Les changements de structure du LPS en surface affectent l'hydrophobie de la membrane cellulaire, ce qui modifie l'adhérence primaire aux poils absorbants des racines (**Castellanos et al., 1997 ; Williams et al., 2008**).

- **Flagelles et Pili:**

Les flagelles sont cruciaux pour le chimiotactisme vers la racine et l'adhésion initiale, tandis que les pili de type IV assurent la stabilité des microcolonies durant les premières étapes de formation du biofilm (Fujishige *et al.*, 2006 ; Nogales *et al.*, 2015).

- **Le Quorum Sensing (QS) et molécules AHL :**

Les systèmes de communication intercellulaire via les N-acyl homosérine lactones (AHL) régulent de manière stricte la transition vers le mode de vie sessile, contrôlant directement l'expression des gènes liés à la motilité et à la biosynthèse de la matrice (Ponraj *et al.*, 2022 ; Shrestha *et al.*, 2023).

2.2. Facteurs environnementaux et physicochimiques :

La rhizosphère est un environnement fluctuant ; les travaux récents explorent comment les stress abiotiques modulent la cinétique de colonisation.

- **Température et pH :**

Ces facteurs influencent l'expression des gènes bactériens liés à la motilité et à la production d'EPS, modifiant ainsi directement la cinétique de colonisation (Al-Mallah *et al.*, 2025).

- **Disponibilité en nutriments :**

La concentration et le type de sucres (comme le glucose ou le saccharose) présents dans le milieu modifient directement les flux métaboliques, activant sélectivement les voies de synthèse des EPS ou des LPS structuraux (Sarkar et Chakraborty, 2024).

- **Concentration en ions métalliques:**

Des travaux récents démontrent que la disponibilité en ions divalents, notamment le calcium, agit comme un signal environnemental majeur en stabilisant physiquement les réseaux d'EPS anioniques et en activant les adhésines de surface (Jiménez-Gómez *et al.*, 2023).

2.3. Signaux chimiques de l'hôte et chimiotactisme :

L'interaction croisée entre la racine de la légumineuse et la bactérie reste un inducteur majeur du biofilm.

- **Exsudats racinaires et Flavonoïdes :**

Les molécules signal émanant des exsudats racinaires (telles que la lutéoline ou l'apigénine) ne déclenchent pas seulement les gènes de nodulation (nod), mais agissent aussi comme des chimioattractants augmentant la formation de biofilms protecteurs autour de la rhizosphère (Djedidi et *al.*, 2023).

- **Rôle des phytohormones :**

Les interactions biochimiques récentes montrent que la présence d'acide indole-3-acétique (AIA) ou de cytokinines dans la rhizosphère module indirectement l'expression des gènes bactériens associés à la motilité de surface (swarming) (Kaci et *al.*, 2024).

Deuxième partie :
Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir de la fève (*Vicia faba.L*) :

1.1. Description de la zone d'étude :

Notre étude a été menée à partir de deux échantillons de *Vicia faba* prélevés sur deux sites différents dans la commune de Ghazaouet, wilaya de Tlemcen (**figure 10**). Le premier échantillon provenait de la région de Sidi Aïssa (SA), tandis que la deuxième a été collecté dans la zone de Stade.

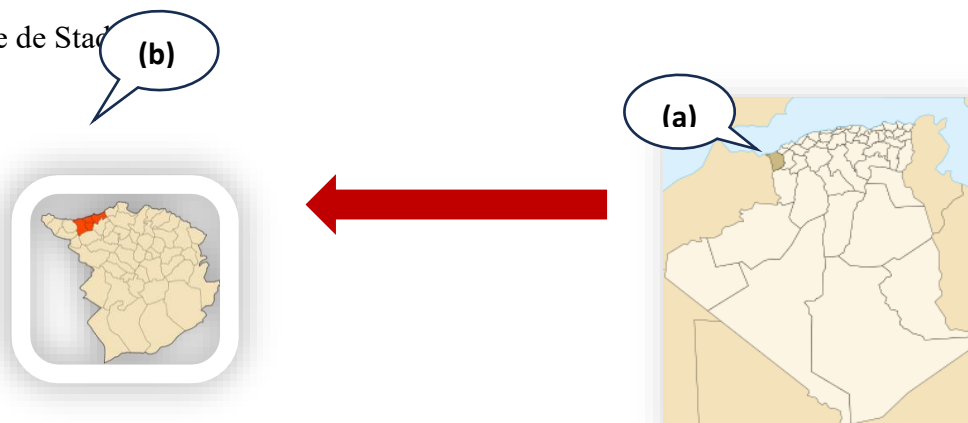


Figure 10 : Localisation géographique des sites de prélèvement (a) : localisation de Tlemcen en Algérie / (b) Localisation de Ghazaouet ; région Sidi Aïssa (SA) et Stade.

1.2. Collecte des plantes :

En février, nous avons récolté les plantes, car à cette période de l'année, les nodules sont bien formés, actifs et visibles au niveau des racines. Grâce à une bêche ou une petite pelle, il s'agit de creuser le sol à une profondeur d'environ 20 à 30 cm pour extraire les plantes et leurs racines, en prenant soin de ne pas endommager les nodules.

1.3. Prélèvement des nodules :

Sur le plan de travail, la portion aérienne a été séparée de la portion racinaire de la plante. Ensuite, les racines ont été délicatement rincées à l'eau du robinet avec leurs nodules dans le but d'éliminer toute trace de sol. Par la suite, les nodosités de 1 à 2 mm sont détachées avec des ciseaux et soigneusement séchées avec un papier absorbant (**Figure 11**).

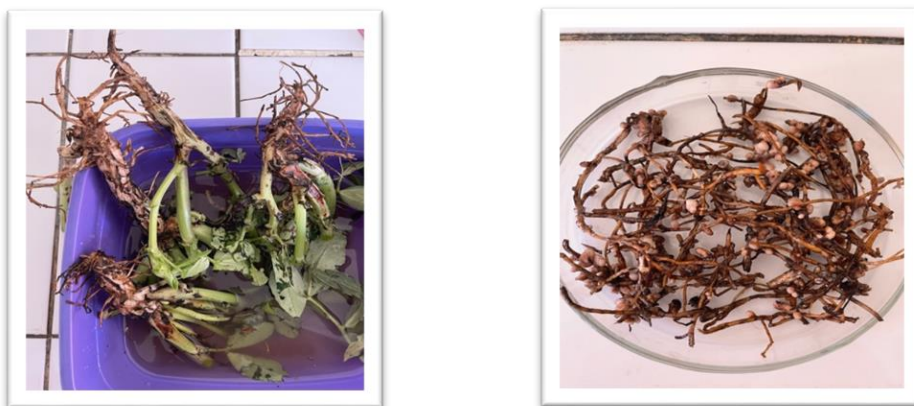


Figure 11:le prélèvement des nodules (photo personnelle)

1.4. La stérilisation des nodules :

Les nodules ont été lavés délicatement plusieurs fois dans l'eau distillée stérile. La surface des nodules a été désinfectée par immersion à 95% d'éthanol pendant 30 secondes à 1 minute puis elle sont transférées dans une solution d'hypochlorite de sodium (2-3%) pendant 2 à 5 min. Ensuite, ils ont été rincés successivement dix fois dans l'eau distillée stérile (**Figure 12**) (Sahu et al., 2022).

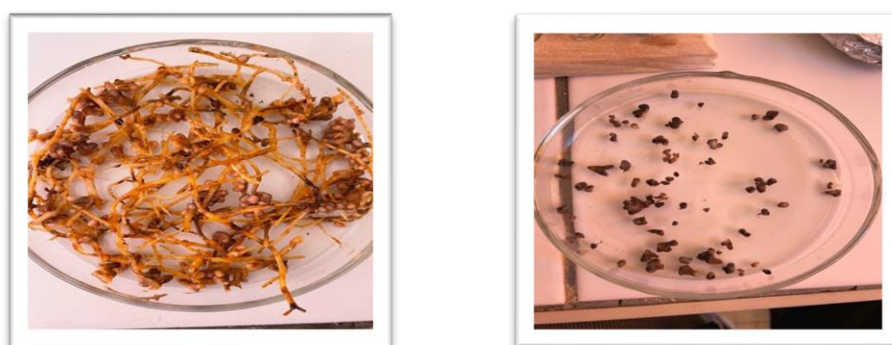


Figure 12:Stérilisation des nodules (photo personnelle)

1.5. Écrasement des nodules :

A l'aide de pinces à pointe non tranchante, les nodules stérilisés ont été superficiellement tranchés dans une grande goutte d'eau stérile disposée dans une boîte de Pétri. Par la suite, les nodules sont broyés dans des tubes à stériles à l'aide d'une pipette Pasteur également stérile (**figure 13**).



Figure 13: Nodules stériles écrasés (photo personnelle)

1.6. Conservation des nodules :

Les nodules secs doivent être conservés au réfrigérateur à une température de 4°C en vue d'une utilisation immédiate (Temam et Alebejo, 2017).

1.7. Les milieux de culture utilisés :

Afin d'étudier la croissance des bactéries *Rhizobium*, nous avons préparé les milieux de culture suivants (Annexe I) :

- Milieu liquide : - YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieux solides : - YMA (Yeast Manitol Agar)
 - YMA+RC (Yeast Manitol Agar + Rouge Congo)
 - GPA (Glucose Peptone Agar)

1.8. Isolement et purification des isolats :

Après broyage des nodules, ceux-ci ont été étalés sur un milieu de culture sélectif YMA afin d'isoler des colonies simples et visibles (Andrews et al., 2022). Ces colonies ont été incubées à 28 °C pendant 48 à 72h. La purification est réalisée par repiquages successifs d'une colonie unique sur le bouillon YMB, et des nouvelles boîtes de YMA.

2. Caractères morphologiques :

2.1. Examen macroscopique :

L'examen macroscopique des colonies s'est effectué sur la base de divers critères tels que leur morphologie, leur texture et leur diamètre.

2.2. Examen microscopique :

2.2.1. L'état frais :

Il s'agit de prélever un échantillon pur à partir de milieu liquide à l'aide d'une anse de platine stérile et la déposer dans une lame avec une goutte d'eau distillée ou de l'eau physiologique stérile, Incorporation de la paraffine et recouvrement avec la lamelle. Faites ensuite l'observation au microscope optique (G*40) (Aneja, 2021).

Cet examen donne la possibilité d'observer la mobilité des bactéries (Madigan et *al.*, 2021).

2.2.2. Coloration de Gram :

L'objectif de la coloration de Gram est de classer les bactéries en Gram positif et négatif, selon leur morphologie et leurs traits distinctifs.

Cette technique a été réalisée en respectant les procédures de coloration (Annexe II) (Cappuccino et Welsh, 2020).

3. Caractères biochimiques :

3.1. Test d'oxydase :

Ce test biochimique permet de détecter la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire de la bactérie. Le test d'oxydase est réalisé en suivant les étapes suivantes:

- Imbiber une bandelette d'oxydase avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile une colonie de la culture.
- Étaler sur la surface de la bandelette imbibée.

Après un bref délai, l'apparition rapide d'une coloration bleue violette indique une réaction positive à l'oxydase, si la bandelette reste incolore cela signifie une réaction oxydase négative (Kovacs, 1956).

3.2. Test de la catalase :

Le test de catalase sert à identifier la capacité d'un organisme à dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un dérivé toxique de l'oxygène pour la cellule, en eau (H_2O) et en dioxyde (O_2).

Cet test consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile puis à la toucher avec une colonie prélevée à partir du milieu solide, une réaction catalase positive se traduit par un dégagement de bulles de dioxygène (**Gordon & McLeod, 1928**).

3.3. Citrate de Simmons:

Ce test vise à révéler la capacité de la bactérie à utiliser le citrate comme unique source de carbone pour sa croissance. Une seule colonie a été prélevée et ensemencée par strie sur la pente dans la gélose au citrate de Simmons à l'aide d'une pipette pasteur fermée stérile, elle a ensuite été incubée pendant 3 jours à 28°C.

Après incubation, un virage de couleur du vert au bleu indique l'utilisation de citrate par la bactérie (réaction positive), si le résultat est négatif, la couleur de milieu reste verte (**Simmons, 1926**).

3.4. Nitrate réductase:

L'enzyme nitrate réductase facilite la conversion du nitrate en nitrite, un processus qui joue un rôle crucial dans la fixation de l'azote atmosphérique. Il s'agit d'inoculer 5ml de bouillon nitraté de 1.5% de nitrate de potassium avec la souche bactérienne à étudier (*Rhizobium*) suivie d'une incubation à 37°C pendant une période de 18 à 24h. Suite à l'incubation, incorporer à la culture trois gouttes de nitrate 1 et trois gouttes de nitrate 2.

L'émergence d'une coloration rouge signale la détection de nitrite (NO_2) issue de la réduction de nitrate (NO_3), ce qui indique une nitrate réductase positive.

En l'absence de coloration, il est nécessaire d'ajouter de la poudre de zinc : si une coloration rouge apparaît, cela indique que le zinc a réduit les nitrates en nitrites, ce qui signifie que la bactérie est nitrate réductase négative. Si aucune coloration n'est observée cela indique que la bactérie est nitrate réductase positive (**Griess, 1879**).

3.5. Test de GPA :

Le test GPA sert de test de confirmation de la pureté des isolats de *Rhizobium* et exclue les contaminants microbiens, il s'agit d'ensemencer en stries des colonies pures de *Rhizobium* isolées de YMA sur les boîtes de milieu solide GPA(Annexe 1), puis incubé à 28°C pendant 48 à 72 heures.

S'il y n'a pas d'une croissance visible, cela confirme la pureté des souches de *Rhizobium* car elles n'ont pas la capacité de fournir le Carbon à la peptone. Et si il y'a aussi un virage du couleur de milieu au jaune, cela indique la présence de contaminant tels que *Agrobacterium* qui cohabite souvent avec les *Rhizobium* dans la rhizosphère (Hugh & Leifson, 1953).

3.6. Teste de Croissance sur le milieu YMA+RG:

Le test sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) additionné de Rouge de Congo (RC) est réalisé afin de contrôler la pureté des isolats et de distinguer les souches de *Rhizobium* des bactéries contaminatrices du sol. Le protocole consiste à ensemencer, par la méthode des stries d'isolement, les colonies pures sur des boîtes de Petri contenant le milieu YMA enrichi en Rouge de Congo (10%). Les boîtes sont ensuite incubées à l'obscurité à une température de 28 °C pendant une période de 3 à 7 jours selon le rythme de croissance des souches (Freeman et al., 1989).

4. Conservation des souches :

Deux méthodes de conservation ont été utilisées :

4.1. Conservation à court terme : pour une utilisation courante allant de 2 à 6 mois, les souches de *Rhizobium* ont été ensemencées par des stries à l'aide d'une pipette pasteur stérile sur la gélose inclinée YMA dans des tubes à essais. Après l'incubation à 28°C pendant 48 à 72 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C (Rai et al., 2015).

4.2. Conservation à long terme : une colonie pure de *Rhizobium* a été inoculée dans des tubes à essai contenant 5mL de bouillon YMB (Annexe 1) puis incubée à 28°C jusqu'à l'apparition d'une croissance. Une quantité de 5mL d'une solution de glycérol stérile a été ajoutée et le mélange a été transféré dans des tubes Eppendorf stériles, ces derniers ont été étiquetés et stockés au congélateur à une température de -20°C. Cette technique assure une conservation pouvant durer jusqu'à un an (Sadowsky et al., 2005).

5. L'étude de formation de biofilm *in-vitro* d'isolats :

5.1. Méthode de plaque de culture (TCP) :

La méthode de microplaque décrit par **Christensen *et al.*, 1985** permet d'évaluer la capacité des bactéries à former un biofilm sur une surface abiotique .

- À partir d'une suspension bactérienne de 24 à 48 heures cultivées dans le milieu liquide YMB,
- les puits d'une microplaque de 96 puits ont été inoculés avec 150µL de cette suspension ajustée à une densité optique $DO_{600} = 0,2$ et des puits témoin contenant uniquement le milieu de culture stérile (témoin négatif).
- La microplaque a été ensuite incubée à 28 °C pendant 24 à 48 heures,
- Après incubation les puits ont été retirés du milieu et rincés trois fois avec le tampon PBS (pH 7,2-7,4) (Annexe III) et colorés avec du cristal violet à 0,01% pendant 15 minutes. L'excès de colorant est ensuite éliminé et lavé délicatement 3 fois avec de l'eau stérile.
- Les biofilms formés sont ensuite solubilisés avec l'acide acétique glacial à 33%, la DO de chaque puits est ensuite mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques de type ELISA (DNM-9602) (**Figure 14**).



Figure 14: Lecteur de microplaques (Spectrophotomètre de type ELISA)

Selon **Christensen *et al.*, 1985**, les souches ont été classées comme suit :

- $OD \leq OD_c \rightarrow$ Non producteur de biofilm.

- $OD_c < OD \leq 2OD_c \rightarrow$ Faible producteur.

- $2OD_c < OD \leq 4OD_c \rightarrow$ Producteur modéré.

- $OD > 4OD_c \rightarrow$ Fort producteur de biofilm.

5.2. Méthodes des tubes :

Cette technique est identique à celle des microplaques décrites **par Stepanović *et al.*, (2000)**, les bactéries sont incubées directement dans des tubes stériles à 28°C pendant 48 heures. Ces tubes sont ensuite vidés, lavés avec le tampon PBS (Annexe II). Le biofilm adhérent est colorés avec du cristal violet à 0,01% pendant 15 minutes. Après cela, ils sont lavés trois fois à l'eau distillée stérile ensuite ils sont solubilisés avec l'acide acétique 33%, et la densité est immédiatement mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Nous avons utilisé cette technique presque exclusivement pour reproduire et comparer les résultats obtenus lors de l'expérience sur microplaques.

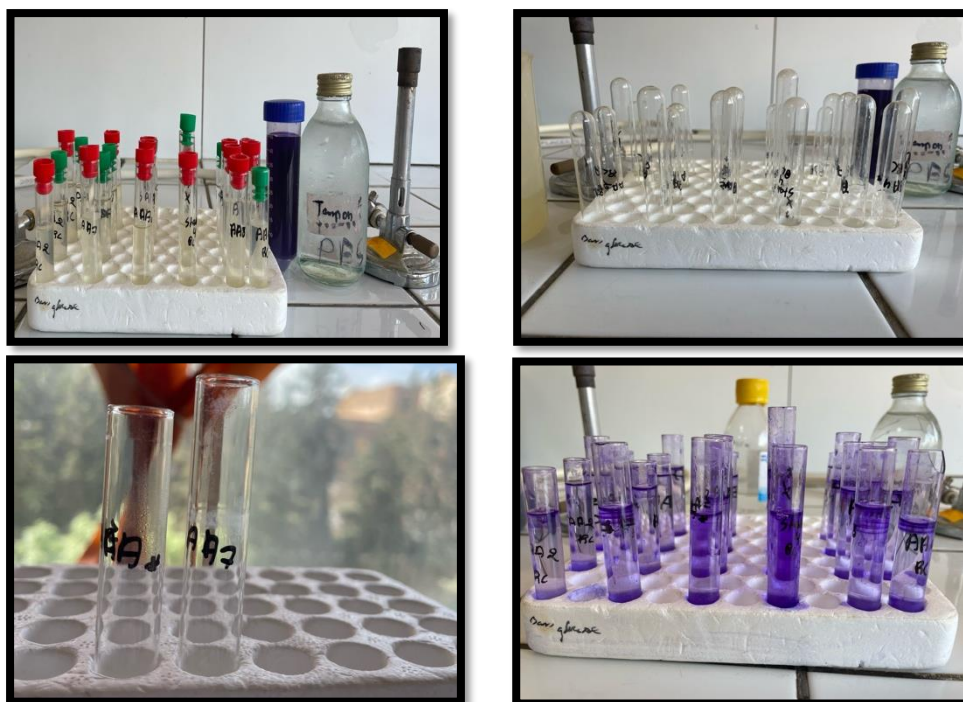


Figure 15 : Les étapes de formation du biofilm par la technique des tubes de microplaques

5.3. L'étude de la formation du biofilm de sous l'effet de différentes concentrations de glucose :

L'effet in vitro de diverses concentrations de glucose sur des biofilms de 48 heures a été examiné à l'aide de microplaques.

Des biofilms ont été créés sur des plaques de 96 puits à partir de suspensions bactériennes dans un milieu YMB enrichi en glucose à 0,5 %, 1 % et 2 %. Les plaques ont été incubées à une température de 28 °C pendant deux jours, puis ont été manipulées conformément au protocole préalablement décrit. la mesure de la densité optique a effectuée à 570 nm dans un lecteur de microplaques (**Christensen *et al.*, 1985**).

Troisième partie :

Résultats et Discussion

1. Isolement et purification des isolats :

15 souches bactériennes identiques en termes de forme et couleur des colonies ont été obtenues à partir des nodules fraîches de *Vicia faba*, ce qui nous a permis de les attribuer au genre *Rhizobium* (tableau 3).

Tableau 3 : Résultat des prélèvements.

Prélèvement	Nombre des souches
Sidi Aïssa (SA)	10
Stade	5

2. Caractères morphologiques :

2.1. Examens macroscopiques :

Les colonies de *Rhizobium* apparues après une période de croissance de 24 à 72 heures à 28°C avaient des tailles variées, généralement d'une forme circulaire irrégulière d'un diamètre en 0,5 et 4 mm. Elles avaient une couleur laiteuse avec une texture lisse et visqueuse et une brillance (Figure 16). Tous ces caractères sont semblables aux travaux.



Figure 16 : Croissance des souches de *Rhizobium* sur YMA (photo personnelle)

2.2. Examens microscopiques :

2.2.1. État frais :

L'observation microscopique à partir d'un microscope optique Gx40 a révélé la présence de ces bactéries sous forme de petits bacilles mobiles grâce aux flagelles qui sont présentes au niveau de leurs parois cellulaires. Ces derniers permettent aux bactéries *Rhizobium* de se déplacer et de coloniser les racines, fixant ainsi l'azote (Gage, 2004).

2.2.2. Coloration de Gram :

Suite la coloration de Gram, les isolats de *Rhizobium* observés au microscope optique apparaissent sous forme de bacilles Gram négatif, fins et non sporulés (figure 17). Les cellules prennent une coloration rose à rouge après la contre-coloration à la safranine, en raison de la faible épaisseur de leur couche de peptidoglycane qui ne retient pas le cristal violet lors de la décoloration à l'alcool. Plusieurs chercheurs ont prouvé ces résultats et il s'agit d'une caractéristique morphologique partagée par les *Rhizobium* (Somasegaran et Hoben, 1994).

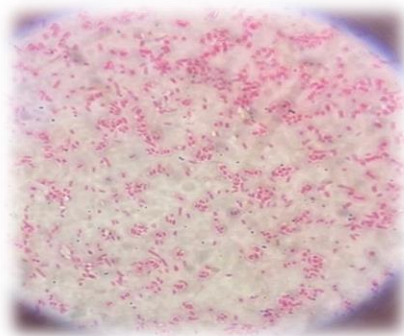


Figure 17 : Résultat de coloration de Gram (G×100) (Photo personnelle).

2.3. Études des caractères biochimiques des souches isolées:

2.3.1. Test d'oxydase :

Après la réalisation de ce test, l'apparition d'une coloration bleue sur la bandelette a été observée, indiquant que les bactéries possèdent l'enzyme cytochrome oxydase dans la chaîne de respiration cellulaire, elle est donc oxydase-positive (Shree et al., 2022).

2.3.2. Test de catalase :

Les résultats issus de l'interaction avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été positifs pour toutes les souches testées, comme le montre la formation de bulles d'air autour des colonies bactériennes (**Figure 18**). Cela atteste la présence de l'enzyme catalase qui est un caractère biochimique trouvé chez les bactéries aérobies comme les Rhizobia, qui lui confèrent une meilleure résistance au stress oxydatif rencontré dans le sol ainsi qu'au cours de la symbiose avec les légumineuses (**Sigaud et al., 1999**).



Figure 18 :Résultat de test de catalase (Photo personnelle).

2.3.3. Citrate de Simmons :

Après ce test, aucune modification de la couleur du milieu de culture n'a été observée, ce qui signifie qu'il était citrate-négatif, indiquant que Rhizobium n'utilisait pas le citrate comme unique source de carbone (figure 19). Ce résultat était conforme aux résultats de l'étude par **Tamam et Alebejo (2017)**.

Suite à ce test, le milieu de culture est devenu bleu dans certains tubes (positifs au citrate), indiquant que les bactéries utilisaient le citrate comme source de carbone (**Shree et al., 2022**). Cependant, aucun changement n'a été observé dans d'autres tubes, suggérant que les bactéries étaient incapables d'utiliser le citrate comme source de carbone (citrate négatif) (**Belay et Assefa, 2011**). Cette variation est attribuée à la diversité génétique et des conditions écologiques des isolats de Rhizobium (**Mahmud et al., 2020 ; Singh et Ali., 2022**).



Figure 19 :Résultat positif et négatif de test de citrate de Simmons (photo personnel)

2.3.4. Nitrate réductase :

Après l'ajout des réactifs de nitrate 1 et 2 aux tubes présentant une turbidité visible, certaines souches ont viré au rouge, indiquant l'existence de l'enzyme nitrate réductase (**Figure 20a**). Certaines souches sont restées sans couleur, ce qui a nécessité à l'ajout de poudre de zinc. Après un court temps, le milieu de culture est devenu rouge, indiquant que ces bactéries manquaient de l'enzyme, car la poudre de zinc a converti les nitrates en nitrites (**Figure 20b**). La capacité des souches de *Rhizobium* à transmettre les nitrates en nitrite dans les bactéroïdes présents à l'intérieur des nodules racinaires constitue un signe significatif de leur apport à la fixation de l'azote atmosphérique (**Bedmar et al., 2005**).

En 2002 Luciński et ces collaborateurs ont prouvé que la capacité de réduction des nitrates varie selon l'espèce et la souche de *Rhizobium*, ce qui explique la diversité des résultats observés lors des tests biochimiques.

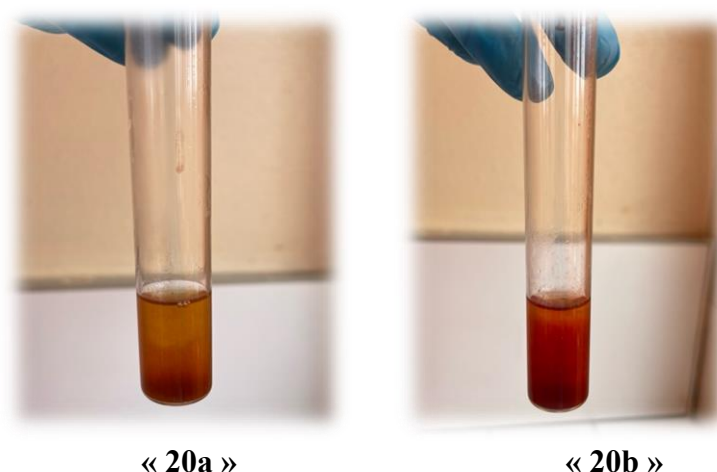


Figure 20 : Résultat de test Nitrate réductase

« a » test positif, « b » test négatif après l'ajout de poudre de zinc

2.3.5. Test de GPA:

Après trois jours d'incubation à 28°C dans un milieu GPA, il n'y a eu ni croissance bactérienne, ni changement de couleur dans le milieu (**Figure 21**). Ce résultat démontre la pureté des isolats réalisés. Cela est en concordance avec les constats antérieurs de **Benselama et al. (2018)** ainsi que de **Mavingui et al. (2021)**. L'environnement GPA est souvent employé pour différencier *Agrobacterium* de *Rhizobium*, principalement à partir de nodules de légumineuses, en s'appuyant sur deux facteurs: la faculté de développement dans ce milieu et la modification du pH, signalée par un changement de couleur en jaune. Le manque de ces réactions dans notre situation confirme que nous n'avons pas de contamination par *Agrobacterium*.



Figure 21 : Résultat de croissance sur milieu GPA (Photo personnelle)

2.3.6. Croissance sur le milieu YMA+RC:

Plusieurs procédés de purifications sur le milieu YMA enrichi en rouge Congo, après une incubation de 48 à 72h à 28°C, ont montré des colonies de *Rhizobium* roses. Ceci est attribué à une faible absorption de rouge Congo et certaines souches ne montrent aucune absorption de RC (**Figure 22**). En (1994) **Somasegaran et Hoben** ont confirmé cette observation en démontrant que les souches de *Rhizobium* absorbent généralement peu ou pas le Rouge Congo, ce qui constitue une caractéristique classique utilisée pour leur identification préliminaire.



Figure 22 : Croissance sur le milieu YMA+RC (Photo personnelle)

3. Étude de la formation de biofilm sous l'effet de glucose :

3.1. Technique de microplaque à 96 puits (TCP) :

L'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer la capacité des bactéries à former un biofilm, et qui est reconnue comme une méthode de référence, est celle des microplaques en polystyrène (Tissue Culture Plate, TCP). Elle permet de mesurer quantitativement la biomasse du biofilm produit, ce qui facilite la comparaison du potentiel d'adhésion entre différentes souches bactériennes. Cette méthode a aussi l'avantage de pouvoir analyser simultanément un grand nombre d'isolats, tout en restant simple à mettre en œuvre, reproductible et peu coûteuse. Elle convient donc particulièrement pour étudier les facteurs influençant la formation du biofilm ainsi que pour identifier les conditions de culture les plus favorables à son développement (**Stepanović et al., 2007; Azeredo et al., 2017**).

Dans cette étude, la capacité de toutes les souches isolées à former des biofilms a été évaluée sous l'influence de différentes concentrations de glucose, à l'aide de microplaques stériles à 96 puits. En utilisant le milieu de croissance (YMA) additionné de 0.5%, 1% et 2% de glucose.

Les résultats montrent que certaines souches bactériennes notamment SA4, suivie des souches SA7 et SA8 présentent une forte capacité à former des biofilms, donc une bonne production d'EPS, même en l'absence de sucre. Paradoxalement, l'ajout de 0,5 % de glucose réduit significativement la production de biofilm pour la plupart de ces souches, y compris SA4 et SA8. Cet effet inhibiteur est probablement dû à une perturbation de l'équilibre métabolique des bactéries par le glucose, interférant avec les processus d'adhésion nécessaires au développement du biofilm (**figure 23**) (Oleńska *et al.*, 2021).

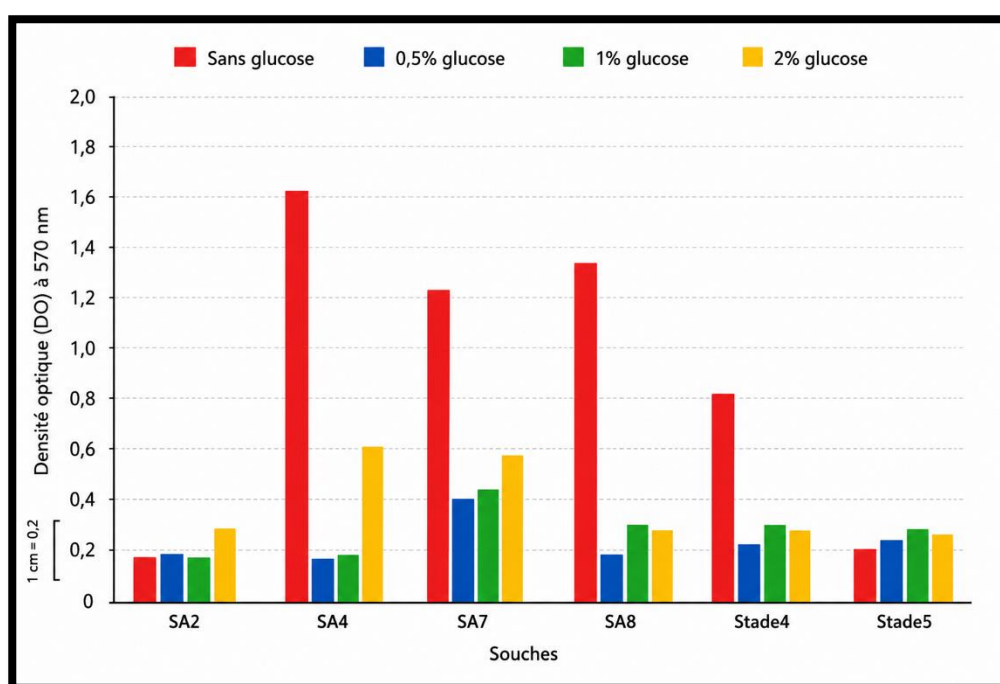


Figure 23 : Résultats de l'effet du glucose sur la formation de biofilm des souches étudiées

Selon Ignatova *et al.*, 2023 ; l'effet du glucose sur le biofilm varie selon l'espèce bactérienne et la concentration de sucre utilisée.

Cependant, la souche SA7 est restée capable de produire un biofilm en quantités moyennes à tous les niveaux de glucose utilisés ($DO_{570} = 0,40$ à $0,585$), ce qui indique une bonne adaptation au changement de l'environnement nutritif. Ceci est dû à des mécanismes de régulation permettant la stabilité de la biosynthèse des exopolysaccharides malgré les fluctuations environnementales (Chávez-Jacobo *et al.*, 2023).

Il est possible que le niveau relatif de l'optidensité augmenté chez les souches SA4 et SA7 sous une concentration de glucose de 2 % soit dû à la stimulation partielle du processus de biosynthèse des composants du biofilm sous des conditions de l'excès de carbone (**Mukhi & Vishwanathan, 2022**).

Les souches SA2 et St 5 avaient affiché des valeurs très basses en termes de densité optique dans toutes les conditions testées, ce qui témoigne d'une faible capacité à développer le biofilm. Ceci pourrait être lié au fait qu'elles produisent peu d'exopolysaccharides ou expriment des gènes à adhésion bactérienne (**Nocelli *et al.*, 2023**).

Généralement, les résultats montrent que l'effet du glucose sur la formation du biofilm varie selon la souche étudiée, cela confirme que la réponse des rhizobia aux sources de carbone dépend fortement de leurs caractéristiques physiologiques et génétiques (**tableau 4**) (**Oleńska *et al.*, 2021 ; Chávez-Jacobo *et al.*, 2023**).

Tableau 4 : Classification des souches de *Rhizobium* selon leur capacité de formation de biofilm, sous différentes concentrations de glucose après 48 h d'incubation

Souche	Sans glucose	0,5%glucose	1%glucose	2%glucose
SA2	0,17(Faible)	0,18(Faible)	0,17(Faible)	0,29(Faible)
SA4	1,62(Forte)	0,175(Faible)	0,182(Faible)	0,607(Modéré)
SA7	1,23(Forte)	0,40(Modéré)	0 ,445(Modéré)	0,585(,Modéré)
SA8	1,35(Forte)	0,18(Faible	0,30(Faible)	0,27(Faible)
St 4	0,812(Forte)	0,22(Faible)	0,3(Faible)	0,28(Faible)
St 5	0,202(Faible)	0,24(Faible)	0,29(Faible)	0 ,28(Faible)

3.2. Méthodes des tubes :

La méthode des tubes en verre a révélé que la formation du biofilm varie en fonction des différentes souches de *Rhizobium* et de la concentration en glucose présente dans le milieu de culture (**tableau 5**). Les rhizobia présentent souvent une variabilité, car la synthèse des exopolysaccharides et les processus d'adhésion sont régis par des facteurs génétiques et sont influencés par les conditions environnementales (**Acosta-Jurado *et al.*, 2021**).

Les données obtenues grâce à la technique des tubes en verre indiquent que la capacité de formation du biofilm fluctue en fonction des souches de *Rhizobium* ainsi que de la quantité de glucose (tableau 5).

Tableau 5 :Classification des souches de *Rhizobium* selon leur capacité de formation de biofilm sous différentes concentrations de glucose (Méthode des tubes)

Souche	Sans glucose	0,5% glucose	1% glucose	2% glucose
SA2	0,170(Faible)	0,16(Faible)	0,19(Faible)	0,06(Non productrice)
SA4	0,24(Faible)	0,46(Modéré)	0,12(Faible)	0,05(Non productrice)
SA7	0,30(Faible)	0,16(Faible)	0,34(Faible)	0 ,07(Non productrice)
SA8	0,28(Faible)	0,68(Modéré)	0,30(Faible)	0,05(Non productrice)
St 4	0,46(Modéré)	0,44(Modéré)	0,21(Faible)	0,02(Non productrice)
St 5	0,22(Faible)	0,39(Modéré)	0,56(Modéré)	0,02(Non productrice)

En absence de glucose, la souche **St 4** a présenté la valeur de densité optique la plus élevée (DO570 = 0,46), suivie des souches SA7 (0,30) et SA8 (0,28), ce qui indique une meilleure

aptitude naturelle à la formation du biofilm. Cette capacité est souvent associée à une production importante de polysaccharides extracellulaires qui favorisent l'adhésion bactérienne aux surfaces (Oleńska *et al.*, 2021).

L'addition de glucose à **0,5 %** a stimulé la formation du biofilm chez certaines souches, notamment SA8 (DO570 = 0,68) et SA4 (DO570 = 0,46), suggérant que cette concentration constitue une source de carbone favorable à la synthèse de la matrice extracellulaire (figure 24).

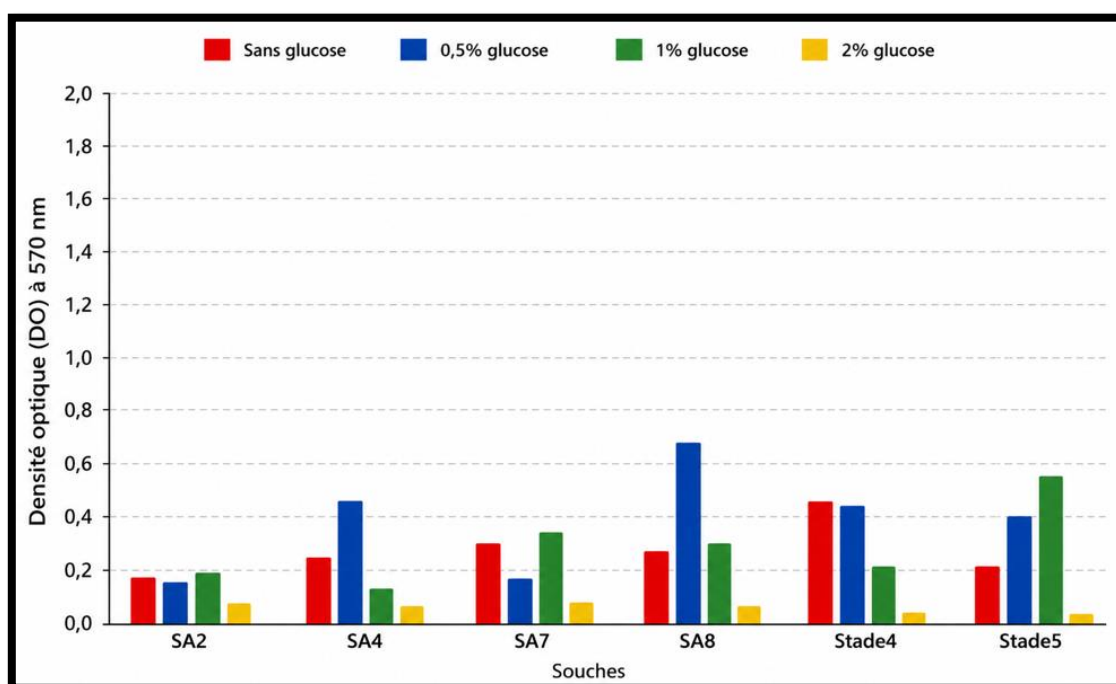


Figure 24: Résultat de l'effet du glucose sur la formation de biofilm des souches étudiées

Des études récentes indiquent que les nutriments disponibles dans le milieu influencent directement les premières étapes de l'adhésion et de la maturation du biofilm (Santore, 2022).

À la concentration de **1 % de glucose**, une augmentation de la densité optique a été observée chez la souche Stade5 (DO570 = 0,56) et SA7 (DO570 = 0,34), tandis qu'une diminution a été enregistrée chez d'autres souches. Cette différence montre que la réponse au glucose est spécifique à chaque souche et dépend de ses caractéristiques physiologiques et métaboliques (Han et Lee, 2023).

En revanche, l'ajout de **2 % de glucose** a conduit à une très faible production de biofilm chez toutes les souches, avec des valeurs comprises entre 0,02 et 0,07, classant ces dernières comme

non productrices. Une concentration élevée en source carbonée peut provoquer un déséquilibre métabolique et modifier les mécanismes de régulation impliqués dans le développement du biofilm (**Caldara *et al.*, 2022**).

D'une manière générale, les résultats obtenus confirment que la formation du biofilm dépend à la fois des propriétés génétiques des souches et des conditions nutritionnelles du milieu, notamment de la disponibilité des sources carbonées (**Ajijah *et al.*, 2023**).

La comparaison avec la méthode de la microplaque en polystyrène (TCP) a montré que cette dernière permet de détecter des niveaux de biofilm généralement plus élevés que la méthode des tubes en verre. Cette différence pourrait être liée à la nature du support, le polystyrène offrant une surface plus favorable à l'adhésion bactérienne et à la maturation du biofilm que le verre (**Nilesh *et al.*, 2022**).

Ainsi, les résultats obtenus confirment que la nature du matériau utilisé pour l'adhésion bactérienne influence la production du biofilm et que la méthode TCP apparaît plus sensible et plus adaptée à une évaluation quantitative de cette capacité (**Santore, 2022 ; Han & Lee, 2023**).

Conclusion

Cette étude a permis d'isoler et de caractériser des souches de *Rhizobium* à partir des nodules racinaires de *Vicia faba* L. prélevées dans deux sites de la région de Ghazaouet (Tlemcen). Les analyses morphologiques, microscopiques et biochimiques ont confirmé que les isolats présentaient les principales caractéristiques du genre *Rhizobium*, notamment leur aspect de bacilles à Gram négatif, leur mobilité, leur activité catalase et oxydase positives ainsi que leur faible affinité pour le milieu GPA, indiquant la pureté des souches isolées.

L'évaluation de la formation de biofilm a montré une variabilité importante entre les souches étudiées. Certaines, telles que SA4, SA7 et SA8, ont présenté une forte capacité de production de biofilm en absence de glucose, traduisant une bonne aptitude à l'adhésion et probablement une production importante d'exopolysaccharides, éléments essentiels à la colonisation racinaire et à l'établissement de la symbiose avec la plante hôte.

L'étude de l'effet du glucose a révélé que son influence dépend de la concentration utilisée et des caractéristiques propres à chaque souche. Chez la majorité des isolats, l'ajout de glucose a entraîné une diminution de la production de biofilm, alors que certaines souches, notamment SA7, ont conservé une capacité modérée de formation de biofilm quelles que soient les concentrations testées. Ces observations suggèrent une diversité physiologique et métabolique importante entre les souches de *Rhizobium*.

il serait intéressant de compléter ce travail par des études moléculaires visant à identifier précisément les souches isolées, à caractériser les gènes impliqués dans la formation du biofilm et à évaluer leur efficacité symbiotique dans des conditions de culture en serre et au champ. Ces investigations permettront de mieux valoriser les ressources microbiennes locales au service de l'agriculture durable.

Enfin, Dans une perspective agronomique, ces résultats mettent en évidence le potentiel de certaines souches locales comme candidates à la production de biofertilisants capables d'améliorer la colonisation racinaire et l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote, contribuant ainsi à une agriculture plus durable et à la réduction de l'utilisation des engrais chimiques.

Références Bibliographiques

- Acosta-Jurado, S., et al. (2021). *Rhizobial Exopolysaccharides: Genetic Regulation of Their Synthesis and Relevance in Symbiosis with Legumes*. International Journal of Molecular Sciences, 22(12), 6233.
- Ajijah, N., et al. (2023). *Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability*. Diversity, 15(1), 112.
- Al-Mallah, M. K., Jaber, S. H., & Faisal, N. (2025). Thermal stress responses and biofilm architecture modifications in *Rhizobium leguminosarum* strains. Journal of Thermal Biology, 127, Article 103912. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2024.103912>
- Andrews, M., et al. (2022). Isolation and characterization of rhizobia associated with legumes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 861340.
- Aneja, K. R. (2021). *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. New Age International Publishers.
- Banerjee, S et Heijden, M.G.V. (2022). Soil microbiomes and on health.. Nature Reviews Microbiology, 21(1), 1-15
- Bedmar, E. J., Robles, E. F., & Delgado, M. J. (2005). *The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium Bradyrhizobium japonicum*. Biochemical Society Transactions, 33(1), 141–144. <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- Beijerinck, M.W. (1888). *Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen*.
- Belay, N., & Assefa, F. (2011). Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 10(21), 4372–4381.
- Benselama, A., Tellah, S., Ourem, F., & Ounane, S. M. (2018). *Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of Vicia faba in Algeria*. Legume Research, 41(4), 624–628. <https://doi.org/10.18805/LR-399>
- Bogino, P. C., Oliva, M. L., Sorroche, F. G., & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms in plant–bacterial associations. International Journal of Molecular Sciences, 14(8), 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
- Burris, R. H. (1991). Nitrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9339–9342.

- Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D. K., & Bauer, W. D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the vicinity of alfalfa roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3150–3157. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3150-3157.1988>
- Caldara, M., et al. (2022). *Environmental, Microbiological, and Immunological Features of Bacterial Biofilms*. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(2).
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2020). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pearson.
- Caroline, M. (2017). Importance nutritionnelle et agronomique des légumineuses.
- Carroll, P.V. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a world of Declining Renewable Resources*, *Plant Physiology*, 127(2), 390-397.
- Castellani, L. G., Perez-Gimenez, J., & Lodeiro, A. (2024). Cyclic di-GMP signaling network regulates the switch between motility and biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Microbiology*, 121(3), 445–459. <https://doi.org/10.1111/mmi.15211>
- Castellanos, T., Ascencio, F., & Bashan, Y. (1997). Cell surface hydrophobicity and lipopolysaccharide in *Rhizobium etli* strains with different nodulation efficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 154(2), 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12668.x>
- Castellanos, T., Ascencio, F., & Bashan, Y. (1997). Cell surface hydrophobicity and lipopolysaccharide in *Rhizobium etli* strains with different nodulation efficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 154(2), 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12668.x>
- Chávez-Jacobo, V. M., et al. (2023). *The Sinorhizobium meliloti NspS-MbaA system affects biofilm formation, exopolysaccharide production and motility*. *Microbiology*, 169(1).
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., et al. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996–1006.

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 621–631.
- Djedidi, S., Brahmi, I., & Beddier, A. (2023). Legume root exudates as key orchestrators of rhizobial biofilm development and chemotaxis navigation. *Phytochemistry Reviews*, 22(4), 891–908. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09865-w>
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67–82.
- Emma, L., Philip, P. (2003). Metabolism of Rhizobium Bacteroids. *Critical Reviews in plants sciences*, 22(1), 37–78.
- FAO. (2025). Agricultural Production Statistics 2010–2024. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/statistics/>
- FAOSTAT. (2026). Faba bean global production statistics and crop analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., et al. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Frank, B. (1889). *Über die Pilzsymbiose der Leguminosen*.
- Fraysse, N., Couderc, F., & Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1365–1380. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x>
- Fred, E.B., Baldwin, I.L., McCoy, E. (1932). *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*.
- 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.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00084.x>

- Fuqua, C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
- Gage, D. J. (2004). *Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation*. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Garrity, G.M. et al. (2004). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Gordon, J., & McLeod, J. W. (1928). The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 31, 185–190.
- Goyoaga, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Romero, C., Guillamón, E., Varela, A., Pedrosa, M. M., & Muzquiz, M. (2011). Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.002>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877.
- Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 12, 426.
- Han, A., & Lee, S.-Y. (2023). *An overview of various methods for in vitro biofilm formation: a review*. *Food Science and Biotechnology*, 32, 1617–1629.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (Eds.). (2016). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- 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.
- Ignatova, N., et al. (2023). *Effect of pH, Norepinephrine and Glucose on Metabolic and Biofilm Activity of Microorganisms*. *Microorganisms*, 11(4), 862.

- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7898–7933. <https://doi.org/10.3390/ijms12117898>
- Jarso M, Keneni G. 2006. Vicia faba L. In: Brink M, Belay G. (eds). Ressources végétale de l'Afrique tropicale, Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas P 220-225.
- Jarso M, Keneni G. 2006. Vicia faba L. In: Brink M, Belay G. (eds). Ressources végétales de l'Afrique tropicale, Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas.
- **Jean et al. (2006).** Manuel de microbiologie : Classification taxonomique des bactéries fixatrices d'azote.
- Jean, P. (2017). Les légumineuses en agriculture et alimentation.
- Jean,M.G., Michel,A., Willy,M.(2010).Le sol vivantp.edition 3 revue et augmentee,817p.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Felix, J. D., & Rivas, R. (2023). Calcium and magnesium availability shapes the extracellular matrix composition of Rhizobium biofilms during root attachment. *Environmental and Experimental Botany*, 205, Article 105120. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105120>
- Jordan, D.C. (1982). Transfer of rhizobial strains to Bradyrhizobium.
- Kaci, Y., Belkebir, A., & Masson-Boivin, C. (2024). Phytohormones in the rhizosphere: Modulators of Rhizobium surface motility and biofilm maturation. *Plant and Soil*, 496(1), 215–231. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06314-8>
- Kovacs, N. (1956). Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
- Liu, Y., Xu, Z., Chen, L., Xun, W., Shu, X., Chen, Y., ... & Zhang, R. (2023). Root colonization by beneficial rhizobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(1), fuad066. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad066>.
- Łotocka, B., et al. (2012). The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis*, 58, 63–72.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th ed.). Pearson.

- Mahmud, M. A., Zahan, M. S., & Islam, M. T. (2020). Biochemical and molecular characterization of *Rhizobium* isolates from leguminous plants. *Microbiology Research Journal International*, 30(6), 24–33. <https://doi.org/10.9734/mrji/2020/v30i630238>
- Marketon, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A., & González, J. E. (2003). Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 325–331. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.325-331.2003>
- Mavingui, P., Ndziessi, G., Nguimbi, E., & collaborators. (2021). *Isolation and Characterization of Native Rhizobium Strains Nodulating Some Legumes Species in South Brazzaville in Republic of Congo*. Open Access Library Journal.
- Michael, F. D. (2014). Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobium-legume interactions. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-41.
- Miller, L. D., Yost, C. K., Hynes, M. F., & Alexandre, G. (2007). The chemotaxis of rhizobia to plant root exudates. *Plant and Soil*, 301, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9425-8>
- Mukhi, M., & Vishwanathan, A. S. (2022). *Beneficial Biofilms: Strategies to Enhance Biofilm Formation for Biotechnological Applications*. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3).
- Mulani, R., Patel, K., & Patel, S. (2023). Isolation, characterization and molecular identification of *Rhizobium* spp. and *Trichoderma* spp. from nodule and rhizospheric soil of *Arachis hypogaea*. *Acta Scientific Microbiology*, 6(12), 47-56. <https://doi.org/10.51135/asmi.06.1319>
- Naranjo-Robayo, A., Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., & Velázquez, E. (2026). Updated taxonomy of the family Rhizobiaceae with proposals for 8 novel genera and 32 novel combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 76(4), 007131. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.007131>.
- Nilesh, H., et al. (2022). *Clinically relevant in vitro biofilm models: A need to mimic and recapitulate the host environment*. *Biofilm*, 4, 100069.
- Nocelli, N., et al. (2023). *Coaggregative interactions between rhizobacteria are promoted by exopolysaccharides from Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Basic Microbiology*, 63(6), 646-657.

- Nogales, J., Campos, J., BenAbdelkhalek, H., & Olivares, J. (2015). Rhizobial extremophiles: Genetic and molecular basis of environmental stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 6, Article 1115. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01115>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546.
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Oleńska, E., et al. (2021). *Exopolysaccharide Carbohydrate Structure and Biofilm Formation by Rhizobium leguminosarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2808.
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., et al. (2021). *Exopolysaccharide carbohydrate structure and biofilm formation by Rhizobium leguminosarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2808.
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., et al. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48, 1–17.
- Ponraj, P., Dandapat, S., & Srinivasan, R. (2022). Quorum sensing signaling molecules in Rhizobium–legume symbiosis: A review. *Microbiological Research*, 258, Article 126997. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126997>
- Rai, R., Dash, S., & Sikkim, P. (2015). Biochemical characterization of French bean associated rhizobia found in North Bengal and Sikkim. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 6(2), 35-42.
- Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 304(1), 1–11.
- Rinaudi, L. V., & González, J. E. (2009). The Sinorhizobium meliloti exopolysaccharides: Molecular characterization and role in plant–microbe interactions. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4501–4507. <https://doi.org/10.1128/JB.00863-09>
- Rinaudi, L. V., & González, J. E. (2010). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from Sinorhizobium meliloti is a crucial déterminante of biofilm

- formation. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 115–124.
<https://doi.org/10.1128/JB.01051-09>
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52
 - Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankangs, M., Downie, J. A., & Zorreguieta, A. (2006). *Rhizobium leguminosarum* bvs. *viciae* and *trifolii* form biofilms on solid surfaces and immobilized phenotypes on roots. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4474–4482. <https://doi.org/10.1128/JB.00044-06>
 - Sadowsky, M. J., Kaneko, T., & Martinez-Romero, E. (2005). Genus I. *Rhizobium* Frank 1889. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 2, pp. 324-340). Springer
 - Sahu, P. K., Tilgam, J., Mishra, S., et al. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, 62(6), 647–668. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100462>
 - Santore, M. M. (2022). *Interplay of physico-chemical and mechanical bacteria-surface interactions with transport processes controls early biofilm growth*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 304, 102665.
 - Sarkar, S., & Chakraborty, B. (2024). Carbon source allocation profiles modulate exopolysaccharide finger-printing and biofilm structural density in *Rhizobium leguminosarum*. *Carbohydrate Polymers*, 323, Article 121450. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121450>
 - Shetta, N.D., Al-Shaharani, T.S et Abdel-aal, M. (2011). Identification and Characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown unde Saudi Arabia condition.
 - ShreeK.S., Prasad, N., Prakruthi, G., Siddaligeswara, K.G et Patil, S.J. (2022). Isolation, Biochemical Characterization of *Rhizobium* sprs SN 01 Strain from Root Nodules of *Mimosa pudica* and their impact on Agriculture Crops. *Asian Journal of Biological and life Science*, 11(1), 200-205.
 - Shrestha, A., Malla, R., & Hirsch, A. M. (2023). Deciphering the N-acyl homoserine lactone (AHL) regulon involved in *Bradyrhizobium* biofilm maturation. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology, 107(14), 4621–4635.
<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12590-y>
- Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A., & Héroutart, D. (1999). Differential regulation of two catalase genes during the *Sinorhizobium meliloti*–Medicago symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2634–2639.
<https://doi.org/10.1128/JB.181.8.2634-2639.1999>
 - Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon group. *Journal of Infectious Diseases*, 39(3), 209–214.
 - Singh, R., Verma, J. P., & Yadav, J. (2022). Characterization of rhizobial isolates associated with pulse crops. *Legume Research*, 45(9), 1132–1138.
<https://doi.org/10.18805/LR-4662>
 - Somasegaran P, Hoben H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. Berlin.
 - Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria.
 - Sprent, J. I. (2009). *Legume Nodulation: A Global Perspective*. Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781444316384>
 - Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
 - Stoodley, P., et al. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187-209.
 - Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
 - Tamam, A., & Alebejo, M. D. (2017). Biochemical characterization of rhizobial isolates associated with legumes. *Journal of Microbial Research*, 3(1), 70–84.
 - Tengfei,M.,Xue,H.,Piao,C.,Jiang,N et Li, Y. (2023). Phylogenomic reappraisal of the family Rhizobiaceae at the genus and species levels including the description of *Ectorhizobium quercum* gen.nov.,sp.nov. *Frontiers in Microbiology*. Doi :10.3389/fmicb.2023.1207256.
 - Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805.

- Valérie, C. et al. (2010). Les légumineuses dans l'alimentation humaine. INRA Editions.
- Vincent JM .1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell
- Weldemariam, G. A. (2024). Isolation and characterization of rhizobia and evaluation of their effect on radish (*Raphanus sativus*) growth. Bangladesh Journal of Botany, 53(1), 45-53. <https://doi.org/10.3329/bjb.v53i1.72284>
- Williams, A., Wilkinson, A., & Downie, J. A. (2008). Lipopolysaccharide structure modulates infection thread development and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21(2), 167–177. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0167>
- Yates, R. J., Howieson, J. G., Hungria, M., Bala, A., O'Hara, G. W., & Terpolilli, J. J. (2016). Authentication of rhizobia and assessment of nitrogen fixation effectiveness. In J. G. Howieson & M. J. Dilworth (Eds.), Working with rhizobia (pp. 73-108). Australian Centre for International Agricultural Research.
- Zakhia ,F et Philippe de,L. (2001). Taxonomy of rhizobia . Agronomie, 21(6-7), 569-576.
- Zakhia et al. (2004) ; Howieson & Brockwell (2005). Root Nodule Bacteria (RNB) and their taxonomic relationship with the phenotype Rhizobia.
- Zakhia, F., & Philippe, R. (2001). Révision de la classification des souches à croissance rapide et lente.

Annexes

Annexe I: Compositions de milieux de cultures utilisés.

Le milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

- **Mannitol :** 10g
- **K₂HPO₄:** 0,5g
- **MgSO₄:** 0,2g
- **NaCl:** 0,1g
- **Extrait de levure :** 1g
- **Eau distillée :** 1000mL
- **PH:** 6,8

Autoclavage 120 C pendant 20 minutes.

Le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

- **Mannitol :** 10g
- **K₂HPO₄:** 0,5g
- **MgSO₄:** 0,2g
- **NaCl:** 0,1g
- **Extrait de levure :** 1g
- **Agar:** 18g
- **Eau distillée :** 1000mL
- **PH:** 6,8

Autoclaver 120 C pendant 20 minutes.

Le milieu YMA+RC :

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

Le milieu GPA :

- **Glucose :**10g
- **Peptone :**5g
- **Pourpre de bromocrésol (BCP):** 10mL
- **Agar:** 15g
- **Eau distillée :** 1000mL
- **PH:** 6,8.

La solution de BCP (1g du pourpre de bromocrésol dans 100mL d'éthanol)est ajoutée après autoclavage et refroidissement du milieu à environ 50 °C.

Annexe II : La coloration de Gram

- Préparation des frottis bactérienne mince
- Recouvrir le frottis de **cristal violet** pendant **1 minute** et rincer doucement à l'eau
- Recouvrir de **Lugol** pendant **1 minute** et rincer à l'eau
- Ajouter de l'alcool à 95 % ou alcool-acétone pendant **10 à 20 secondes** jusqu'à ce que l'écoulement devienne presque incolore puis rincer immédiatement à l'eau pour arrêter la décoloration.
- Recouvrir de **safranine** pendant **30 à 60 secondes** puis rincer l'eau.
- Sécher avec du papier absorbant.

Annexe III:

Le PBS:

- **NaCl:** 8g
- **KCl:** 0,2g
- **Na₂HPO₄:** 1,44g
- **KH₂PO₄:** 0,24g
- **PH:** 7,4

Solution de cristal violet à 0,01 % :

- **Poudre de cristal violet :** 0,01 g.
- **Eau distillée stérile :** 100mL

Homogénéiser et filtrer.

Rouge Congo 10%:

- **Poudre de Rouge Congo :** 10g
- **Eau distillée stérile :** 100mL

الملخص:

يعتمد التكافل المثبت للنتروجين بين بكتيريا الريزوبيوم و البقوليات، و هو ضروري للزراعة المستدامة، بشكل مباشر على التكوين الأولي للغشاء الحيوي البكتيري الذي يضمن الالتصاق واستعمار الجذور بكفاءة و القدرة التنافسية للسلالة .

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف سلالات بكتيريا الريزوبيوم من عُقيدات الفاصوليا التي جُمعت من منطقة الغزوات، ولاية تلمسان، ثم تقييم قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية في المختبر تحت تراكيز مختلفة من الجلوكوز. بعد التأكد من الخصائص البكتيرية القياسية، تم قياس إنتاج الأغشية الحيوية باستخدام طريقة الزرع على الأطباق وطريقة الأنابيب بعد 48 ساعة من الحضانة.

تُظهر النتائج التأثير الكبير لمحتوى الجلوكوز على حركية وكثافة تكوين الأغشية الحيوية. يُتيح تحديد السلالات عالية الأداء آفاقًا واعدة لاختيارها كأسمدة حيوية طبيعية لتحسين إنتاجية محاصيل البقوليات.

الكلمات المفتاحية: ريزوبيوم، *Vicia faba*، التكافل، تكوين العقد، الغشاء الحيوي، الجلوكوز، الأسمدة الحيوية.

Résumé :

La symbiose fixatrice d'azote entre Rhizobium et les légumineuses, essentielle pour l'agriculture durable, dépend directement de la formation initiale d'un biofilm bactérien qui assure l'adhésion, la colonisation efficace des racines et la compétitivité des souches

L'objectif de cette étude était d'isoler et de caractériser des souches de Rhizobium à partir de nodules de fèves prélevés sur la région de Ghazaouet, la wilaya de Tlemcen, puis d'évaluer in vitro leur capacité de formation de biofilm sous l'effet de différentes concentrations de glucose. Après confirmation des caractéristiques bactériologiques classiques, l'aptitude à produire un biofilm a été quantifiée par la méthode de culture sur plaque (TCP) et la technique des tubes après 48 heures d'incubation.

Les résultats démontrent l'impact significatif de la teneur en glucose sur la cinétique et l'intensité de la biofilmisation. L'identification de souches hautement performantes ouvre des perspectives prometteuses pour leur sélection en tant que biofertilisants naturels afin d'optimiser le rendement des cultures de légumineuses.

Mots-clés : Rhizobium, *Vicia faba*, symbiose, nodulation, biofilm, glucose, biofertilisants.

Abstract :

The nitrogen-fixing symbiosis between Rhizobium and legumes, essential for sustainable agriculture, depends directly on the initial formation of a bacterial biofilm which ensures adhesion, efficient root colonization and strain competitiveness.

The objective of this study was to isolate and characterize Rhizobium strains from bean nodules collected in the Ghazaouet region of Tlemcen Province, and then to evaluate their biofilm-forming capacity in vitro under different glucose concentrations. After confirming classic bacteriological characteristics, biofilm production ability was quantified by the plate culture method (PCM) and the tube technique after 48 hours of incubation.

The results demonstrate the significant impact of glucose content on the kinetics and intensity of biofilm formation. The identification of high-performing strains opens promising prospects for their selection as natural biofertilizers to optimize legume crop yields.

Keywords: Rhizobium, *Vicia faba*, symbiosis, nodulation, biofilm, glucose, biofertilizers