



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie microbienne

Intitulé :

---

**Caractérisation biochimique des bactéries nodulants  
la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L.**

---

Présenté et soutenu par : Mazouz Chaima

Le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr Benhizia Yacine (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Chabbi Rabah (M.A.A- UFM Constantine).

Examineurs : Mme Bouzeraib Latifa (M.A.A- UFM Constantine).

*Année universitaire  
2017 - 2018*

## **Remerciements**

*Tout d'abord, merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.*

*Je tiens à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire **Mr Chabbi Rabah**. Je le remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

*Je remercie sincèrement **Mr Benhizia Yacine** professeur à l'Université des Frères Mentouri-Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Je remercie également **Mme Bouzeraïb Latifa** Maitre Assistant « A » à l'Université des Frères Mentouri- Constantine, d'avoir accepté d'examiner et juger notre travail.*

*A toutes personnes intervenant par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé ma réflexion et ont accepté à tout rencontrer et répondre à ma question durant notre recherche.*

*Merci à tous mes collègues du laboratoire d'Ecologie Microbienne pour leur soutien matériel et moral.*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail en premier lieu à ma mère et ma deuxième maman qui m'ont dirigée et suivie Durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leurs Sacrifices, Leur patience sans limite et l'éducation Qu'ils m'ont donnée, je leurs dit merci mille fois.*

*Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:*

*Mon cher fiancé : Hamza Adjedj*

*Mes chers frères : Abed Samad, Mohamed Amine et AbdElbasat et sa femme Amel et leur fils IyadAbdrahmane.*

*Et surtout à ma soeur: Maroua*

*Egalement je dédie ce travail à ma belle famille Et surtout à mon beau père Achour et ahmed (que Dieu ait pitié).*

*Finalement je dédie ce travail à mes adorables amies:*

*Malika, amina, Anwar et Amal.*

## Résumé

Ce travail a été réalisé sur huit souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Trigonella foenum-graecum* L. ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers l'étude des caractères cultureux et biochimiques.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'avoir des colonies homogène, une surface bombée, des bacilles à Gram négatif, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests biochimiques.

Les tests biochimiques effectués sont : réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée, activité cellulosique qui ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats.

**Mots clés :** *Trigonella foenum-graecum* L, caractérisation, isolats.

## **Abstract**

This work was carried out on eight bacterial strains isolated from root nodules of the legume *Trigonella foenum-graecum* L. were subjected to a phenotypic characterization through the study of cultural and biochemical characteristics.

Strain characterization in volves a morphological study that allowed us to have homogeneous colonies a domed surface of negative Gram bacilli, followed by phenotypic characterization that includes tests biochemical.

Biochemical tests performed are: nitrate reduction, hydrolysis of urea, cellulosic activity which evaluated the presence of enzyme activity in isolates.

Key words : *Trigonella foenum-graecum* L, characterization, isolates.

## ملخص

اجريت هذه الدراسة على ثمانية سلالات بكتيرية معزولة من العقد الجدرية للبقوليات

*Trigonella foenum graecum* L.

التوصيف المظهري للسلالات سمح لنا بتكوين مستعمرات متجانسة و سطح محدب، عصيات دات

Gram سلبية، يليها توصيف ظاهري يشمل اختبارات كيميوجيوية.

الاختبارات البيوكيميائية التي يتم إجرائها هي: انخفاض النترات ، تحليل اليوريا، نشاط السيليلوز الذي يقيم وجود نشاط الإنزيم في العزلات.

الكلمات المفتاحية: *Trigonella foenum graecum* L, دراسة وصفية, العزلات.

## Listes des Figures

**Figure 1 :** (a) Trigonella fleurissante, (b) pied de Trigonella

**Figure 2 :** Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004)

**Figure 3 :** Conservation des nodules

**Figure 4 :** Ensemencement par la technique des cadrans

**Figure 5 :** Croissance sur milieu YMA+ RC

**Figure 6 :** Croissance sur milieu YMA

**Figure 7 :** Croissance sur milieu GPA

**Figure 8 :** Résultat du test au bleu de bromothymol

**Figure 9:**Coloration de Gram observées sous microscope (G×100)

**Figure 10 :** (a) résultat négatif, (b) résultat positif

**Figure 11 :**(a) Test de l'Uréase positive, (b) la couleur initiale du milieu

**Figure 12:** Activité cellulosique chez les isolats

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1 Etude Bibliographique</b>	
<b>I-La symbiose</b> .....	3
I-1-définition.....	3
I-2- la fixation biologique de l'azote.....	3
I-3-Importance de l'azote pour la plante.....	3
<b>II-Rhizobia</b> .....	4
II-1-Taxonomie des rhizobia .....	4
<b>III-Les légumineuses</b> .....	5
III-1-La légumineuse fenugrec .....	5
III-2-Morphologiedelaplante .....	5
III-3-Toxonomie de la plante .....	5
<b>IV-Nodulation</b> .....	6
IV-1-Définition du nodule .....	6
IV-2-Mécanisme de la nodulation.....	6
IV-2-1-Formation des bactéroïde.....	6
IV-2-2- Préinfection.....	6
IV-2-3-L'infection.....	6
IV-2-4- Développement du nodule.....	6
<b>Chapitre 2 Matériel et Méthodes</b>	
<b>I- Isolement des bactéries nodulant le fenugrec (<i>Trigonellafoenum-graecum L</i>)</b> .....	8
I-1-Collecte des nodules .....	8
I-2- Conservation des nodules .....	8
I-3-Stérilisation des nodules .....	8
I-4- Isolement des bactéries .....	8
<b>II- Caractères cultureux</b> .....	9
II-1- Principaux milieux de culture utilisés .....	9
II-2- Purification des isolats .....	9
II -3- Examen microscopique .....	9
II -3-1 Coloration de Gram .....	9

II-4- Conservation des souches.....	9
<b>III- Caractérisation phénotypiques des isolats.....</b>	<b>10</b>
III-1-Tests biochimique (recherche de certains enzymes) .....	10
III-1-1- Réduction des nitrates.....	10
III-1-2-Hydrolyse de l'urée.....	10
III-1-3-Activité cellulosique.....	10
<b>Chapitre 3: Résultats et discussion</b>	
<b>I-Caractères morphologiques et cultureux.....</b>	<b>12</b>
I-1-Croissance sur YMA+ RC .....	12
I-2-Croissance sur YMA.....	12
I-3- Croissance sur GPA+BCP.....	12
I-4-Test au Bleu de Bromothymol.....	12
I-5-Coloration de Gram.....	12
<b>II-Tests biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques).....</b>	<b>13</b>
II-1- Réduction des nitrates.....	13
II-2- Recherche de l'uréase.....	13
II-3- Activité cellulosique.....	13
<b>Conclusion .....</b>	<b>14</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>15</b>

## **Annexes**

# *Introduction*

## Introduction

L'association symbiotique plante légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniacque. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux.

Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*L) ou helba est une plante herbacée annuelle ont été connus et employées pour différents buts dans des périodes antiques, particulièrement en Egypte, Algérie. Ce genre réunit environ quatre vingt espèces.

Le but de notre travail réside dans l'isolement et la caractérisation des souches bactériennes, symbiotiques et fixatrices d'azote, nodulant des espèces de légumineuses du genre *Trigonella foenum-graecum* L. Nous avons effectuées un isolement des souches à partir des nodules racinaires de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L) puis une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests biochimiques : recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase).

# **Chapitre 1**

## **Etude**

### **bibliographique**

## I-Symbiose

### 1-1-définition

Étymologiquement le terme symbiose signifie « vivre avec ». Au sens large, une symbiose implique au minimum deux organismes vivants dont l'association stable dans le temps existe sous trois aspects suivants les bénéfices retirés par l'un ou l'autre des partenaires.

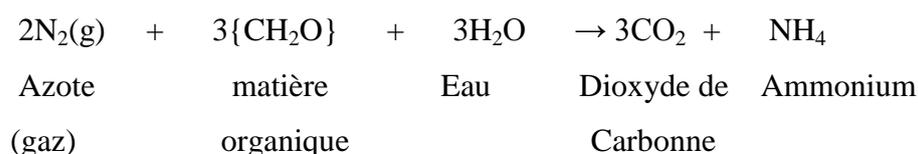
(Mbengue, 2010).

- Interaction symbiotique entre les microorganismes du sol et les plantes. association du *Rhizobium* à la racine des légumineuses.
- interaction des *Frankia*, bactéries sporulant filamenteuse avec des plantes dites actinorhizienne,
- interaction des champignons.

### I-2-La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère de l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en azote ammoniacal (NH<sub>3</sub>), cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Hopkins, 2003).

Dans cette association symbiotique, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote. Chez les légumineuses, les rhizobia s'installent dans les racines des plantes; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset, 2003). La réaction chimique type est



L'interaction symbiotique se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret *et al.*, 2000 ; Gibson *et al.*, 2008).

### **I-3- Importance de l'azote pour la plante**

L'azote est un élément essentiel pour toutes formes de vie (Cleland et Harpole, 2010), est un facteur limitant pour la croissance et le rendement des plantes. Cet élément est un composant essentiel des cellules au niveau structurel, génétique et métabolique, participant à beaucoup de processus de croissance et développement de la plante.

## **II-Rhizobia**

La biodiversité microbienne constitue une ressource naturelle énorme pour l'humanité (Longfei Zhao *et al.*, 2010), les rhizobiums sont des bactéries capables de former des nodules et établir une symbiose avec les racines ou les tiges des plantes légumineuses. Pendant le processus symbiotique, les rhizobiums sont capables de réduire l'azote atmosphérique à une forme assimilable (ammonium) directement par les plantes (Barrada et Fikri - Benbrahim, 2014).

Les *Rhizobium* sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies non sporulantes, et généralement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles (Jordan, 1984 et Werner, 1992) ces bactéries peuvent exister sous deux formes: la forme végétative que l'on trouve dans le sol et la forme bactéroïde que l'on rencontre à l'intérieur des cellules de cortex racinaire (Werner, 1992).

### **II-1-Taxonomie des rhizobia**

La première classification des rhizobia a été basée sur les tests de l'incubation croisée entre les rhizobia et leurs plantes hôtes et sur d'autres critères morphologiques et culturels (Willems, 2006 ; Barrada et Fikri – Benbrahim, 2014).

L'isolement des rhizobia associés aux légumineuses non prises en compte auparavant a souvent conduit au bouleversement de leur taxonomie. Ces modifications constantes de la taxonomie ont conduit à la recherche des critères à prendre en compte pour la description de nouveaux taxons (Barrada et Fikri – Benbrahim, 2014).

C'est ainsi que les bactériologistes ont commencé l'utilisation de la taxonomie polyphasique de prendre en compte une large gamme d'information phénotypique (caractères morphologiques, physiologiques) et génotypiques (analyse des plasmides, hybridation ADN, ADN, analyse du pourcentage en GC) (Willems 2006 ; Berrada et Fikri – Benbrahim, 2014 ; Peix *et al*, 2015).

Le changement le plus important dans la taxonomie des rhizobia est en relation avec l'introduction des techniques génétiques qui permettent l'analyse des gènes (séquençage des gènes de l'ARN, 16 S, analyse des Housekeeping gènes tels que le recA, apt D, ghn II) (Willems 2006 ; Masson-Boiviet *al* 2009 ; Berrada et Fikri – Benbrahil 2014 ; Peix *et al* 2015).

### **III-Les légumineuses**

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les angiospermes (Sperend, 1995), qui représentent la troisième famille de plante par le nombre d'espèces (Schneider *et al*, 2015).

Les Fabaceae constituent une famille de plantes comprenant 12000 espèces différentes classées selon 400 genres distincts (Hordés, 2015).

Cette famille produit des fruits en forme de gousses que l'on récolte desséchées. Ce sont : les lentilles, les fèves et haricots secs, les pois séchés ou encore le soja. Il y a d'autres fruits en forme de gousses qui sont eux récoltés avant leur maturité finale et qui ne sont pas classés dans les légumineuses. Cette différence dans leurs caractéristiques nutritionnelles fait que les légumineuses sont regroupées avec « les viandes » et substituts en raison de leurs fortes teneurs en protéines (Besançon, 2017).

#### **III-1-La légumineuse fenugrec**

Fenugrec (*Trigonella foenum graecum. L*) est une plante herbacée annuelle (Maletic

et Jevdjovic, 2007) ou de vivaces (Burnie *et al.*, 2006) de la famille des Fabaceae. Apparenté

au trèfle, ce genre réunit environ quatre-vingts espèces (Burnie *et al.*, 2006). Leur origine est

la région méditerranéenne, et aujourd'hui il pousse dans le monde entier et particulièrement

en l'Inde, l'Egypte, la Chine et l'Amérique (Burnie *et al.*, 2006).

### III-2-Morphologie de la plante

Le fenugrec est une plante annuelle de 30 à 60 cm de hauteur les feuilles sont composées par trois folioles, dentées, gris-vertes de 20 à 25 mm de longueur (MoradiKoret *al.*,2013).

Les fleurs de *Trigonella foenum-groecum* L. sont blanchâtres ou jaune pâle, les variétés sauvages et cultivés existent avec 1 à 2 fleurs axillaires, sessiles (MoradiKoret *al.*, 2013).

La gousse de 5 – 7 cm de long avec un bec persistant chaque une portante 10-20 graine qui sont petites de 5mm de long, dur et jaune brunâtre (MoradiKoret *al.*, 2013)(Figure 1).

### III-3-Taxonomie de la plante

Super- Régne : Chlorobiontes

Régne : Plante

Sous-Régne : Tracheobionta

Division : Magnolipsida

Classe : Magnolipsida

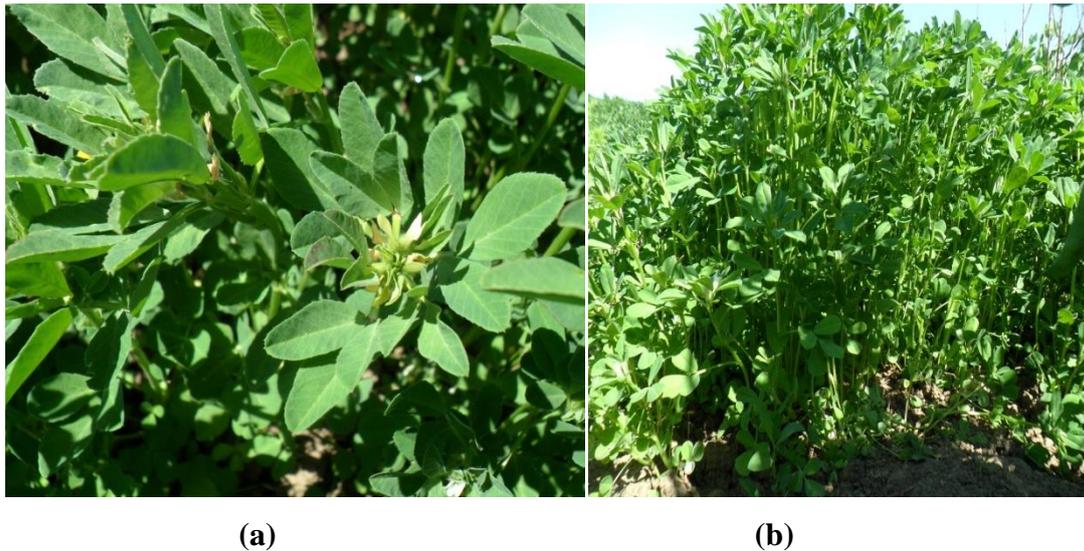
Clodus : Fobidées

Order : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonilla*

Espèce : *Trigonilla foenum-graecum* (Mehani et Segni, 2012).



**Figure 1** : (a) Trigonella fleurissante, (b) pied de Trigonella.

## **IV-Nodulation**

### **IV.1. Définition du nodule**

Le nodule(ou nodosité) est un organe différencié de la symbiose. Il abrite les symbiontes bactériens leur assure les conditions nécessaires à l'activité fixatrice d'azote et favorie les échanges nutritifs entre les deux partenaires (Gobat, 2010).

### **IV-2-Mécanisme de la nodulation**

#### **IV-2-1-Formation des bactéroïde**

La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne, enveloppe les bactéroïdes. de formes irrégulières sont plus volumineux que les bactéries libres et ne sont pas capables de se diviser (Perry *et al.*, 2004)(**Figure 2**).

#### **IV-2-2- Préinfection**

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le Rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codants pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitino-oligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation

ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca *et al.*, 2004). Les rhizobiums diffèrent dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un deuxième niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (Moschetii *et al.*, 2005).

#### **IV-2-3-L'infection**

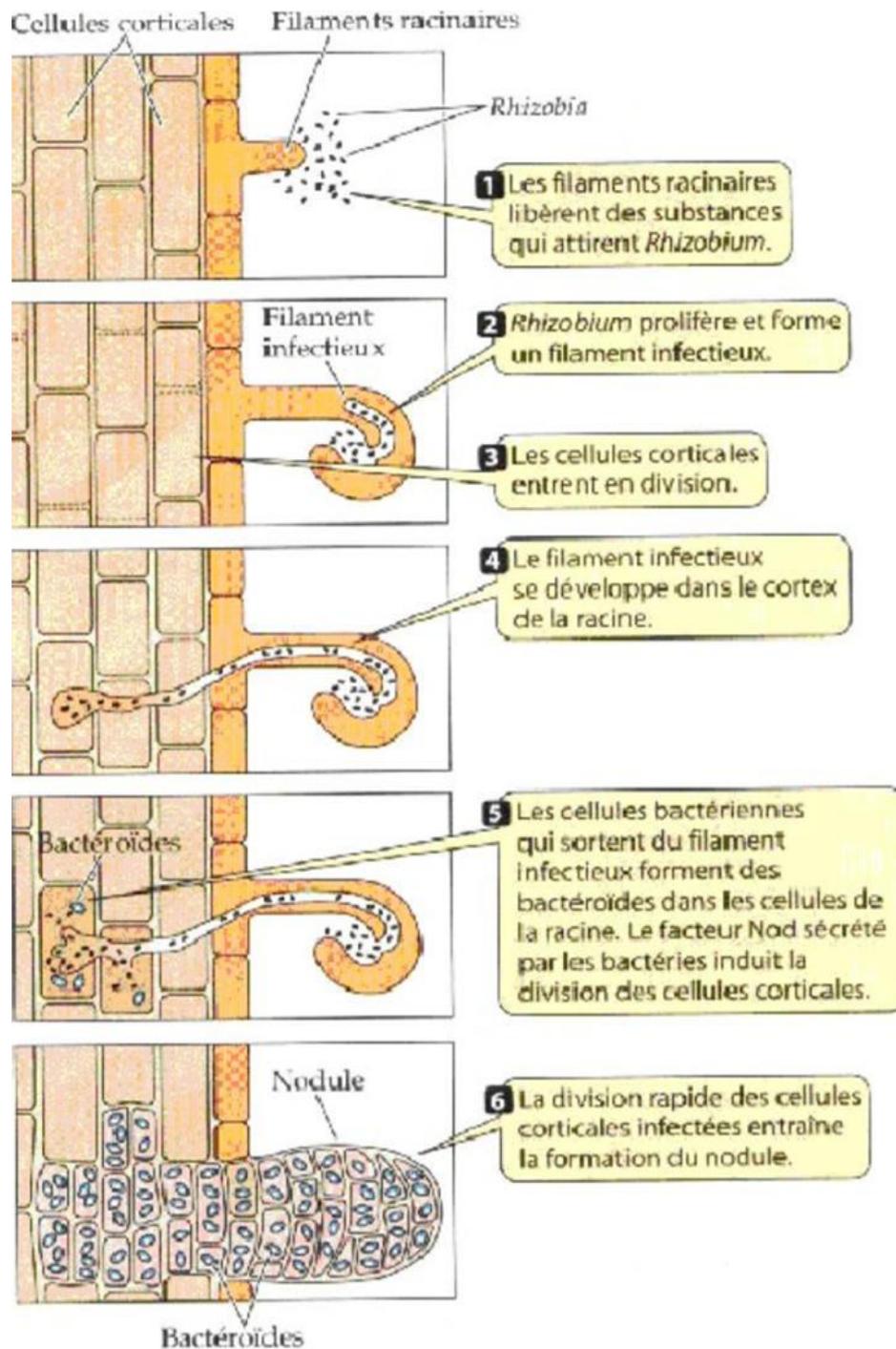
Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005).

Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité (Rasanen, 2002).

#### **IV-2-4- Développement du nodule**

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (Bélanger, 1998). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (Dupuy et Nougier, 2005).

La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivie de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001).



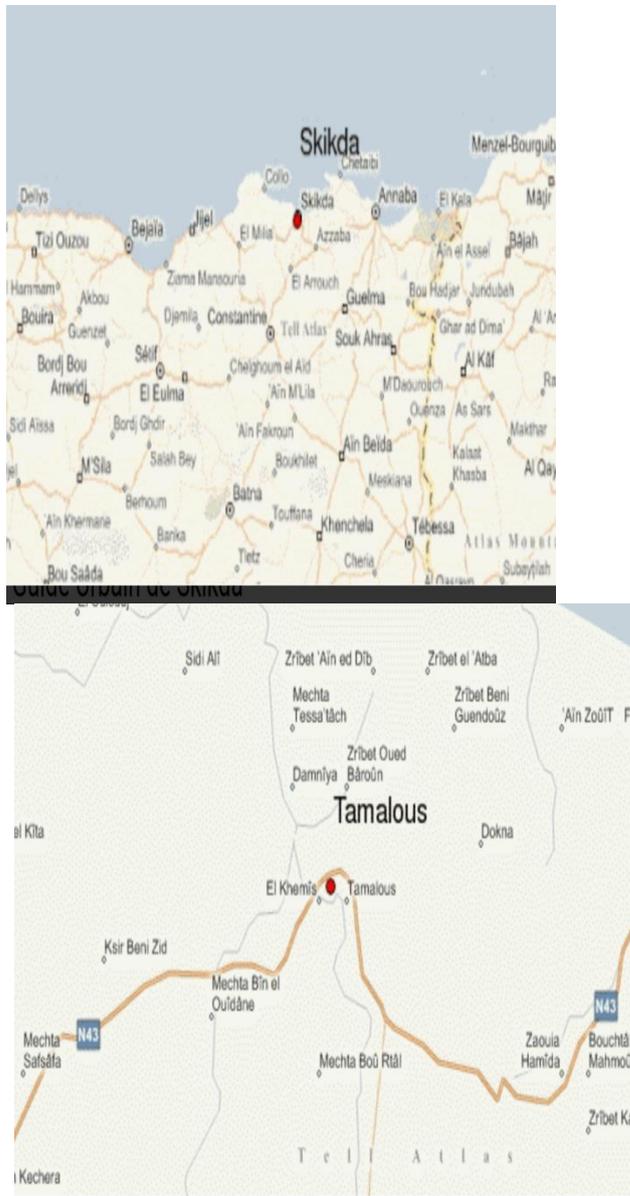
**Figure 2 :** Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

## I- Isolement des bactéries nodulant le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L)

Notre étude porte essentiellement sur la région de Bin El Ouiden Daira de Tamalous, Wilaya de Skikda (21) (latitude 36°48' 15''N et longitude 6°34' 2E)(**Carte 1**).



**Carte 1** : Localisation géographique des zones de prélèvement

### I-1-Collecte des nodules

La collecte est réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970) et Beck *et al.*,(1993).Il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire sans l'abimer.

- Se débarrasser de la terre manuellement au niveau des racines sans endommager les nodules.
- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.
- Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.

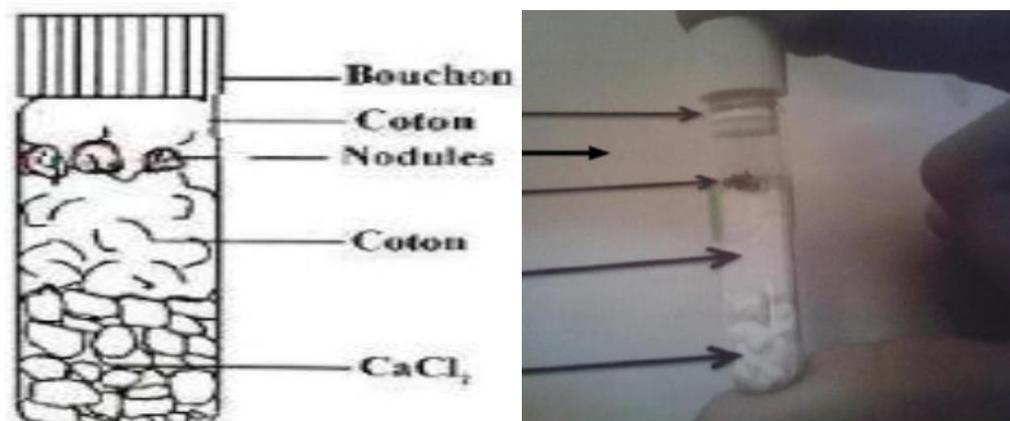
### I-2- Conservation des nodules

Les nodules formés sont rincés à l'eau puis séchés à l'aide d'un papier absorbant ensuite ils sont détachés de la racine.

Pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures. Pour une longue période de conservation, nous avons utilisé un dessiccateur spécial : le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) qui permet une longue conservation allant de 6 à 12 mois (Vincent, 1970) (**Figure 3**).

Sur chaque flacon, on doit mentionner le nom de la plante, le lieu et la date de prélèvement

(Vincent, 1970).



**Figure 3** : Conservation des nodules

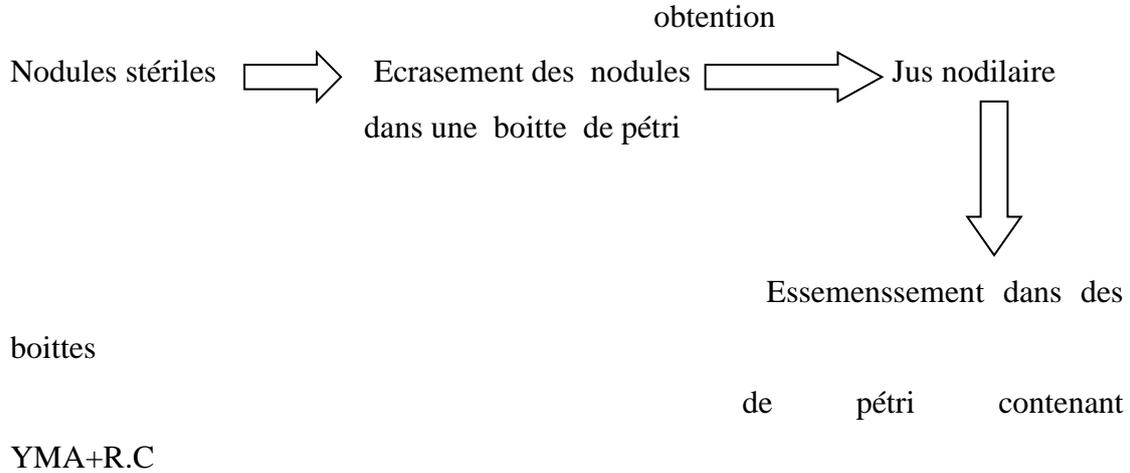
### I-3-Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau distillée au réfrigérateur toute une nuit.

Sous la hotte à flux laminaire les nodules préparés sont immergés dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes puis transférés dans une Hypochlorite de Sodium 3%

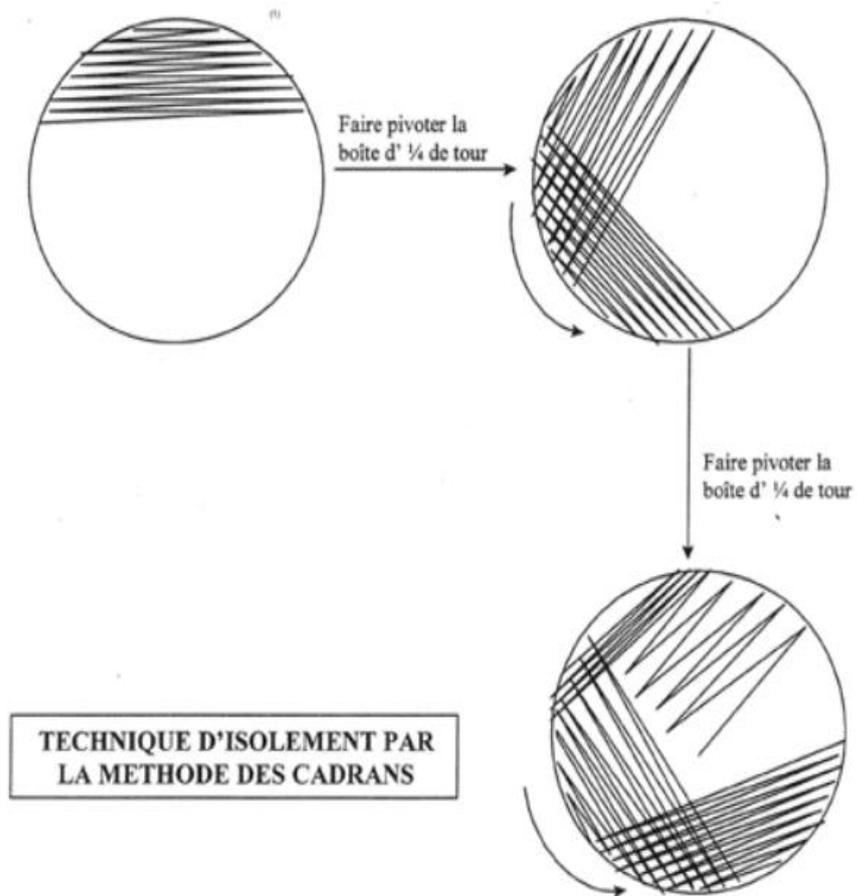
pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent J.M., 1970).

#### I-4- Isolement des bactéries



Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile, ensuite ils sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (Vincent, 1970).

Le jus nodulaire estensemencé à l'aide d'une anse de platine flambée au bec Bunsen, sur boîte de pétri contenant les milieux Yeast-Mannitol- Agar (YMA)+ rouge Congo et GPA L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées (**Figure 4**) puis les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 à 72 heures.



**Figure 4 :** Ensemencement par la technique des cadrans

## II- Caractères cultureux

### II-1- Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. (**Annex1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquide : YMB (Yeast Mannitol Broth)
- Milieu solide : YMA (Yeast Mannitol Agar)
- YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)
- YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

## **II-2- Purification des isolats**

Les colonies ayant peu ou pas absorbés le rouge Congo et reconnaissables par leur aspect translucide, sont isolées et purifiées par des repiquages successifs sur milieu YMA jusqu'à l'obtention des isolats purs.

## **II -3- Examen microscopique**

### **II-3-1 Coloration de Gram**

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries d'après leur affinité pour les colorants. A à cet effet nous avons examiné les souches isolées par la technique classique (**Annex2**).

### **II-4- Conservation des souches**

Avant de conserver les souches, elles sont ensemencées dans des tubes contenant 9mlde bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h avec agitation à 30°C.

Les isolats purs sont conservés à 4°C dans des tubes inclinés contenant le milieu YMA+ CaCO<sub>3</sub> (2%) (**Annex1**) comme agent neutralisant de l'acidité.

Les souches sont incubées à 30°C pendant 3 jours.

## **III- Caractérisation phénotypiques des isolats**

### **III-1-Tests biochimique (recherche de certains enzymes)**

#### **III-1-1- Réduction des nitrates**

Les bactéries sont mises en culture sur bouillon Tryptone-Yeast (TY) (Annexe1)contenant 0,1% de KNO<sub>3</sub> (p /v) et incubés à 28°C pendant 4 jours ; après

incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate I (Acide sulfanilique (3%) dans l'acide acétique (5M)) et nitrate II (naphtylamine dans l'acide acétique). Une réaction positive se traduit par une coloration rose ou rouge du milieu. Si le milieu reste incolore, on ajoute un peu de poudre de zinc. Si le milieu devient donc rose ou rouge, il indique l'absence du nitrate réductase (NR-), si le milieu reste toujours incolore, il indique la présence d'un nitrate réductase.

### **III-1-2-Hydrolyse de l'urée**

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase. Les souches sont cultivées sur milieu YMA (**annexe 1**), contenant 2% d'urée (p/v) et 0.012 g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans urée est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0,45 µm) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubé à 28°C pendant 48 heures.

### **III-1-3-Activité cellulosique**

Les souches sont mises en culture pendant 5 jours sur le milieu YMA contenant 0,25% de CMC. Après incubation à 28°C. Les colonies issues de ce milieu sont rincées de licatement à l'eau courante. Les boîtes sont remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve à 28°C. La solution colorante est remplacées par une solution de NaCl 1M, et les boîtes sont laissées à une température ambiante pendant 30 minutes puis vidées de cette solution.

Si les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orange, on note la présence de l'enzyme endoglucanase chez les souches.

# Chapitre 3

Résultats et discussion

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les rhizobiums, la base de la description formelle. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005).

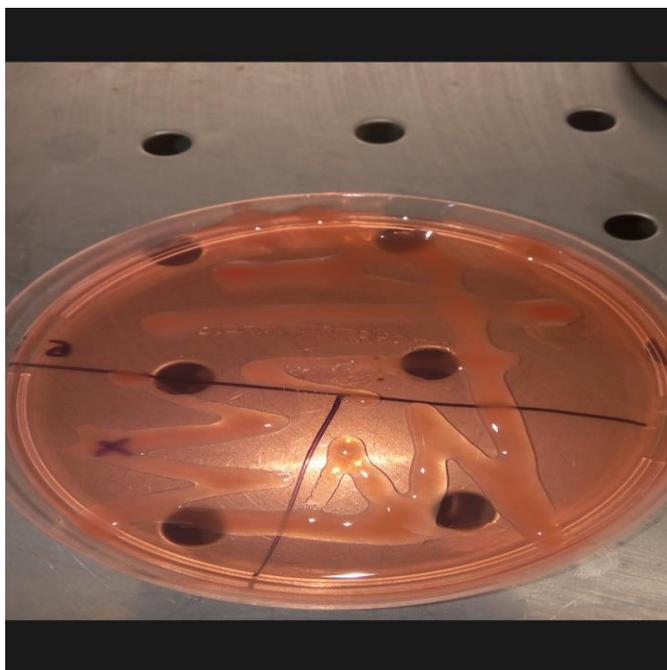
Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *Trigonella foenum-graecum L.*, nous avons tenu compte de 8 isolats : N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8.

## **I-Caractères morphologiques et cultureux**

### **I-1-Croissance sur YMA+ RC**

La croissance des souches sur milieu YMA gélosé additionné de rouge Congo, suggère que les souches sont pures car elles n'ont pas absorbé le colorant (**figure 5**). Ce critère a été observé depuis longtemps chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

Nos isolats après 24 à 48 heures, donne des colonies lisses, visqueuses qui absorbent peu ou pas le rouge de Congo avec une surface lisse et bombée.



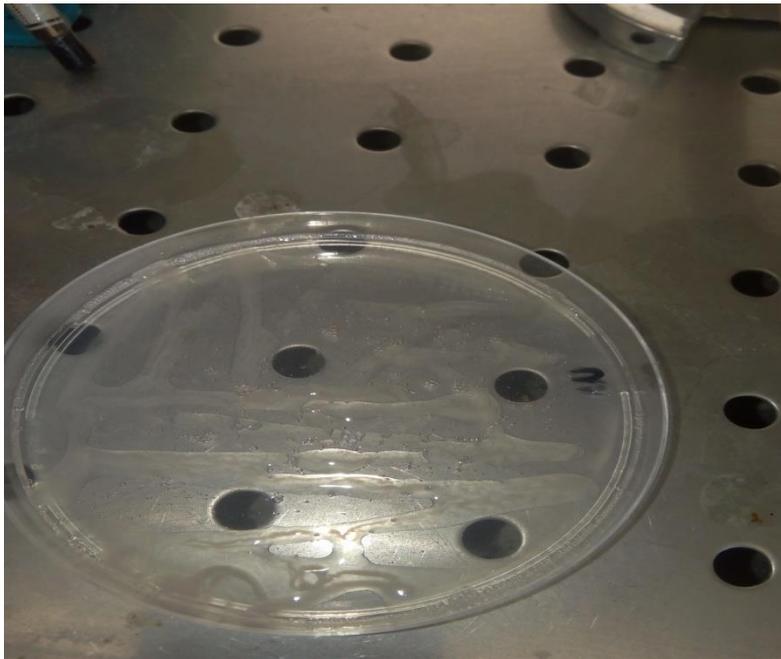
**Figure 5 :** Croissance sur milieu YMA+ RC

## I-2-Croissance sur YMA

Au bout de 24 à 48 heures, les colonies des isolats N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 sur le milieu YMA ont une croissance très importante, une surface bombée et lisse. Elles sont visqueuses et brillantes, avec une texture homogène (**Figure 6**).

Le genre *Rhizobium* est caractérisé par des colonies qui sont généralement visibles en 48 heures elles ont une croissance rapide. Les colonies sont blanches ou beiges, circulaires, convexes, semi-translucides ou opaques, élevées et mucilagineuses (Howieson et al. ,2016).

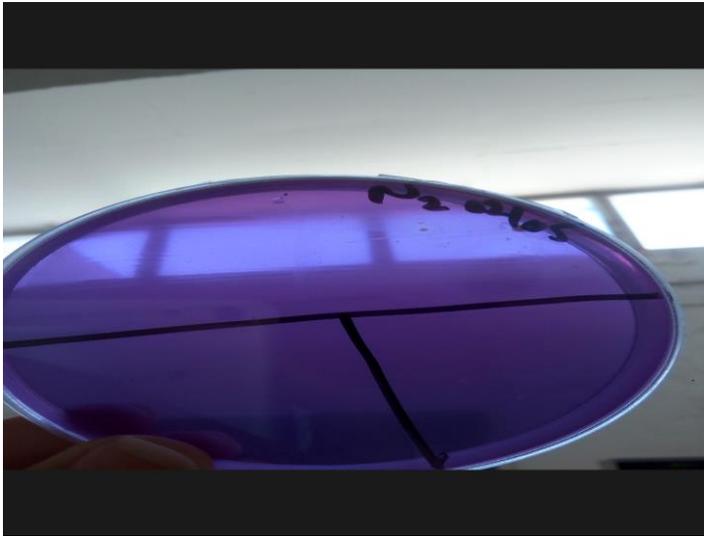
Selon Upchurch et Elkan (1977), Bekki (1992), Zahran et al., (1994), la viscosité des colonies est due à une production massive d'exopolysaccharides qui peuvent avoir un rôle dans la tolérance des souches à la salinité.



**Figure 6** : Croissance sur milieu YMA

### I-3- Croissance sur GPA+BCP

Le développement des bactéries se fait sans acidification du milieu après 24 heures (figure 7).



**Figure 7 :** Croissance sur milieu GPA

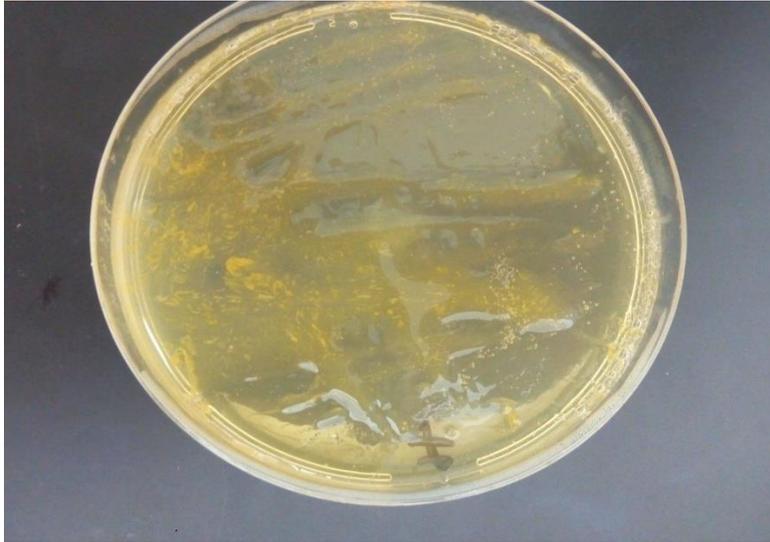
### I-4-Test au Bleu de Bromothymol (Vitesse de croissance)

Le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique. On observe un virage de couleur du vert vers le jaune pour les isolats N3, N8 après 24heureset 48 heures pour N1, N2, N4, N5, N6, N7 (figure 8).

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984, Beck et *al*, 1993, Pagano, 2008).

Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali., 2006).

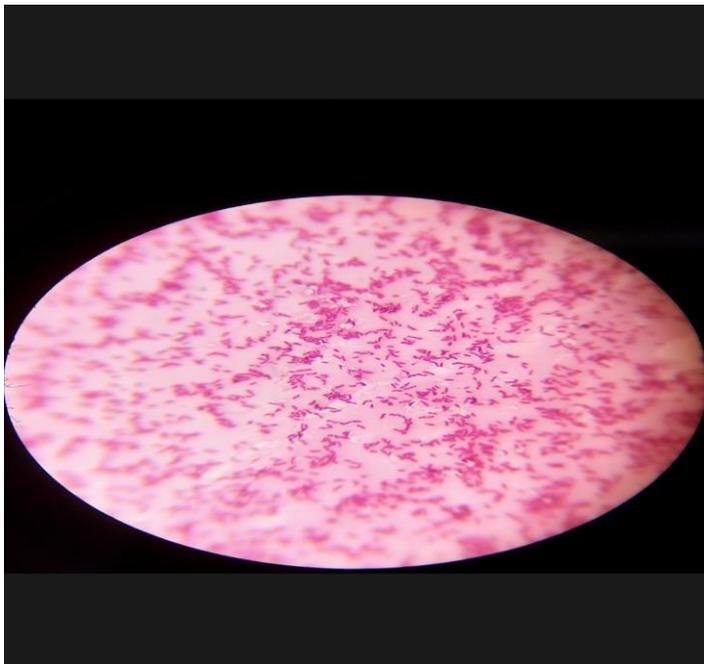
Le changement de pH sur le milieu (avec indicateur bleu de bromthymol) causé par le métabolisme rhizobial. Les souches ont acidifié le milieu, en le tournant du jaune (Howieson et *al*., 2016).



**Figure 8:** Résultat du test au bleu de bromothymol

### **I-5-Coloration de Gram**

L'observation microscopique montre des cellules de forme petite bacille à Gram négatif (**figure 9**). Ces caractères morphologiques observés sont en accord avec ceux décrits pour des rhizobiums (Vincent, 1970 ; Dommergues et Mangenot, 1970 ; Jordan, 1984 ; De Lajudietal., 1994 ; Rome *et al.*, 1996).



**Figure 9:** Coloration de Gram observées sous microscope (G×100)

## II-Tests biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

### II-1- Réduction des nitrates

Les souches N2, N5, N6, N7 réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase, sauf la souche N3 qui a donné une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc, il y a une apparition d'une couleur rougeâtre et les autres N1, N4, N8 restants incolores (**Figure 10**).

L'addition des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu au rouge, ce qui indique que le nitrate a été réduit en nitrite.

Si le milieu est toujours inchangé, et pour vérifier la présence de nitrate dans le milieu ou non, on ajoute une pincée de poudre de zinc, après quelques minutes : une apparition d'une teinte rouge signifiant la présence des ions nitrate dans le milieu et donc c'est un résultat négatif ou bien l'absence de la coloration rouge signifie que la dénitrification a eu lieu et de l'ammoniac ou de l'azote moléculaire ont été formés et donc l'absence des ions nitrates dans le milieu, ce qui indique un résultat positif.

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (El-Hilali, 2006).

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et al, 2006).

Lucinski et al, (2002) montre que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme sont localisées dans les bactéroïdes.



(a)

(b)

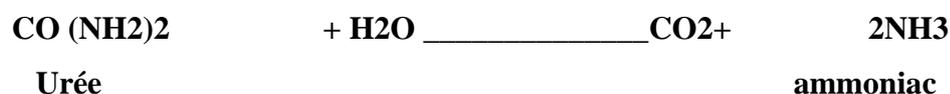
**Figure 10:** (a) resultat negatif, (b) resultat positif

## II-2- Recherche de l'uréase

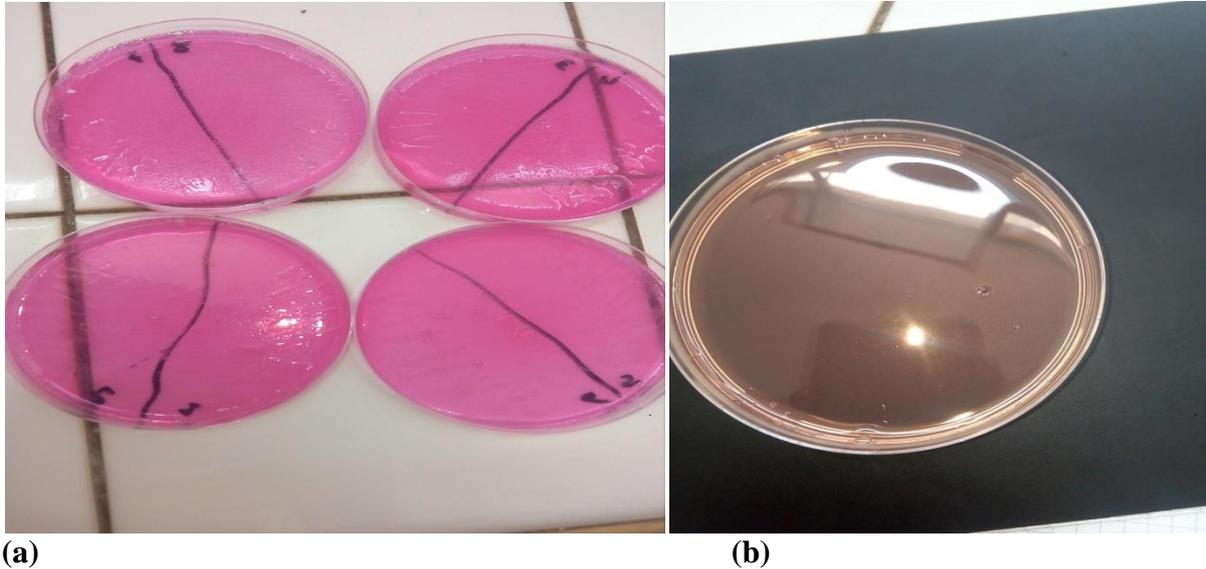
Ce test permet de mettre en évidence la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée grâce à l'uréase, en utilisant le Rouge de Phénol comme indicateur de pH. Après l'incubation des boîtes pendant 48 heures nous avons observé qu'il y a un virage de couleur vers le rose pour tous les isolats, c'est-à-dire alcalinisation du milieu (uréase+). Donc nos souches ont l'enzyme d'uréase (**Figure 11**).

L'enzyme peut être «constitutive», c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme sera révélée rapidement (quelque minute à deux heures). Pour d'autres bactéries, la synthèse est induite par l'urée et la révélation peut donc demander plus de temps (Joffinet *al*, 2006).

Le milieu contient de l'urée, et si la bactérie produit de l'uréase ceci va provoquer une alcalinisation du milieu. L'alcalinisation va faire virer l'indicateur coloré vers le rose (Bibirou, 2016). Ce qui indique l'alcalinisation du milieu par conséquent la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction suit :



La capacité de l'hydrolyse de l'urée par les rhizobia a été mise en évidence par les travaux de Jarvis et *al.*, (1977) en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH.



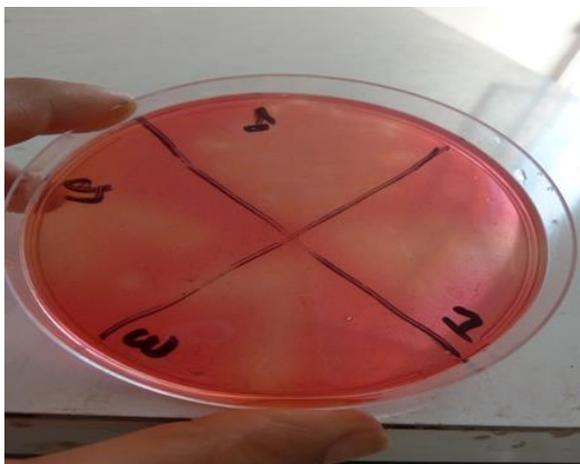
**Figure 11 :** (a) Test de l'Uréase positive, (b) la couleur initiale du milieu

### II-3- Activité cellulosique

Pour nos isolats nous observons un halo jaune orange autour des colonies, ce qui met en évidence l'activité cellulolytique (**Figure 12**).

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

On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture (Howieson et *al.*, 2016).



**Figure 12:** Activité cellulosique chez les isolats

José *et al.*, (2001) confirment la présence de l'activité cellulolytique chez toutes les microsymbiontes appartenant au *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Baumberger *et al.* (2002) ont confirmé que l'activité de la cellulase est trouvée chez plusieurs espèces rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, et les différentes souches du *R. leguminosarum*.

D'autres auteurs ont montré que le *Rhizobium* produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales et facilite aux rhizobium de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992).

# CONCLUSION

## **conclusion**

L'association symbiotique fixatrice d'azote sont très diversifiées et les plus connues sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses.

Dans notre étude nous avons mis en évidence le contenu nodulaire de type de légumineuse de l'espèce *Trigonella foenum-graecum*L. Prélevées à partir de région de Bin El Ouiden Daira de Tamalouse, Wilaya Skikda.

L'aspect morphologique des 8 isolats sur les différents milieux de culture montre qu'ils ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol, une faible absorption de rouge de Congo.

L'examen microscopique des cellules bactériennes des isolats donne des bactéries de forme bacillaire à Gram négatif.

Les études phénotypiques, notamment la morphologie des colonies sur YMA, GPA, la vitesse de croissance, et la présence des enzymes spécifique au processus de nodulation, nous font supposes que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium*.

Les tests biochimiques ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats.

*Références  
bibliographiques*

- Baldani J.I., et Baldani V.L.D., 2005:** History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Brass. Sci, 77: 549- 579.
- Baumberg I.C., Fraefel N., Gottfert M., Hennecke H., 2002:** New Nodw-or Nifaregulated Brady rhizobium japonicum Genes. The American Phytopathological Society. MPMI Vol.16, No.4, 2003: 342-351.
- Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993:** *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*. ICARDA. Syria
- Bekki A., 1983 :** *contribution à l'étude de quelque espèce de luzerne et leur symbiote dans un environnement salé*. des biologie végétale. Oran. Université d'Oran : 48
- Berrada H et Fikri – Benbrahim K., 2014 :** Taxonomy of the Rhizobia : Current Perspectives . British Microbiology Research Journal, u (6): 616 – 639.
- Besançon S., 2017 :** Les légumineuses, France.
- Bibirou., 2016:** tests utilisés en bactériologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.
- Bélanger E., 1998 :** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp. (Oxytropis Arctobla)* souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.
- Cleland E.E., Harpole W.S., 2010:** Nitrogen enrichment and plant communities. Ann N Y Acad Sci, 1195: 46 – 61.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K., and Gillis M., 1994:** " Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus Sinorhizobium and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov". Int J Syst Bacteriol, 44 (4): 715-733.
- Dénarié J.,** Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Domergues Y and Mangenot B., 1970:** Ecologie microbienne du sol: (Ed). Masson et Cie Paris: 796
- Dupuy Y., et Nougier P., 2005 :** Les micro-organismes du gène à la biosphère. Ed. Ellipses. Paris : 256.

- El-Hilali I., 2006:** *La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agadar. Rabat. Maroc
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C., 2008 :** Molecular determinants of a chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42: 413-441.
- **Gobat J. M., M Aragno., WRagnoMatthey., 2010:** Le sol vivant : Bases de pédagogie des sols. 3<sup>ème</sup> édition presse polytechniques et universitaires romandes (PPUR) : 695.
- **Hopkins W.G., 2003 :** Physiologie végétale, université des sciences et technologies de Lille. Edition de boeck.
- Hordé P., 2015 :** Fabaceae – Définition, Journal des femmes santé, France.
- Howieson J.G., et Dilworth M.J ., 2016:** Working with *Rhizobia*; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale: 312.
- Jarvis B. D. W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S. M., Fernandez M.P., Cleyet-Marrel J. C., et Gillis M., 1997 :** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47: 895-898.
- Joffin J.N et le yral G., 2006 :** Microbiologie technique, Tome 1 : dictionnaire des techniques, 4<sup>ème</sup> édition CRDP d'aquitaine.
- Jordan D.C., 1984:** *Rhizobiaceae*. In N. R. Krieg and J.G. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1 the Williams & Wilkins, Co., Baltimore: 234-245.
- José M., Igual L., Velázquez E., Mateos P.F., Rodríguez-Barrueco C., Cervantes E., Martínez Molina E., 2001 :** Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups.
- Lindström K And S Lehtomäki., 1988:** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett*, 50: 277-287

- **Longfei Zhao., Zhenshan Deng., Wenquan Yang., Ying Cao. Entao Wang., Gehong Wei., 2010:** Diverse rhizobia associated with *sophoraalopecuroides* grown in different regions of loess Plateau in China.

-**Lucinski R., Polcyn W., Rotayczakl., 2002:** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* lgumes. *ActaBiochimiaPolonia*, 49(2): 537-546

-**Machrafi Y., 2001:** Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides

Phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

- **Masson – Boivin C., Giraud E., Perret. X., BatutJ., 2009:** Establishing nitrogen – fixing symbiosis with legumes. *Trends in Microbiology*, 17(10) : 458 – 466

-**Mateos P.F., Jiménez-Zurdo J.L., Chen J.A.S., Squartini S.K., Haack E.M., Molina D.H., Hubbell F., et Dazzo B., 1992 :**Cell-associatedpectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarumbvtrifolii*.*Appl Environ Microbiol*, 58 (6) : 1816-1822.

-**Mbengue M., 2010 :** Perception et transduction du signal bacterien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium légumineuse : recherché et caractérisation de partenaires du Lys MRLK L Y K3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Médicagotrancatuel* thèse de doctorat en Biosciences végétales. Université Toulouse III. Paul Sabatier.

-**MehaniM ., Segni L .,2012 :**Antimicrobial Effect of Essential oil of plant *Trigonella foenum-graecum* on some Bacteria Pathogens .*Word Academy of Science Engineering and Technology*, 69 : 358-360.

-**MoschettiG., A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., and DefezR., 2005 :** Use of nodulation patten, stress tolerance, nodC amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarumbiovarviciae*. *SystApplMicrobiol*, 28: 619-631.

- **MoradiKor N., Didarshetalon M.B., Saeid H.R., 2013:** Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) as a valable medicinal plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical research*, 1(8): 922 -931.

- Pagano M.C., 2008** : *Rhizobia* associated with neotropical tree *Centropogon tomentosus* used in riparian restoration Plant Soil Environ, 54 (11) :498-508.
- Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004** : Organo genesis of legume root nodules. Int Rev Cytol : 62- 201.
- Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez E., Bedmar E.J., 2015**: Bacterial associations with legumes. CRC crit rev in Plant Sci, 34 : 17 -42
- Perret X., Staehelin C., and Broughton W.J., 2000**: Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev, 64: 180-201.
- Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004**: Microbiologie. Edition Dunod, Paris.
- Pousset J., 2003** : Engrais verts et fertilité des sols. 2ème Edition Agri décisions, Paris.
- Räsänen L.A., 2002** : Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between *Rhizobia* and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.
- Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P., and Cleyet-Marel J.C., 1996**: "Sinorhizobium medicae sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp". Int J Syst Bacteriol, 46 (4): 972-980.
- Schneider A., 2015** : les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaire durables ; édition quae, France.
- Singh B., Kaur R., Singh K., 2008**: characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) .African Journal of biotechnology, 7(20): 3671-3676.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994** : Handbook for *Rhizobia*. Springer verlage New York. Inc: 450.
- Sprent J. I., 1995**: Legume trees and Shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. Soil Biol Biochem, 27: 401 – 407.

- Upchurch R.G., and Elkan G. H., 1977:** Comparison of colony morphology, salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. Can. J. Microbiol., 23: 1118-1122.
- Vincent J.M., 1970:** A manual for a practical study of root nodule bacteria. I. B. P, Handbook n° 15, Blackwell (Ed). Oxford. Edingbough: 164.
- Werner D., 1992 :** Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.
- **Willems A., 2006:** the taxonomy of rhizobia: an overview. Plant soil, 287 : 3-14
- Zahran H.H., 1999:** Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Appl. Environ. Microbiol, 63: 968-989.

# *Annexes*

## **Annexe1**

### **Milieux de culture et solutions utilisés**

#### **Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)**

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

#### **Composition de milieu YMA**

YMB	1000ml
Agar	18g
PH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

#### **Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l**

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18g
pH	6.8

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

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### **Composition de milieu YMA + Bleu de Bromothymol en g/l**

YMB 1000ml

Solution stock de bleu de bromothymol 5ml

Agar 15g

pH 6.8

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### **Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + Pourpre de Bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).**

Glucose 10

Peptone 5

Solution stock de pourpre de bromocrésol 10ml

Agar 18

pH 6.8

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### **Composition de milieu TY**

Tryptone 5g

Extrait de levure 3g

CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O 0,87g

Agar 18g

pH 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

## **Annexe 2**

### **La Coloration de Gram**

- préparer un frottis sur une lame,
- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute,
- verser sur la lame la solution iodée (lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- décolorer la lame par l'éthanol 95° + Acétone en laissant tomber goutte à goutte.
- rincer bien avec l'eau.
- recouvrir la lame par la fuschine et laisser agir pendant 1 minute
- rincer à l'eau distillée.
- observer au microscope optique (Gx100).

**Caractérisation biochimique des bactéries nodulants  
la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en écologie microbienne

**Résumé**

Ce travail a été réalisé sur huit souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Trigonella foenum-graecum* L. ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers l'étude des caractères cultureux et biochimiques.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'avoir des colonies homogène, une surface bombée, des bacilles à Gram négatif, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests biochimiques.

Les tests biochimiques effectués sont : réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée, activité cellulolique qui ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats.

**Mots clés :** *Trigonella foenum-graecum* L, caractérisation, isolats

**Laboratoire de recherche :** laboratoire 9

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mr *Benhizia Yacine* (Professeur - UFM Constantine),  
**Rapporteur :** Mr *Chabbi Rabah* (M.A.A - UFM Constantine),  
**Examineur :** Mme *Bouzeraib Latifa* (M.A.A - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 27/06/2018