

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Option : Microbiologie Fondamentale



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

Solubilisation du phosphore chez les Rhizobiums.

Présenté par :

M^{elle} BELGUIDOUM Narimene

M^{elle} OUBOUZID Radhia

Soutenue le : **21 septembre 2021**

Devant le jury composé de :

M ^r ADJEBLI Ahmed	MCB	Président
M ^r BELHADI Djellali	MCA	Promoteur
M ^r LADJOUZI Rachid	MAA	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Tout d'abord on remercie le bon Dieu tout puissant qui nous a donné la volonté et la patience d'accomplir ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à notre promoteur Mr BELHADI Djelalli, qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience, sa bienveillance et ses conseils.

Nous tenons également à remercier les membres de jury : Mr ADJEBLI et Mr LADJOUZI pour l'évaluation de ce travail

Nous tenons aussi à remercier Mr HAMMACHE Amir pour l'aide qu'il nous a apportée

A toutes personnes intervenant de près et de loin par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé nos réflexions et qui ont accepté à répondre à nos questions durant notre recherche.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère, qui n'a jamais cessé de prier pour
moi

A mon très cher père, pour ses encouragements son
soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que
rien n'entrave le déroulement de mes études.

À mes chers frères Hamid et Amine : Mes chers frères,
présents à chaque instant. Je vous souhaite un avenir
plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. A ma
très chère sœur : Yasmine d'avoir toujours été à mes
côtés et m'encourager et de m'avoir aidé avec ces
précieux conseils

A mon beau frère

A ma tante Karima et son cher époux

A mes cousins en particulier Badre din ; Chirez ; Ferial ;
Amel et son époux

A mes meilleures amies Sarah et Yasmine

Et à tous ceux qui me sont très chers et m'ont aidé de
près ou de loin a réaliser ce travail.

Narimene

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents pour leur soutien, leur patience, leur encouragement durant mon parcours scolaire.

A mes sœurs

A mon cher MEHDI pour son aide et son soutien

A tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom OOBOUZID, je dédie ce travail a tous ceux qui ont participé à ma réussite.

Radhia

Liste des abréviations

FAO: Food and Agriculture Organization.

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

PGPB: Plant Growth-Promoting Bacteria

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

PSM : Phosphate Solubilizing Microorganisme.

PSB : Phosphate solubilizing Bacteria.

PQQ : Pyrroloquinoléine Quinone.

GDH : Glucoses Déshydrogénases.

HAP : Histidine Acid Phosphatase .

BPP : Phytasesp-propeller.

CP : Cystéines Phosphatases.

PAP : Phosphatases Acides Pourpres.

YMA : Yeast Mannitol Agar.

PVK : Pikovskaya.

NBRIY: Nautiyal.

YMB: Yeast Extract MannitolBrowth

Sommaire

<u>Liste des abréviations</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Liste des figures</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Liste des tableaux</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Introduction</u>	Erreur ! Signet non défini.

Partie I :

Revue bibliographique

<u>I. Microorganismes promoteurs de la croissance des plantes</u>	4
<u>I.1. La rhizosphère</u>	4
<u>I.1.1. Activité de la rhizosphère</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>I.1.2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>II. Mécanismes d'action des PGPR</u>	8
<u>II.1. Fixation de l'azote</u>	9
<u>II.2. La solubilisation du phosphore</u>	10
<u>II.2.1. Les microorganismes solubilisant le phosphore</u>	12
<u>II.2.2. Mécanisme de solubilisation du phosphore</u>	13
<u>II.3. Production d'acide indole acétique</u>	16
<u>II.4. Production des sidérophores</u>	17

Partie II : Etude expérimentale

Matériel et Méthodes

<u>1. Matériel biologique</u>	18
<u>2. Criblage des isolats solubilisant le phosphore</u>	18
<u>3. Recherche des conditions optimales pour la solubilisation du phosphate</u>	19
<u>3.1. Effet des différents milieux de culture</u>	19
<u>3.2. Effet de la source de carbone</u>	19

<u>3.3.Effet du glucose à différentes concentrations</u>	20
<u>3.4.Effet de la source d'azote</u>	20
<u>3.5.Evaluation de la solubilisation du phosphate après reconstitution d'un milieu optimal</u>	20

Résultats et discussion

<u>1. Criblage des isolats solubilisant le phosphore</u>	21
<u>2. Optimisation de la solubilisation du phosphore</u>	21
<u>3. Recherche des conditions optimales pour la solubilisation du phosphate</u>	23
<u>3.1.Effet du glucose a différentes concentrations</u>	23
<u>3.2. Effet de la source de carbone</u>	25
<u>3.3.Effet de la source d'azote</u>	26
<u>3.4.Evaluation de la solubilisation du phosphate après reconstitution d'un milieu optimal</u>	27
<u>Conclusion</u>	28

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère.....	5
Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de solubilisation, minéralisation et immobilisation du phosphore dans le sol avec les PSM.....	17
Figure 3 : Mise en évidence de la solubilisation du phosphore sur les milieux PVK (a et c) et NBRIY (b et d) chez l'isolat 2-1L3a ensemencée par touche (a et b) et en spot (c et d).....	22
Figure 4 : Illustration de l'effet des concentrations en glucose sur la solubilisation du phosphore (cas de l'isolat 2-1L3a).....	25
Figure 5 : Effet des différentes sources d'azote sur les deux isolats SSN2d et de Vsat 1LC2	26
Figure 6 : Solubilisation du phosphore en présence de la tyrosine pour l'isolats SSN2d et Vsat1LC2.....	27

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mécanismes d'action direct des PGPR	8
Tableau 2 : Isolats utilisées pour le criblage.....	18
Tableau 3 : Résultats du criblage d'isolats ayant une activité de solubilisation du phosphore	21
Tableau 4 : Solubilisation du phosphore sur les milieux PVK et NBRIY	23
Tableau 5 : Evaluation de la solubilisation du phosphore	24

Introduction

L'alimentation est centrale dans toute société humaine en raison de sa nécessité biologique et du rôle charnière qu'elle joue dans la vie sociale et culturelle (Gutmann, 2002 dans Rochette, Annie, 2004) dans la sécurité alimentaire. Elle est assurée quand la disponibilité alimentaire est économiquement et physiquement suffisante pour toute personne et à tout temps pour mener à une vie active et saine (FAO, Rome 1996).

Pour une bonne productivité agricole, le travail du sol et la fertilisation revêtent une importance capitale. En effet, un bon développement racinaire des cultures est un facteur essentiel de leur bonne productivité et leur tolérance aux aléas climatiques (Maertens, 1964 ; Chopart et Nicou, 1976). Afin d'améliorer le rendement des cultures et les propriétés des sols, la fertilisation minérale consiste à utiliser les engrais chimiques car ils fournissent à partir d'une source directe, les éléments nutritifs nécessaires à la croissance de la plante (Morel, 1989). La fertilisation du sol se réalise par l'ajout des formes nutritives organiques ou inorganiques, permettant alors de redonner au sol ce qu'il a perdu des exportations minérales par les plantes, elle améliore par le drainage et irrigation la structure du sol (Baldi et al. 2015). La fertilisation doit être intégrée pour bien utiliser chaque type d'engrais et parvenir à une gestion équilibrée des nutriments pour la croissance des cultures (Jen-Hshuan, 2006). L'utilisation des engrais chimiques et organiques a des avantages et inconvénients sur l'approvisionnement en éléments nutritifs et sur la productivité des cultures (Kaur, 2006). Elle présente également un effet sur l'environnement, le consommateur et leur inefficacité sur la fertilité des sols. De plus leur prix élevé rend obligatoire la recherche d'une solution moins risquée (Mouria et Allal, 2010). Les fertilisants biologiques ont été suggérés comme alternative aux produits chimiques (Joshi et al, 2009). Ils font intervenir des microorganismes qualifiés pour améliorer la reproductivité et la nutrition des plantes par leurs interactions dans la rhizosphère. Ils accélèrent certains processus microbiens dans le sol et augmentent la disponibilité des nutriments à absorption facile par les plantes (Anonyme, 2008).

L'utilisation des micro-organismes de la rhizosphère est le meilleur moyen biologique pour améliorer la solubilisation du phosphate dans le sol et fournir des quantités suffisantes pour la nutrition des plantes (Pradhan et Sukla 2005; Singh et al., 2011). La capacité de certains micro-organismes à transformer le phosphate insoluble sous une forme accessible est une caractéristique fondamentale pour les PGPR (Kucey et al., 1989).

Dans le sol, le phosphore est classé selon la nature des composés phosphorés, le fractionnement chimique et l'échange ionique. Les plantes n'ont pas la capacité d'absorber le phosphore inorganique insoluble, qui se trouve dans les sols plus précisément dans les complexes minéraux insolubles tels que le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), le phosphate de fer (FePO_4) et le phosphate d'aluminium (AlPO_4) (Khan et al., 2014). Seuls 0,1% du phosphore total se trouve sous forme soluble et disponible pour la nutrition des plantes (Chen et al., 2006).

Le phosphore inorganique sous différentes formes est solubilisé par des bactéries (BSP) qui font partie des rhizobactéries et qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) (Khan et al., 2010). Ces microorganismes multifonctionnels permettent d'assurer la disponibilité du phosphore pour les plantes par solubilisation des phosphates précipités (Kucey et al., 1989 ; Pradhan et al., 2005). Il existe des bactéries qui solubilisent le phosphore et possédant la capacité de synthétiser une enzyme clé, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase (Glick, 2014), de fixer l'azote atmosphérique (Anand et al. 2016) et aussi sécréter des antibiotiques et fournir une protection pour les plantes contre les maladies d'origine tellurique (biocontrôle) (Singh et al. 2010). Ainsi, d'autres activités physiologiques permettent la libération de cyanure d'hydrogène, qui a un avantage pour les souches productrices et aussi la sélection et la croissance des souches PGPR (Badawi et al., 2011).

Ce mémoire est structuré en deux parties: la première traite les généralités sur les microorganismes promoteurs de la croissance des plantes et les mécanismes d'action des PGPR, la deuxième partie présente le matériel et les méthodes suivies, et la présentation de ces résultats et leur discussion, enfin une conclusion.

Partie I
Revue bibliographique

I. Microorganismes promoteurs de la croissance des plantes

I.1. La rhizosphère

Le terme « rhizosphère » est dérivé du mot grec « rhiza », qui signifie racine, et « sphère », qui signifie champ d'influence. Elle a été définie pour la première fois par le scientifique allemand Hiltner (1904) comme « la zone de sol immédiatement adjacente aux racines des légumineuses qui supporte des niveaux élevés d'activité bactérienne ». Cependant, au fil du temps, il a été redéfini à plusieurs reprises pour inclure le volume de sol influencé par la racine et des parties de tissus racinaires ainsi que le sol entourant la racine dans lequel les propriétés physiques, chimiques et biologiques ont été modifiées par la racine. croissance et activité (Pinton et al. 2001). La rhizosphère a été largement subdivisée en les trois zones suivantes (Clark 1949; Lynch 1987; Pinton et al. 2001)

1. Endorhizosphère : qui se compose du tissu racinaire comprenant l'endoderme et les couches corticales.
2. Rhizoplan : c'est la surface racinaire où adhèrent les particules du sol et les microbes. Il se compose d'épiderme, de cortex et d'une couche de polysaccharide mucilagineux.
3. Ectorhizosphère : c'est-à-dire le sol immédiatement adjacent à la racine.

La rhizosphère est donc un environnement particulier où les flux de matière et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses. La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance, induisant ainsi des modifications importantes du potentiel de l'eau et des concentrations ioniques du sol rhizosphérique. En outre, les échanges ioniques et gazeux entre les racines des végétaux et le sol contribuent à modifier de façon notable le pH, le potentiel d'oxydo-réduction de la rhizosphère et, par suite, la biodisponibilité de nombreux éléments minéraux, nutritifs ou non (Hinsinger, 1998). Enfin et surtout, la racine libère dans la rhizosphère des quantités considérables de composés carbonés qui vont enrichir

la fraction organique du sol. La rhizodéposition est un processus important en termes d'étude des flux de carbone dans la rhizosphère. Le rhizodépôt est subdivisé en différentes parties, c'est-à-dire les cellules de la coiffe et les tissus racinaires (poils absorbants et cellules épidermiques desquamées) (Rovira 1956), le mucilage et les exsudats racinaires (Nguyen 2003). Les exsudats racinaires constituent la partie la plus importante du rhizodépôt et sont classés en deux types en fonction de leur poids moléculaire. La première classe comprend les composants de faible poids moléculaire tels que les composés hydrosolubles, notamment les glucides simples, les acides aminés, les acides organiques, les hormones végétales, les vitamines, les composés phénoliques, les esters de sucre et de phosphate, les ions et de nombreux autres métabolites secondaires contenant du carbone (Uren 2001 ; Farrar et al 2003 ; Bais et al. 2006 ; Cheng et Gershenson 2007).

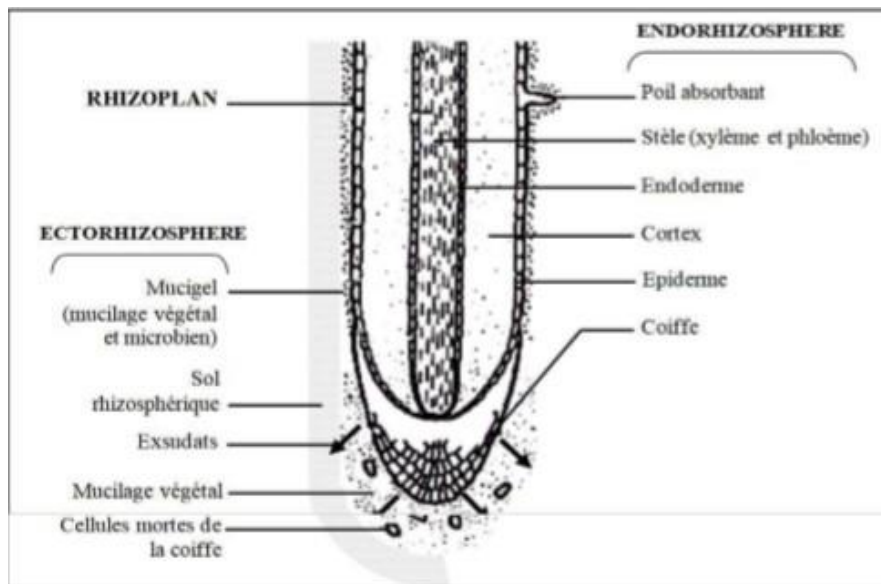


Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Lepinay, 2013)

I.1.1. Activité de la rhizosphère

Plusieurs études ont montré que les racines émettent différents composés carbonés et différents signaux chimiques dans leur rhizosphère qui attirent sélectivement des populations microbiennes capables de métaboliser ces molécules et qui se multiplient préférentiellement dans la rhizosphère (Drogue et al., 2012). L'exsudation racinaire, la partie principale de la rhizodéposition, implique la libération

d'une grande variété de composés organiques, habituellement séparés en masse moléculaire faible, composés par exemple par des acides aminés, des acides organiques, des sucres, des composés phénoliques et des poids moléculaires élevés composés par des mucilages et enzymes extracellulaires (Marschner, 1995). Elle est constituée principalement par des composés contenant du carbone (Uren, 2000). Les exsudats racinaires relâchés dans le sol par les plantes attirent les bactéries (Lynch, 1990) en créant un environnement de diversité très sélectif (Marilley et Aragno, 1999 ; Gracia et al., 2004 ; Barriuso et al., 2005). Ainsi, un gramme de sol sec peut contenir de 10^7 jusqu'à 10^{10} bactéries correspondant à des milliers de différentes espèces (Gobat et al., 2004). Ces communautés microbiennes associées aux racines formant le « rhizomicrobiome » (Chaparro et al., 2013) ont une composition différente de celle du sol non colonisé par les racines. Des études ont également montré que la composition des exsudats racinaires peut changer le long du système racinaire (Berg et Smalla, 2009), ce qui expliquerait pourquoi le rhizo-microbiome est modifié par le stade de développement de la plante.

I.1.2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Ces dernières sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées. Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont comblés à l'intérieur même de la rhizosphère. Les rhizobactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante : les cellules corticales et épidermiques des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc. (Campbell et Greaves, 1990). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (Glick, 1995). Ces rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire. L'effet visible des associations plantes-

microorganismes sur la croissance des plantes peut être positif, neutre ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance alors que d'autres la stimulent. Ces dernières sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (Kloepper et al. 1989 ; Zahir et al. 2004).

Les PGPR comprennent à la fois des bactéries vivantes et des bactéries qui envahissent les tissus végétaux et qui causent des infections asymptomatiques et non apparentes dans les systèmes racinaires (Sturz et Nowak, 2000). Ces derniers groupes sont également connus sous le nom d'endophytes, car ils habitent dans le système tissulaire de la plante. Selon la définition originale, les rhizobactéries sont des bactéries vivantes qui colonisent la zone racinaire.

Les PGPR sont divisés en deux groupes en fonction de leur relation et les sites résidant dans les plantes, iPGPR (bactéries symbiotiques), qui vivent à l'intérieur des cellules de la plante, produisent des nodules, et sont localisées à l'intérieur des structures spécialisées, et ePGPR qui vivent à l'extérieur des cellules de la plante et qui ne produisent pas de nodules, mais qui favorisent tout de même la croissance de la plante (Gray et Smith, 2005). Les iPGPR les plus connus sont les espèces de *Rhizobia*, qui produisent des nodules chez les légumineuses. Un certain nombre d'espèces bactériennes a été utilisé comme inoculum dans le sol pour améliorer l'approvisionnement en nutriments des plantes cultivées. Des espèces appartenant aux genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* ont été utilisées avec succès pour permettre l'établissement efficace de la symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses (Bottomley et Dughri, 1989 ; Bottomley et Maggard, 1990). D'autre part, des bactéries non symbiotiques comme les espèces d'*Azotobacter*, d'*Azospirillum*, de *Bacillus* et de *Klebsiella* sont également utilisées pour inoculer une grande superficie de terres arables dans le monde dans le but d'améliorer la productivité des plantes (Lynch, 1983). En outre, des bactéries solubilisant du phosphate, comme les espèces des genres *Bacillus* et de *Paenibacillus*, ont été appliquées de façon spécifique pour améliorer l'état du phosphore des sols et des plantes (Brown, 1974).

II. Mécanismes d'action des PGPR

Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes par des modes d'action directs ou indirects (Beauchamp, 1993 ; Kloepper, 1993 ; Kapulnik, 1996 ; Lazarovits et Nowak, 1997) : Les mécanismes directs (tableau 1) comprennent la production de composés volatils stimulants et de phytohormones, l'abaissement du niveau d'éthylène dans la plante, l'amélioration de l'état nutritionnel de la plante (libération de phosphate et de micronutriments à partir de sources insolubles, fixation non symbiotique de l'azote) et la stimulation des mécanismes de résistance aux maladies (résistance systémique induite).

Tableau 1 : Mécanismes d'action directes des PGPR (Solano et al., 2008 ; Chanway, 1997)

Mécanismes	Effets	Références
Production de régulateur de croissance végétale	Augmentation de la biomasse	Gutierrez Manero et al., 1996
Floraison	Une augmentation significative des rendements de fruits et des graines	Gutierrez Manero et al., 2001
Inhibition de la synthèse de l'éthylène	Longueur de la racine	Glick et al., 1994
Induction de la résistance systémique	Une stimulation des défenses de la plante	Van Loon et al., 1998
Augmentation de la perméabilité des racines	Augmentation de la perméabilité des racines	Sumner, 1990
Minéralisation de la matière organique (azote, soufre, phosphore)	Biomasse et teneur en éléments nutritifs	Liu et al., 1995
Association de champignons mycorhiziens	Teneur en biomasse et phosphore	Germida and Walley, 1996 Toro et al., 1998
Lutte contre les insectes nuisibles	Santé	Zehnder et al., 1997

Les effets indirects proviennent par exemple lorsque les PGPR agissent comme des agents de lutte biologique réduisant les maladies, lorsqu'ils stimulent d'autres symbioses bénéfiques ou lorsqu'ils protègent la plante en dégradant les xénobiotiques dans les sols contaminés (Jacobsen, 1997). Sur la base de leurs activités, Somers et al. (2004) classent les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des nutriments pour les plantes), phytostimulateurs (stimulant la croissance des plantes, généralement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradant les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production d'antibiotiques et d'antifongiques).

En 1998, le professeur Bashan a proposé deux nouveaux termes à usage scientifique général qui sembleraient englober toutes les bactéries bénéfiques pour les plantes : « bactéries favorisant la croissance des plantes de biocontrôle » (Biocontrol-PGPB) et la bactérie favorisant la croissance des plantes (PGPB). (Bashan et Holguin 1998). Dès lors, le terme PGPB est considéré comme synonyme de PGPR, bien qu'il soit plus inclusif, car il comprend également les bactéries endophytes, les bactéries de la phyllosphère et les bactéries associées aux microalgues.

II.1. Fixation de l'azote

L'azote (N) est un élément clé pour le vivant puisqu'il est fondamental dans la composition de l'ADN, des protéines et des enzymes. Sa forme la plus abondante, le diazote atmosphérique (N_2), constitue 79% du volume de l'air, mais n'est pas directement assimilable par la majorité des êtres vivants. L'azote est ainsi considéré comme l'un des premiers facteurs limitant du développement de la vie (Vitousek et Howarth, 1991 ; Kaye et Hart, 1997 ; Galloway et al., 2003). La conversion de N_2 en espèces réactives de l'azote (N_r) est nécessaire à la croissance de la plupart des organismes et correspond à des formes biodisponibles de l'azote pour les organismes.

Les molécules assimilables de l'azote se présentent sous différentes formes, oxydées ou réduites et sont solubles dans la solution du sol, c'est le cas du nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+). Les différents processus, flux et équilibres liés à l'azote dans l'environnement constituent le cycle de l'azote (figure 2).

En prenant le sol comme élément central dans un écosystème terrestre, il est possible de distinguer deux types de flux d'azote ; les entrées et les sorties.

La fixation biologique de l'azote (BNF) est réalisée par un groupe spécifique de procaryotes. Ces organismes utilisent une enzyme appelée nitrogénase pour catalyser la transformation de l'azote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_4^+), forme azotée assimilable par la plante (Franche et al., 2009). Certains genres bactériens tels que *Azotobacter* et *Rhodopseudomonas* fixent l'azote atmosphérique en conditions libres, c'est-à-dire non associées à un hôte (Kranz et Haselkorn, 1985 ; Jiménez et al. 2011). D'autres bactéries, comme les rhizobia, sont capables de fixer l'azote en établissant une symbiose avec la plante hôte de la famille des légumineuses et de *Parasponia* (Carlsson et Huss-Danell, 2003 ; Op den Camp et al., 2012). Les bactéries du genre *Frankia* fixent l'azote en établissant une symbiose avec les plantes des genres *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Alnus*, etc. (symbiose actinorhizienne) (Benson et Silvester, 1993). Les cyanobactéries assurent la fixation de l'azote en association avec les plantes des genres *Azolla* et *Gunnera* (Fay, 1992 ; Nilsson et al., 2000 ; Bocchi and Malgioglio, 2010). Parmi tous ces exemples, la fixation biologique de l'azote par les rhizobia a été plus particulièrement étudiée pour les caractéristiques des partenaires impliqués, leurs mécanismes régissant son fonctionnement et son impact sur le développement de la légumineuse associée et sur la fertilité des sols.

II.2. Solubilisation du phosphore

Le phosphore est l'un des nutriments les plus essentiels dont les plantes ont besoin. Ironiquement, les sols peuvent avoir un grand réservoir de phosphore total (P), mais les quantités disponibles pour les plantes sont généralement une infime proportion de ce total. Cette faible disponibilité du phosphore pour les plantes est due à la grande majorité du P du sol sous forme insoluble, alors que les plantes ne peuvent l'absorber que sous deux formes solubles, les ions monobasiques (H_2PO_4) et les ions dibasiques (HPO_4^{2-}) (Glass, 1989).

La fixation de phosphore dans les différents types de sols est déterminée par le contenu d'argiles et d'oxy-hydroxydes. La capacité de fixation des phosphates est

dépendante de la richesse des sols en composés amorphes, en aluminium échangeable et en matière organique (Fardeau et Conesa, 1994).

Le problème de la nutrition en phosphore est souvent lié à celui de la mobilisation des réserves, qui s'avère toujours difficile quelle que soit la valeur de pH du sol (la valeur optimale se situe entre 5,5 et 6). Les engrais phosphatés incorporés au sol, même s'ils sont solubles, s'immobilisent rapidement par interaction avec la phase solide (Tisdale et Nelson, 1975 ; Marschner, 1995).

Le manque de disponibilité de phosphates déclenche des carences chez les végétaux. Ainsi, une diminution de la croissance végétative et des altérations du développement (qui conduisent à des pertes de rendements) sont généralement considérées comme les symptômes de carence en phosphore (Tisdale et Nelson, 1975 ; Marschner, 1989). La présence de phosphates, en quantité suffisante et sous forme disponible pour les végétaux, est indispensable en début de végétation et pendant la croissance des organes jeunes. Chez le végétal, au fur et à mesure que sa maturité avance, le phosphore migre des organes végétatifs vers les organes de réserve et en particulier s'accumule dans les graines (Scheiner et al., 2000).

L'action de la biomasse microbienne permet une immobilisation à court terme du phosphore disponible quand il aura une incorporation au sol avec une grande quantité de résidus de récolte (Mullen, 2003). D'après Lopez-Bucio et al. (2000), les plantes sécrètent au niveau de la rhizosphère des acides organiques pour mobiliser le phosphore fixé ; quand les sols sont riches en calcaire ou le phosphore serait très lié aux ions Ca^{+2} par des conditions de déficience phosphatée.

Le phosphore organique dans le sol est généralement conservé dans les plantes et les détritux animaux. Le processus de minéralisation, au cours duquel les complexes de phosphore organique sont convertis en minéraux phosphatés est un processus modulé grâce à l'activité de quelques enzymes microbiennes dont les phosphatases. Parmi les catégories les plus connus des phosphatases microbiennes contribuant à la minéralisation du phosphore, il y a : les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases, les nucléases, les nucléotidases et les phytases (Mackey et Paytan, 2009).

Les microorganismes assurent la disponibilité du phosphore pour les plantes par minéralisation du phosphore organique du sol et par solubilisation des phosphates

précipités (Kucey et al., 1989 ; Pradhan et Sukla, 2005). Ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (mono et dibasiques) (Mackey et Paytan, 2009).

II.2.1. Microorganismes solubilisant le phosphore

Les microorganismes du sol jouent un rôle important et fondamental dans le cycle biogéochimique du phosphore dans le sol. Les microorganismes solubilisant des phosphates (PSM) sont devenus un élément important du système de gestion intégrée des éléments nutritifs qui augmente spécifiquement la disponibilité de phosphore pour les cultures.(Khan et al., 2010).

Khan et al. (2010) ont rapporté que les recherches étaient concentrées sur l'introduction d'organismes vivants qui forment une association bénéfique non spécifique avec un large éventail de plantes cultivées, qui peuvent être facilement produites en masse et qui ont un potentiel de persistance élevé dans l'environnement du sol.

Pikovskaya (1948) a signalé la solubilisation du phosphore par différents types de microorganismes du sol. Par le processus de solubilisation et de minéralisation, les microorganismes libèrent du phosphore à partir de pools inorganiques et organiques de phosphore (Hilda et Fraga, 1999).

La rhizosphère abrite des populations considérables de microorganismes solubilisant les phosphates. Les agriculteurs ont accordé une attention considérable à cette catégorie de microorganismes en tant qu'inocula du sol qui améliorent la croissance et le rendement des plantes (Goldstein et al., 1999 ; Fasim et al., 2002 ; Gyaneshwar et al., 2002).

Plusieurs rapports ont mis en lumière des microorganismes solubilisant les phosphates (Richardson, 2004 ; Rodriguez et Fraga, 1999). Diverses souches de bactéries et de champignons ont été étudiées et caractérisées pour leurs capacités de solubilisation du phosphore (Glick, 1995 ; He et al., 1997).

Les champignons représentés par *Aspergillus* et *Penicillium* et les espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* seraient les espèces

dominantes de solubilisation du phosphate (Illmer et Schinner, 1992 ; Wakelin et al., 2004). De même, les rhizobiums endosymbiotiques sont répertoriés comme des souches efficaces dans la solubilisation du phosphate (Khan et al., 2009). Il a été rapporté également que d'autres espèces bactériennes ont la capacité de solubilisation du phosphore, il s'agit d'*Acetobacter diazotrophicus* (Maheshkumar et al., 1999) et *Gluconacetobacter* sp. (Chung et al., 2005). Généralement ces organismes sont isolés des sols de la rhizosphère, de la rhizoplane, de la phyllosphère et des gisements de phosphate de roche en utilisant la méthode de dilution en série et la technique de culture d'enrichissement (Zaidi et al., 2009).

II.2.2. Mécanismes de solubilisation du phosphore

Certaines espèces bactériennes ont un potentiel de minéralisation et de solubilisation du phosphore organique et inorganique (Hilda et Fraga, 2000 ; Khiari et Parent, 2005). L'activité solubilisante du phosphore est déterminée par la capacité des microorganismes à libérer des métabolites tels que les acides organiques, qui par leurs groupes hydroxyles et carboxyles chélatent le cation lié au phosphate, ce dernier étant converti en formes solubles (Sagoe et al., 1998).

La solubilisation du phosphore est réalisée par un grand nombre de bactéries et de champignons saprophytes agissant sur les phosphates du sol peu solubles, principalement par des mécanismes de chélation (Whitelaw, 2000). Le phosphore inorganique est solubilisé par l'action des acides organiques et inorganiques sécrétés par les bactéries solubilisant du phosphate (PSB) dans lesquels les groupes hydroxyles et carboxyles des acides chélatent les cations (Al, Fe, Ca) et diminuent le pH dans les sols basiques. La libération d'exsudats racinaires tels que des ligands organiques peut également modifier la concentration du phosphore dans la solution du sol (Hinsinger, 2001).

La quantité et le type d'acide organique produit variaient selon le micro-organisme. Les acides organiques libérés dans les filtrats de culture réagissent avec le phosphate insoluble. La quantité de phosphate soluble libérée dépend de la force et du type d'acide. Les acides aliphatiques sont plus efficaces dans la solubilisation du phosphore que les acides phénoliques et les acides citriques. L'acide fumarique a la plus grande capacité de solubilisation du phosphore. Les acides tribasiques et dibasiques

sont également plus efficaces que les acides monobasiques. En présence d'acides tribasiques et d'acides dibasiques, un effet secondaire apparaît en raison de la capacité de ces acides à former des composés d'association avec le calcium, éliminant ainsi le calcium de la solution et augmentant la concentration en phosphate soluble (Gaur et Gaid, 1999).

Les PSB sont un groupe de bactéries qui appartiennent à un groupe hétérogène des PGPB (plant growth promoting bacteria). Les bactéries solubilisant du phosphate (PSB) sont les principaux contributeurs à la nutrition des plantes en agriculture et pourraient jouer un rôle central dans la mise à disposition du phosphore soluble pour les plantes (Khan et al., 2010). Le principal mécanisme de solubilisation du phosphore dans le sol est l'abaissement du pH du sol par la production microbienne d'acides organiques ou la libération de protons et la minéralisation en produisant des phosphatases acides entraînant finalement la disponibilité du phosphore dans le sol (Mohammadi et Sohrabi, 2012). L'acide 2-céto-gluconique produit à partir de l'oxydation directe du glucose par les PSB joue un rôle important dans l'altération et la solubilisation des phosphates dans le sol.

La relation symbiotique entre les PSB et les plantes est de nature synergique, car les bactéries fournissent du phosphate soluble et les plantes fournissent des composés carbonés contenus dans les racines (principalement des sucres), qui peuvent être métabolisés pour la croissance bactérienne (Pérez et al., 2007). Les PSM ainsi que d'autres microflores rhizosphériques bénéfiques améliorent la production végétale.

✓ Production des acides organiques :

Les acides organiques sont produits dans l'espace périplasmique par la voie d'oxydation directe (Zhao et al., 2014). L'excrétion de ces acides organiques s'accompagne d'une baisse du pH qui entraîne l'acidification des cellules microbiennes et de l'environnement, d'où la libération d'ions phosphore par substitution de H^+ à Ca^{2+} (Goldstein, 1994). Étonnamment, Asea et al. (1988) ont découvert qu'il n'existe aucune corrélation entre le pH et la quantité de phosphore solubilisé. Ainsi, Illmer et Schinner (1995) ont proposé la théorie de l'acidification par H^+ . Ils ont expliqué que le H^+ libéré est associé à l'assimilation des cations. Par exemple, l'assimilation de NH_4^+ avec

l'excrétion de H^+ entraîne une solubilisation du phosphore. Un mécanisme alternatif à la production d'acides organiques pour la solubilisation des phosphates minéraux est la libération de H^+ à la surface externe en échange de l'absorption de cations ou à l'aide de l'ATPase de translocation H^+ (Rodríguez et Fraga, 1999). Il a également été rapporté que l'assimilation de NH_4^+ au sein des cellules microbiennes s'accompagne de la libération de protons, ce qui entraîne la solubilisation du phosphore sans production d'acides organiques (Sharma et al., 2013). De tous les acides organiques, l'acide gluconique est l'agent le plus fréquent de solubilisation des phosphates minéraux ; il chélate les cations liés au phosphate, rendant ainsi le phosphate disponible pour les plantes. Les bactéries à Gram négatif solubilisent le phosphate minéral par oxydation directe du glucose en acide gluconique (Goldstein, 2000). La pyrroloquinoléine quinone (PQQ) agit comme un cofacteur redox dans les glucoses déshydrogénases (GDH) entraînant la solubilisation du phosphate (Rodríguez et al., 2000).

✓ Les phosphatases :

Les phosphatases sont introduites dans le sol par sécrétion active ou après lyse cellulaire (Tadano et al., 1993), et la minéralisation du phosphore organique peut être réalisée par des phosphatases extracellulaires qui soit restent liées à la paroi, soit sont libres dans le milieu (Jones et Oburger, 2011). Cependant, la différenciation entre les activités intra- et extra-cellulaires reste encore problématique, et dans la plupart des cas, seules les activités extra-cellulaires sont étudiées (Jones et Oburger, 2011 ; Nannipieri et al., 2011). Même s'il est difficile de connaître l'origine de ces phosphatases (Quiquampoix et Burns, 2007), de nombreux exemples montrent que les enzymes microbiennes prédominent dans le sol (Plante, 2007). Elles présentent en outre une plus grande efficacité pour la libération de phosphore inorganique (Tarafdar et al., 2001). On recense différents types de phosphatases, comprenant des phosphomonoestérases, des phosphodiesterases, et des hydrolases capables d'hydrolyser les fonctions anhydride d'acide ou les liaisons P-N (Nannipieri et al., 2011). Les phosphomonoestérases (incluant les phytases) ont été les plus étudiées, en particulier chez les microorganismes solubilisant le phosphore (Jones et Oburger, 2011). Les phosphatases sont souvent classées en fonction du pH optimal pour leur activité (Hoffmann, 1968). Bien que les microorganismes soient capables de produire à la fois des phosphatases dites acides et alcalines, les plantes ne produisent que des phosphatases acides (Nannipieri et al., 2011). Les phosphatases peuvent être adsorbées

sur la phase solide du sol, en particulier sur les argiles, modifiant ainsi leurs propriétés catalytiques (Quiquampoix et Mousain, 2005). Elles sont aussi généralement soumises à des processus d'inhibition, de biodégradation et de stabilisation dans le sol (Nannipieri et al., 2011).

La solubilisation du phosphore organique est aussi appelée minéralisation. Le phosphore sous forme organique peut donc être minéralisé par des enzymes secrétées par les microorganismes. Elles sont classées en trois catégories :

- ✓ Les phytases permettent de relâcher le phosphore de l'acide phytique. Il existe plusieurs classes de phytases, soit les histidines phosphatases acides (HAP), les phytases p-propeller (BPP), les cystéines phosphatases (CP) et les phosphatases acides mauves (PAP). Les HAP sont caractérisées par un motif N-terminal RHGXRXP et un motif C-terminal HD. L'histidine du N-terminal forme un intermédiaire phosphohistidine et le C-terminal agit comme donneur de proton. (Lei et al., 2007) ;
- ✓ Les phosphonatases et les C-P lyases, qui clivent la liaison C-P des organophosphonates (Rodrigues et al., 2006) ;
- ✓ Les phosphatases acides non-spécifiques les plus abondantes sont les phosphomonoestérases qui sont capables de déphosphoryler les liaisons phosphoesters et les liaisons phosphoanhydride de la matière organique (Nannipieri et al., 2011).

II.2.3. Production d'acide indole acétique

Les PGPR peuvent directement influencer la croissance des plantes, soit par la production de phytohormones (auxines, gibbérellines, etc.) ou par la promotion de l'accès aux nutriments. Les bactéries vivant en association avec les plantes ou dans la rhizosphère sont plus aptes à prospérer à partir des substrats excrétés par les racines des plantes et ainsi convertir les différents substrats en hormones ou autres substances bénéfiques à la croissance des plantes (Kochar et al., 2011). La production de phytohormones par les rhizobactéries pouvant aider à la croissance des plantes représente une caractéristique importante dans l'association plante-rhizobactérie.

II.2.4. Production des sidérophores

Les sidérophores sont petits ; les composés de fer de haute affinité sécrétés par des microorganismes ont trouvé de nombreuses applications dans le domaine de l'agriculture. Ils augmentent la disponibilité et l'absorption du fer dans les plantes. Il a été rapporté que *G. diazotrophicus* produit des sidérophores de type salicylate et catécholates (Logeshwaran et al., 2009).

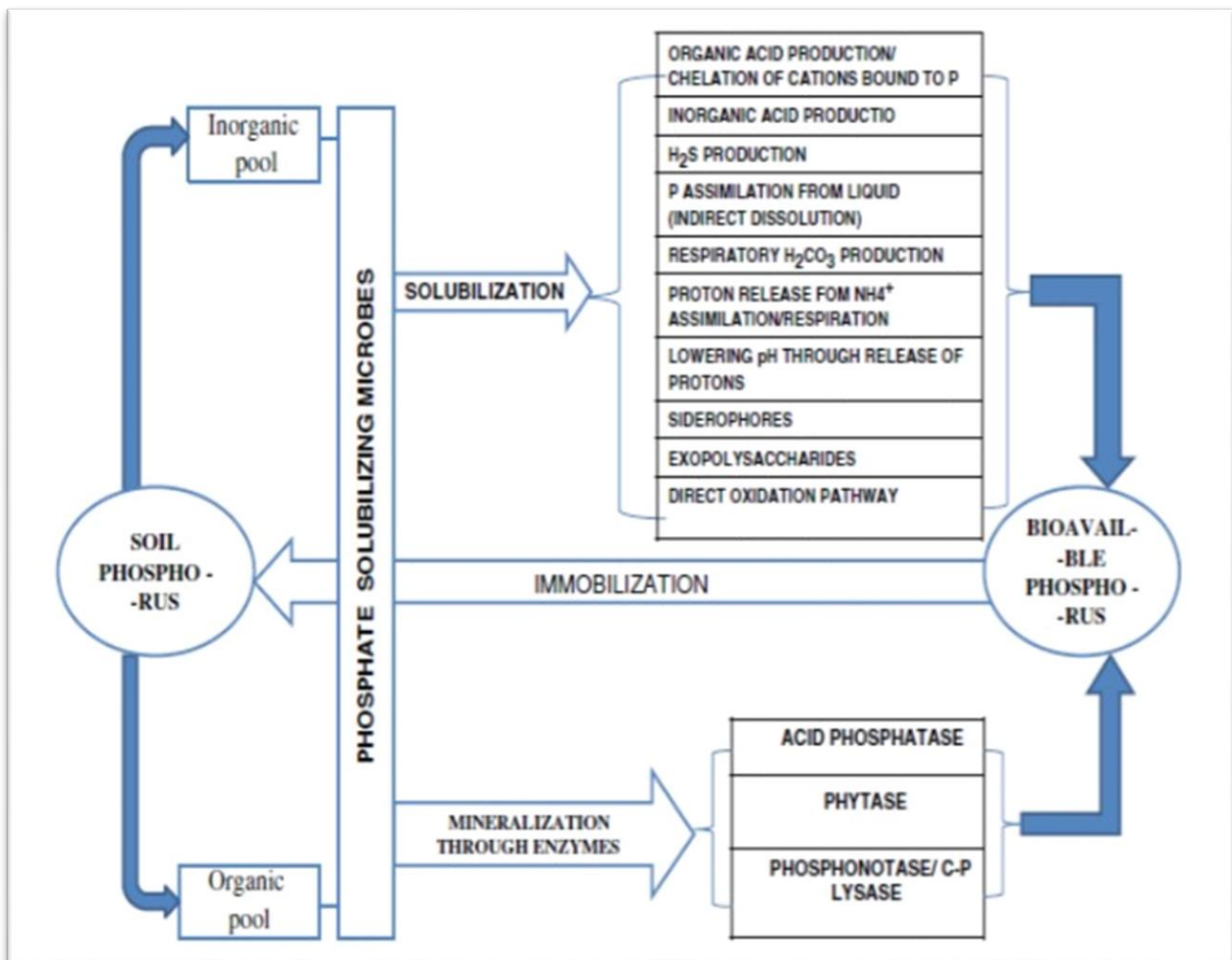


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de solubilisation, minéralisation et immobilisation du phosphore dans le sol avec les PSM (Sharma et al., 2013)

Partie II

Etude experimentale

Matériels et methodes

Resultats et disciussions

1. Matériel biologique

Cette étude a été portée sur quarante isolats de rhizobiums (tableau 2) provenant de la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, de l'université de Bejaïa, isolées à partir des nodules de *Vicia sativa* et *Vicia faba* (RLV, AKE1, EC6, A1); elles ont été repiquées sur le milieu YMA incliné puis incubées à 28°C en vue de revivification.

Tableau 2 : Les isolats utilisées pour le criblage

SSN2c	1Vsat 1LC1	Vte N1a	Vte N5b
1-AmA	2vsat 2L1	Vte N41	Knar Ama
Ksat N51	2-1L3a	Vte N52a	Vte N42
Ksat N2a	1Vsat 3La	Vte N2a	EC6
Ksat N5A	SSN2a	Vte N1c8	RLV
Ksat N1A	Ksat N41	Vte N1c7	AKE1
SSN2d	1Vsat 3L1b	Vte N58	A1
2vsat 1L2d	2-1L1a	Knar 1L1	1-3LA
1vsat 1LC2	Vte N6a	N4b	2Vsat 1L2b
2-1LAa	N5A	Vte N6b	2-2Lb

2. Criblage des isolats solubilisant le phosphore

Afin de sélectionner les isolats ayant la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique quatre milieux de culture recommandés pour étudier la solubilisation du phosphate ont été utilisés. Il s'agit des milieux

- a. YMA (Yeast Mannitol Agar, Vincent, 1970) ;
- b. PVK (Pikovskayas, 1948) ;
- c. NBRIY (Nautiyal, 1999);

d. YMB (yeast Mannitol Broth, Vincent, 1970).

La capacité des différents isolats à solubiliser le phosphate tricalcique dans le milieu est évalué par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie correspondante après incubation à 28°C pendant 72 h

Les diamètres des halos de solubilisation qui entourent les colonies ont été mesurés (halo + colonie). Les résultats ont été exprimés par calcul de l'efficacité de solubilisation (Nguyen et al. 1992) par la formule suivante :

L'indice de solubilisation est calculé à l'aide de la formule d'Edi-Premono et al. (1996) suivante :

$$\text{Indice de solubilisation} = \frac{\text{Diamètre de la colonie} + \text{Diamètre d'halo}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

$$\text{Efficacité de solubilisation (\%)} = (\text{diamètre de halo} / \text{diamètre de colonie}) \times 100$$

3. Recherche des conditions optimales pour la solubilisation du phosphate

3-1. Effet de différents milieux de culture

Des tubes à essai contenant 9 ml de milieu YMB ont été inoculés par quelques colonies bactériennes. Après incubation à 28°C pendant 48h, une suspension bactérienne ayant une densité optique à 600nm de 0,5 a été préparée (Kumar, 2010). Les suspensions ainsi standardisées ont été utilisées pour ensemercer les différents milieux de culture par deux méthodes : Ensemencement par touche et ensemencement par spot par dépôt d'un volume de 10 µl. Trois répétitions sont ainsi réalisées pour chaque test.

3-2. Effet de la source de carbone

L'effet du mannitol, glucose, sucrose, sorbitol, galactose et lactose comme sources de carbone sur la capacité de solubilisation du phosphate par les différentes

isolats a été étudié dans le milieu de culture NBRIY contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphate avec une concentration de 10g/l. L'ensemencement a été réalisé sous forme de spots de 10µl à partir d'une préculture d'une densité optique de 0,5 à 600nm. La lecture a été réalisée après incubation à 28°C pendant 48h à 72h.

3-3. Effet du glucose à différentes concentrations

A partir des suspensions standardisées comme décrit auparavant, des milieux NBRIY additionnés de différentes concentrations en glucose (5, 10, et 15g/l) ont été ensemencés par dépôt en spots de 10µl.

Trois dépôts sont effectués pour chaque concentration et chaque isolat. Après incubation à 28°C pendant 72 heures, la croissance est évaluée par l'apparition de colonies sur le milieu.

3-4. Effet de la source d'azote

L'effet de diverses sources d'azote sur la capacité de solubilisation de phosphate par les isolats sélectionnées a été étudié dans le milieu NBRIY en remplaçant la source d'azote qu'il contient ((NH₄)₂SO₄) par la Proline, Cystéine, Tyrosine, Tryptophane, Lysine, Alanine, Asparagine ou Glycine. L'ensemencement est réalisé sous forme de spots de 10µl à partir d'une préculture d'une densité optique de 0,5 à 600nm à raison de trois répétitions. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 48h à 72h.

3-5. Evaluation de la solubilisation du phosphate après reconstitution d'un milieu optimal

Après avoir sélectionné les composants essentiels permettant, séparément, d'obtenir une solubilisation optimale, un milieu synthétique comprenant l'ensemble de ces composés a été préparé. Ainsi, le milieu NBRIY a été modifié par addition du glucose à 10g/l, la tyrosine comme source d'azote et du phosphate tricalcique à 5g/l. La capacité à solubiliser le phosphate a été testée dans ce milieu modifié par ensemencement en spot et à raison de 10µl à partir d'une préculture d'une densité

optique de 0,5 à 600nm en triplicata. Les boites sont ensuite incubées à 28°C pendant 48h à 72h.

1. Criblage des souches solubilisant le phosphore

L'étude de la capacité à solubiliser le phosphate tricalcique par des isolats de rhizobium a permis de constater que seules 17.5% des isolats (7 isolats) présentent cette activité (tableau 1). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs études (Halder et al., 1993 ;Alikhani et al., 2006 ; Daimon, 2006) et qui ont rapporté que la plupart des souches de Rhizobium ne pouvaient pas solubiliser le phosphate et que cette activité n'est pas largement répandue parmi les rhizobiums.

Tableau 3 : Résultat du criblage de isolats ayant une activité de solubilisation du phosphore

Souche	Activité	Souche	Activité	Souche	Activité	Souche	Activité
SSN2c	-	1Vsat 1LC1	-	Vte N1a	-	Vte N5b	-
1-AmA	-	2vsat 2L1	+	Vte N41	-	Knar Ama	-
Ksat N51	-	2-1L3a	+	Vte N52a	-	Vte N42	-
Ksat N2a	-	1Vsat 3La	-	Vte N2a	-	EC6	-
Ksat N5A	-	SSN2a	-	Vte N1c8	-	RLV	+
Ksat N1A	-	Ksat N41	-	Vte N1c7	+	AKE1	+
SSN2d	+	1Vsat 3L1b	-	Vte N58	-	A1	-
2vsat 1L2d	-	2-1L1a	-	Knar 1L1	-	1-3LA	-
1vsat 1LC2	+	Vte N6a	-	N4b	-	2Vsat 1L2b	-
2-1LAa	-	N5A	-	Vte N6b	-	2-2Lb	-

2. Optimisation de la solubilisation du phosphore

La solubilisation du phosphate tricalcique a été évaluée qualitativement sur les milieux PVK et NBRIY en utilisant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore (figure 3).

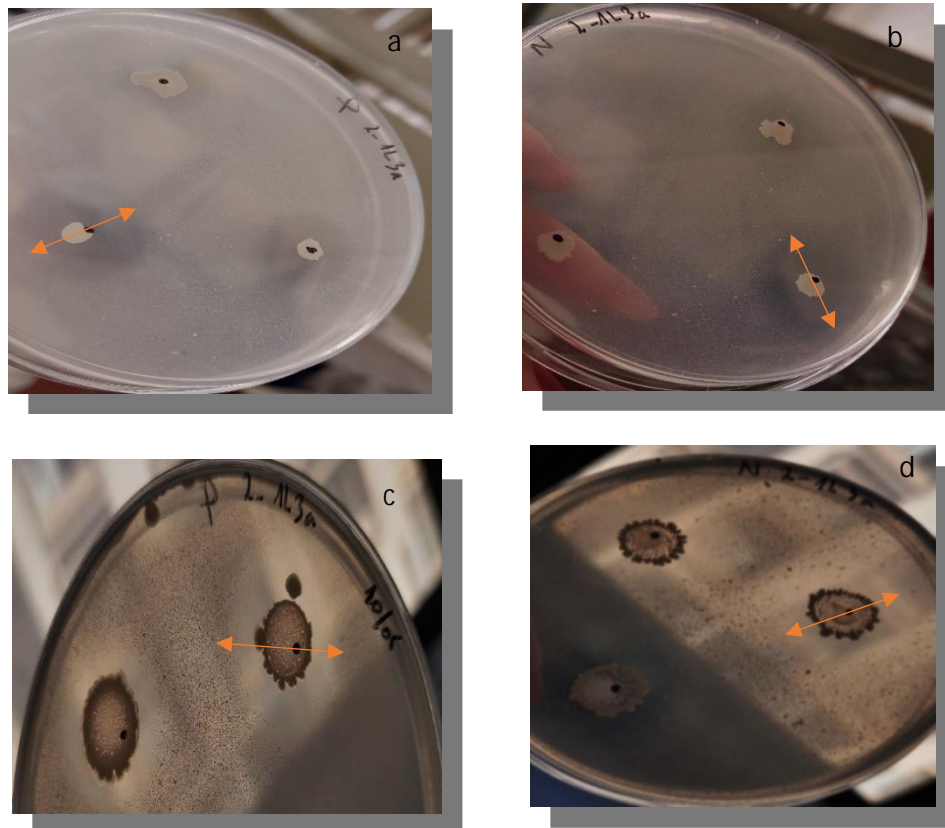


Figure 3 : Mise en évidence de la solubilisation du phosphore sur les milieux PVK (a et c) et NBRIY (b et d) chez isolat 2-1L3a ensemencée par touche (a et b) et en spot (c et d)

Les diamètres des halos clairs observés autour des colonies varient de 0,7 à 3,9 cm (tableau 4) avec une valeur maximale obtenue avec les souches Vte N1C7 et 2-1L3a. La comparaison des diamètres des halos clairs autour des colonies nous a permis de constater que le milieu NBRIY permet une meilleure visualisation de la solubilisation. De même, la méthode d'ensemencement en spot permet d'observer des halos clairs de diamètres plus importants comparé à la méthode d'ensemencement par touche. Ceci serait dû à l'importance de la charge microbienne dans la suspension bactérienne (10^8 cellules/ml) comparée à celle obtenue par touche.

Tableau 4 : Solubilisation du phosphore sur les milieux PVK et NBRIY

Milieu de culture Souche		Ensemencement par spot					Ensemencement par touche						
		Milieu PVK			Milieu NBRIY			Milieu PVK			Milieu NBRIY		
SSN2d		1,8	1,8	1,6	2	2	2	–			–	1	–
2Vsat 2L1		1,7	1,7	0,7	3	2,2	3,5	1,7	1,6	1,7	2,6	2,5	2
1Vsat 1LC2		2,1	3,9	3,5	1,4	1,5	2	–			–		
Vte N1C7		3	3,3	3,4	1	0,8	1,1	1	0,8	1,1	0,7	0,9	–
2-1L3a		2,1	1,8	–	2	2,4	2,2	2	2,4	1,8	1,7	1,7	1,6
RLV		1,3	1	1,2	1,7	1,6	1,8	1	1	1,7	1,4	1,5	1,2
AKE1		8	8	8	10	10	20	4	4	5	7	4	5

3. Recherche des conditions optimales pour la solubilisation du phosphate

3-1. Effet de la concentration de glucose sur la solubilisation du phosphore

Ce test nous a permis de constater que la solubilisation du phosphore augmentait avec l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu. Nous avons constaté également que le halo clair autour des colonies apparaît au cours des 3 premiers jours d'incubation pour la plupart des isolats. Dans le cas de l'isolat 2Vsat 2L1, l'apparition d'un halo autour de la colonie est à partir du 6^{ème} jours (tableau 5).

Tableau 5 : Evaluation de la solubilisation du phosphore

	Durée	Diamètre de la colonie			Diamètre de l'halo			Indice de solubilisation			Indice d'efficacité		
		Concentration (g)			Concentration (g)			Concentration (g)			Concentration (g)		
		5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Vte N1C7	3j	1	1,03	0,67	1,47	1,6	1,23	2,47	2,55	2,84	147,00	155,34	183,58
	6j	1,2	1,23	0,8	1,63	1,7	1,4	2,36	2,38	2,75	135,83	138,21	175,00
	9j	1,33	1,27	0,97	1,8	1,72	1,57	2,35	2,35	2,62	135,34	135,43	161,86
1V Sat 1LC2	3j	1,3	1,22	1,53	1,8	1,8	1,93	2,38	2,48	2,26	138,46	147,54	126,14
	6j	1,72	1,9	1,7	2,25	2	2	2,31	2,05	2,18	130,81	105,26	117,65
	9j	1,72	2	1,68	2,18	2,1	2,05	2,27	2,05	2,22	126,74	105,00	122,02
2V Sat 2L1	3j	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
	6j	1,41	1,43	1,5	2,3	2,5	3	2,63	2,75	3,00	163,12	174,83	200,00
	9j	1,4	1,43	1,5	2,3	2,5	3	2,64	2,75	3,00	164,29	174,83	200,00
SSN2d	3j	1,3	1,3	1,2	1,73	1,8	1,5	2,33	2,38	2,25	133,08	138,46	125,00
	6j	1,42	1,43	1,33	1,8	1,8	1,7	2,27	2,26	2,28	126,76	125,87	127,82
	9j	1,42	1,47	1,33	2	1,93	1,7	2,41	2,31	2,28	140,85	131,29	127,82
2-1L3a	3j	1,43	1,45	1,1	3	3	2,27	3,10	3,07	3,06	209,79	206,90	206,36
	6j	1,7	1,6	1,37	3	3,1	2,27	2,76	2,94	2,66	176,47	193,75	165,69
	9j	1,7	1,6	1,37	3	3,7	2,27	2,76	3,31	2,66	176,47	231,25	165,69
RLV	3j	1,33	0,97	0,8	2	2,7	2,27	2,50	3,78	3,84	150,38	278,35	283,75
	6j	1,31	0,97	0,9	2	1,93	1,7	2,53	2,99	2,89	152,67	198,97	188,89
	9j	1,35	1	1	1,9	3	2,27	2,41	4,00	3,27	140,74	300	227
AKE1	3j	1,25	1,29	1,13	1,83	1,92	1,9	2,46	2,49	2,68	146,4	148,84	168,14
	6j	1,78	1,93	1,62	2,35	2,51	2,39	2,32	2,30	2,48	132,02	130,05	147,53
	9j	1,79	2,1	1,73	2,38	2,51	2,45	2,33	2,20	2,42	141,62	119,52	141,62

L'augmentation de la concentration de glucose de 5 à 10 g/l est accompagnée d'une augmentation de la solubilisation du phosphore chez la plupart des isolats. A la concentration de 15%, la solubilisation diminue (figure 4). Cela pourrait être dû à l'autoconsommation de phosphate soluble par la population bactérienne croissante telle que rapportée chez *Azospirillum brasilense* par Rodriguez (2004).

Ces résultats concordent avec les hypothèses rapportées par Behera et al. (2014), qui stipule que la solubilisation du phosphore minéral s'avère être due à l'acide gluconique dérivé du glucose produit dans l'espace périplasmique. Il a été calculé que 60 mM d'acide gluconique entraînaient la libération d'environ 0,1 mM de Pi. Ainsi, il a été émis l'hypothèse que l'acide gluconique produit conduisait à la libération de protons qui solubiliseraient finalement les phosphates insolubles.

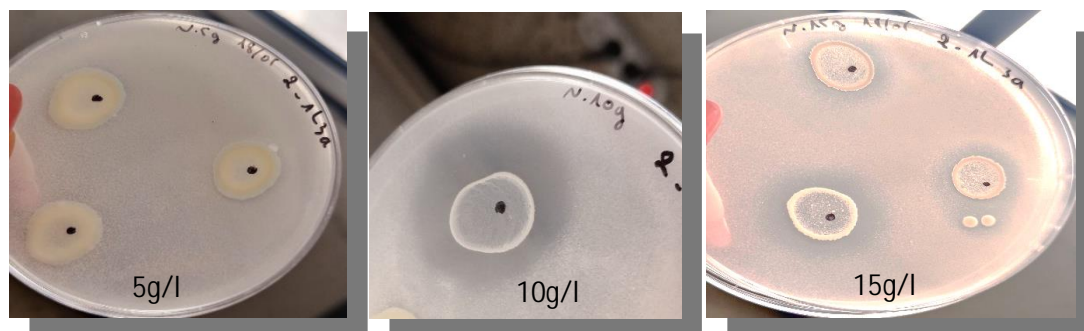


Figure 4 :Illustration de l'effet des concentrations en glucose sur la solubilisation du phosphore (cas de la souche 2-1L3a)

Le calcul de l'indice de solubilisation a permis de mettre en évidence la capacité de solubilisation de chaque isolat. Ainsi, les isolats : RLV ; 2-1L3a ; 2Vsat 2L1 ; Vte N1C7 ; AKE1 et SSN2d avec des indices respectifs de 4 ; 3,31 ; 3 ; 2,62 ; 2,42 et 2,41 obtenus après 9 jours d'incubation, sont les plus efficaces en solubilisation tandis que, l'isolat 1Vsat 1LC2 possède le pouvoir solubilisant le plus faible (Indice de solubilisation = 2,27). Il y a lieu de noter que la solubilisation n'est observée qu'à partir du sixième jour dans le cas de l'isolat 2Vsat 2L1.

3-2. Effet de différentes sources de carbone

Parmi les sources de carbone testées, la solubilisation la plus élevée du phosphore a été enregistrée lorsque le glucose a été utilisé comme source de carbone tandis que le galactose était le moins préféré par les isolats. Il a déjà été démontré que les sources de carbone affectent la solubilisation des phosphates bactériens (Hameeda et al., 2006). En effet, les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux rapportés par Fasim et coll. (2002) et Relwani et coll. (2008), qui ont observé un maximum de solubilisation du phosphate tricalcique en présence du glucose comme source de carbone. Des résultats similaires ont été également rapportés auparavant chez *Bradyrhizobium* sp. isolé de *Cicer arietinum* (Halder et al., 1991).

En plus du glucose, le galactose a été rapporté comme étant une très bonne source de carbone pour la solubilisation du phosphate chez différentes espèces bactériennes (Mardad et al., 2014).

Parmi les autres sources de carbone testées, le mannitol a soutenu une libération de P_2O_5 relativement élevée par les isolats 2Vsat 1LC2 et Vte N1C7. Une absence de

solubilisation du phosphate a été observée chez l'isolat AKE1 en présence du sucrose, sorbitol, galactose et lactose comme sources de carbones.

3-3. Effet de différentes sources d'azote

Pour étudier la solubilisation de phosphore, plusieurs sources d'azote ont été testées. Le coefficient de solubilisation calculé montre que les isolats de rhizobium retenues ont utilisé les différentes sources d'azote testées. Toutefois, la tyrosine a permis une solubilisation maximale avec un coefficient de 3.75 fois supérieur au témoin contenant du sulfate d'ammonium comme source d'azote. En comparant les coefficients de solubilisation entre les différentes souches, nous constatant que SSN2d et 2Vsat 1LC2 présentent les taux les plus élevés (figure 5 et 6). Une faible solubilisation du phosphore a été observée avec la plupart des acides aminés. Selon Kumar et Ram (2014), les sources d'azote inorganiques favorisent une meilleure solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par rapport aux sources d'azote organiques.

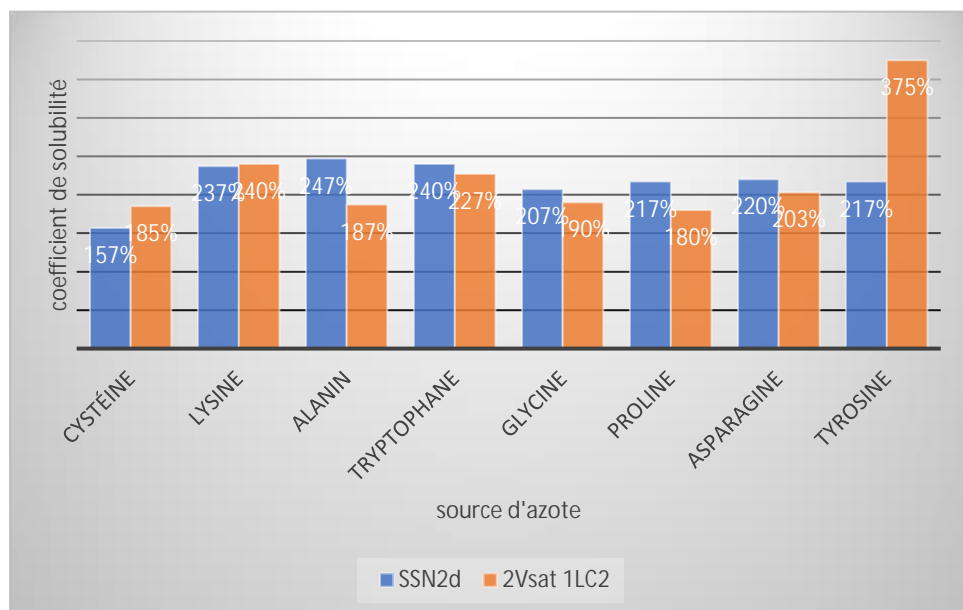


Figure 5: Effet de différentes sources d'azote sur les deux isolats SSN2d et 2Vsat 1LC2



Figure 6 : Solubilisation du phosphore en présence de la tyrosine par les isolats SSN2d et 1Vsat 1LC2

Conclusion

Conclusion

Cette étude se proposait d'effectuer le criblage de souche de rhizobium ayant la capacité de solubiliser le phosphore. Elle a été portée sur 40 souches de rhizobiums provenant de la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, isolées à partir des nodules de *Vicia sativa* et *Vicia faba* (RLV, AKE1, EC6 et A1).

L'étude de la capacité à solubiliser le phosphate tricalcique inorganique insoluble par des souches de rhizobium a permis de constater que seules 17.5% des 40 souches (7 souches) présentent cette activité de solubilisation de phosphore.

Pour étudier la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique trois milieux de culture YMA PVK et NBRIY ont été recommandés. La capacité des différentes souches à solubiliser le phosphate tricalcique dans les milieux est évalué par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie correspondante Avec une valeur maximale obtenue avec les souches Vte N1C7 et 2-1L3a. La comparaison des diamètres des halos clairs autour des colonies nous a permis de constater que le milieu NBRIY permet une meilleure visualisation de la solubilisation.

La composition du milieu de culture a été mise en cause pour distinguer les éléments nécessaires pour la solubilisation de phosphore d'où on a pu déterminer la meilleure source de carbone et d'azote pour approprier une meilleure solubilisation pour chaque souche. Augmentation de la concentration de glucose de 5 à 10 g/l comme source de carbone dans le milieu a observé un maximum de taux de solubilisation.

Le coefficient de solubilisation calculé montre que les souches de rhizobium retenues ont utilisé les différentes sources d'azote testées. Toutefois, la tyrosine a permis une solubilisation maximale.

En conclusion, les tests d'efficacité de solubilisation du phosphore dans les conditions normales ou stressantes sont nécessaires pour consolider le rôle de ces bactéries comme biofertilisants compétents pour accroître la croissance, la nutrition et la santé des plantes ce qui permettra de réduire les problèmes liés à l'utilisation des engrais chimiques toxiques dans les pratiques agricoles.

Références bibliographiques

Référence bibliographique :

- Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, 287, 35-41.
- Anand et al. 2016. Phosphate solubilizing microbes : an effective and alternative approach as biofertilizers. *International Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*,8, 37-40.
- Anonyme, 2008. Biofertilizers technology projects details biomate.pdf
- Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N., and Stewart J. W. B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.*20,459–464.10.1016/0038-0717(88)90058-2
- Badawi et al., 2011.Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganismes under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Sciences*. 56 (1), 17-25.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266
- Baldi et al. 2015. Utiliser la fertilisation pour agir sur la santé des plantes et favoriser leur protection vis-à-vis des maladies et ravageur. 119.
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growthpromoting rhizobacteria into two classifications : biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225–1228
- Beauchamp, C. J., 1993, Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents, *Phytoprotection* 71:19-27.
- Behera, B.C., Singdevsachan, S.K . Mishra, R.R. Dutta, S.K. Thatoi.H.N.2014 Diversity, Mechanism and Biotechnology of Phosphate Solubilising Microorganism in Mangrove-A Review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10.1016/j.bcab.2013.09.008
- Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews* 57.2: 293-319.

- Bocchi, S., and Malgioglio, A. (2010) Azolla-Anabaena as a biofertilizer for rice paddy fields in the Po Valley, a temperate rice area in Northern Italy. *International Journal of Agronomy* 2010.
- Bottomley PJ, Dughri MH (1989) Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. *Appl Environ Microbiol* 55: 959–964
- Bottomley PJ, Maggard SP (1990) Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 56:533–540
- Brown ME (1974) Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* 12:181–197.
- Campbell, R., et M.P. Greaves (1990). Anatomy and community structure of the rhizosphere in *The Rhizosphere* (ed. J.M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex, pp. 11–34.
- Carlsson, G., and Huss-Danell, K. (2003) Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil* 253. 2: 353-372.
- Chanway CP (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *For Sci* 43:99–112
- Chen et al., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- Cheng W, Gershenson A (2007) Carbon fluxes in the rhizosphere. In: Cardon ZG, Whitbeck JL (eds) *The rhizosphere—an ecological perspective*. Academic Press, San Diego, CA, pp 31–56
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T., 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1970e1974.
- Daimon, H., Nobuta, K., and Ohe, M. 2006. Tricalcium phosphate solubilization by root nodule bacteria of *Sesbania cannabina* and *Crotalaria juncea*, *Plant Prod. Sci.*, 9, 388-389.
- Document d'information technique Rome, FAQ 1996. Ce document fait partie de l'ensemble des documents du Sommet mondial d'alimentation. Sur le site de la FAQ. Thèse pour doctorat en science politique/ 2010 berumen colin Noemi Paulina / CEAN.

- Edi-Premono, M, AM. Moawad et PLG. Vlek (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones. J. CropSci.* 11:13-23.
- Farrar J, Hawes M, Jones D et al (2003) How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*84:827–837
- Fardeau J.C. and Conesa A.P. 1994. Le phosphore. In: Bonneau et Souchier (eds), *Pédologie, 2. Constituants et propriétés du sol.* Masson, Paris, pp. 649–648.
- Fasim F, Ahmed N, Parson R, Gadd GM (2002) Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. *FEMS Microbiol Lett* 213:1–6
- Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., Gadd, G.M (2002). Solubilization of Zinc salts by bacterium isolated by the air environment of tannery *FEMS Micro. Lett*, 213,1-6
- Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* 56. 2: 340-373.
- Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321. 1-2: 35-59.
- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience*53 : 341–356.
- Gaur, A. C. and S. Gai, 1999. Phosphate solubilizing microorganisms-An overview. *Agromicrobes. Current trends in life sciences, Today and tomorrow publishers, New Delhi. India.* 23:151-164.
- Germida JJ, Walley FL (1996) Plant growth promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field grown spring wheat. *Biol Fertil Soils* 23:113–120
- Glass ADM (1989) *Plant nutrition: an introduction to current concepts.* Jones and Bartlett, Boston, p 234
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117
- Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase play a role on plant growth by

- Pseudomonas putida* GR12-2. In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds) Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO, Adelaide, pp 150–152
- Glick, 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.
 - Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41: 109-117.
 - Goldstein AH, Braverman K, Osorio N (1999) Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) bacterium. *FEMS Microbiol Ecol.* 3:295–300
 - Goldstein, A. H. (2000). “Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology,” in *Proceedings of the 4th International Fertilizer Association Technical Conference*, (Paris:IFA), 220.
 - Goldstein, A.H. (1994). “Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria,” in *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (Washington, DC: ASM Press), 197–203.
 - Gray MJ, Smith LM (2005) Influence of land use on post metamorphic body size of playa lake amphibians. *J Wildl Manag* 69:515–524
 - Guthman, 2002 dans la Rochette, Annie 2004. La contribution des initiatives collectives à l’instauration d’une consommation domestique soutenable : l’exemple de l’agriculture soutenue par la communauté. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en science de l’environnement Montréal : université du Québec à Montréal.
 - Gutierrez Manero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A (1996) The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L) Gaertn.). II Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil* 182:67–74
 - Gutierrez Manero FJ, Ramos B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M (2001) Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus*

licheniformis produce high amount of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111:206–211

- Gyaneshwar P, Kumar NJ, Pareka LJ, Podle PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245(1):83–93.
- Halder A K and Chakrabartty P K 1993 Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38, 325–330.
- Halder A.K., Misra A.K., Chakrabarty P.K. (1991) Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*, *Ind. J. Exp. Biol.* 29, 28–31.
- Hameeda, B. Y., Harish Kumar Reddy, R. O. P., Kumar, G. N., and Reddy, G. (2006). Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr. Microbiol.* 53, 298–302. doi: 10.1007/s00284-006-0004-y
- He ZL, Wu J, O'Donnell AG, Syers JK (1997) Seasonal responses in microbial biomass carbon, phosphorus and sulphur in soils under pasture. *Biol Fertil Soils* 24:421–428
- Hilda, R. and R. Fraga. 2000. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-359.
- Hiltner L (1904) About new experiences and problems in the field of *Bodenbakteriologie*. *Works Ger Agric Soc* 98: 59–78
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64, 225–265.
- Hinsinger, 2011. Hinsinger P, Bernard L, Brauman A., Plassard C., Shen J., Tang X., Zhang F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology*, 156(3), 1078-1086.
- Hoffmann G., 1968. Phosphatases in the enzyme system of cultivated soils (in Germany) and possibilities of determining their activity. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkd.* 118, 153-160.
- Hogarth et al. 1998 ; Klein man et al. 2009. Terminology for phosphorus transfer. *Jurnal of environmental Quality* 29(1) :10-15.

- Illmer, P., and Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257–263. 10.1016/0038-0717(94)00190-C.
- Jacobsen CS (1997) Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia DBO1 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil* 189:139–144
- Jen-Hshuan, 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and / or biofertilizer for crop growth and soil fertility.11.
- Jiménez, D.J., Montaña J.S., and Martínez, M.M. (2011) Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown colombian soils." *Brazilian Journal of Microbiology*. *Brazilian Journal of Microbiology* 42.3: 846-858.
- Jones D.L., Oburger E., 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: E.K. Bünemann , A. Oberson , E. Frossard (eds), *Phosphorus in action. Biological Processes in Soil Phosphorus*,169-198. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Joshi et al, 2009. Suppressive effects of composts on soil-borne and foliar diseases of French bean in the field in the western Indian Himalayas crop protection, 28(7), 608-615.10.1016/j.cropro2009.03.009.
- Kapulnik, Y., 1996, Plant growth promoting rhizosphere bacteria, in: *Plant Roots The Hidden Half*, Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkafi, U., eds., Marcel Dekker, N.Y., pp.769-781.
- Kaur, H. 2016. Effect of biofertilizers and organic fertilizers on soil health, growth and. (PDFDrive.Com).pdf. Department of microbiology college of Basic sciences and Humanities PUNJAB AGRICULTURAL UNIVERSITY LUDHIANA -141004.
- Kaye JP, Hart SC. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* 12 : 139–143.
- Khan et al. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Archives of Agronomy and soil science*, 56(1), 73-98.
- Khan et al. 2014. Mechanism of phosphate solubilisation and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, in phosphate solubilizing microorganisms Khan, M S., ZAIDI, A. (Eds). Springer International Publishing, Switzerland.pp. 31-62

- Khan MS et al (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Sci* 56(1):73–98
- Khiari, L. and L. E. Parent. 2005. Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry swine manure. *Can. J. Soil Sci.* 85:75-87.
- Kloepper, J W. (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F.B. Jr., Metting .Marcel Dekker inc., N.Y. p. 255-273.
- Kloepper, J. W., 1993, Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, in: *Soil Microbial Ecology*, F.B. Jr., Metting, ed., Marcel Dekker inc., N.Y., pp.255-273.
- Kloepper, JW., R. Litshitz et R.M. Zablotowicz (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39–43.
- Kochar, M., Upadhyay, A., and Srivastava, S. (2011) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Res. Microbiol.* 162: 426-35.
- Kochar, M., Upadhyay, A., and Srivastava, S. (2011) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Res. Microbiol.* 162: 426-35
- Kranz, R.G., and Haselkorn, R. (1985) Anaerobic regulation of nitrogen-fixation genes in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83. 18: 6805-6809.
- Kucey et al. 1989 ; Pardhan et al. 2005. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228.
- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H., Legget, M.E. (1989). Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron*, 42:199-228.
- LAMBERS H, SCHEURWATER I, ATKIN OK (1996). Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. In : WAISEL Y, ESHEL A, KAFKAFI U, eds. *Plant roots. The hidden half.* 2nd Ed. New York : Marcel Dekker Inc. : 529-56
- Lazarovits, G., and Nowak, J. 1997, Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment, *HortScience* 32:188-192.
- Lei, x., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Pedersen, H. (2007) Phytase: source, structure and application, p. 505-529. In J. Polaina and A. P. MacCabe (ed.),

Industrial enzymes: structure, function and applications. Springer, Dordrecht, The Netherlands

- Lepinay, Clémentine., 2013. Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne. Dijon. p257.
- Liu L, Kloepper JW, Tuzun S (1995) Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064–1068
- Logeshwaran, P., Thangaraju, M., Rajasundari, K., 2009. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3, 3564e3567.
- LOPEZ-BUCIO J., NIETO-JACOBO M.F., RAMIREZ-RODRIGUEZ V., HERRARAESTRELLA L., 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science* 160: 1-13.
- Lynch JM (1983) *Soil biotechnology: microbiological factors in crop productivity*. Blackwell, Oxford.
- Mackey KRM, Paytan A (2009) Phosphorus cycle. *Encyclopedia of Microbiology*. MoselioSchaechter (ed.), Oxford, pp. 322-334
- Maertens, 1964 ; Chopart et nicou, 1976. Influence des propriétés physiques des sols sur le développement racinaire et conséquences sur l'alimentation hydrique et azotée des cultures science de sol 2 :31-41.
- Maheshkumar, K.S., Krishnaraj, P.U., Alagawadi, A.R., 1999. Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. *Curr. Sci.* 76, 874e875.
- Mardad I, Serrano A, Soukri A (2014) Effect of Carbon, Nitrogen Sources and Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains Isolated from a Moroccan Rock Phosphate Deposit. *J Adv Chem Eng* 1: 102. doi: 10.4172/2090-4568.1000102
- Maron et al. 2011. Soil microbial diversity : Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334(5_6), 403-411. doi :10.1016/j.crv.2010.12.003. *Etude et Gestion des sols*, 27,2020

- MARSCHNER H. and Häussling M., 1989. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year-old Norway spruce {*Picea abies* (L.) Karst.) trees. - *Biol. Fertil. Soils*8: 128-133.
- Mohammadi, K., Sohrabi, Y., 2012. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a Review. *ARPN J. Agri. Biol. Sci.* 7, 307e316.
- Mouria et Allal, 2010. Valorisation agronomique du compost et de ses extraits sur la culture de la tomate.27.
- MULLEN L. C., 2003. Phosphorus Nutrition for Winter Crops. *Agfact P1.4.5*, second edition. District Agronomist, Dubbo NSW Agriculture. 16p.
- Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella R., 2011. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: E. Bünemann , A. Oberson , E. Frossard (eds), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, 215-244. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. et Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. Dans *Phosphorus in Action*, édité par Else Bünemann, Astrid Oberson, et Emmanuel Frossard, 26 : 215-43. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg
- Nilsson, M., Bergman, B., and Rasmussen, U. (2000) Cyanobacterial diversity in geographically related and distant host plants of the genus *Gunnera*. *Archives of microbiology* 173. 2: 97-102.
- Nguyen,C ., Yan W, Le Tacon F., Lapyire F.(1992).Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotiv and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PDOrton, *Plant Soil*143,193-199.
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375–396
- Op den Camp, R.H., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., Op den Camp, H.J., Bisseling, T. and Geurts, R. (2012) *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25. 7: 954-963.
- Paul, E.A., et F.E. Clark (1996). *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2nd Edition. Academic Press, New York.

- Pérez, E., M. Sulbarán, M. M. Ball and L. A. Yarzabál. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.* 39:2905-2914.
- Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17:362–370
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2001) The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York, pp 1–17
- Plante A.F., 2007. Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: E.A. Paul ed., *Soil microbiology and biochemistry*, 391-398. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Pradhan, N., Sukla, L.B. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol*, 5(10): 850-854.
- Quiquampoix H., Burns R.G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: Environmental and health consequences. *Elements* 3, 401-406.
- Relwani, L., Krishna, P., &Sudhakara Reddy, M. (2008). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Phosphate Solubilization by a Wild-Type Strain and UV-Induced Mutants of *Aspergillus tubingensis*. *CurrentMicrobiology*, 57(5), 401–406. doi:10.1007/s00284-008-9212-y
- Richardson AE (2004) Soil microorganisms and farming systems. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Management of soil biota is sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne, pp 50–62
- Rodrigues, R. A. F.;Soratto, R. P.; Arf, O. Manejo de águaemarroz de terras altas no sistema de plantiodiretousando o tanque de Classe A. *EngenhariaAgrícola*, v.24, p.546-556, 2004. [http:// dx.doi.org/10.1590/S0100-69162004000300007](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162004000300007)
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339

- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. et Bashan, Y. (2006). Genetics of Phosphate Solubilization and Its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria. *Plant Soil* 287 (1-2) : 15-21.
- Rodríguez, H., Rossolini, G. M., Gonzalez, T., Li, J., and Glick, B. R. (2000). Isolation of a gene from Burkholderiacepacia IS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity. *Curr. Microbiol.* 40, 362–366. doi: 10.1007/s002840010071
- Rodríguez,H.,andFraga,R.(1999).Phosphate solubilizing bacteria and theirrole in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17, 319–339. doi: 10.1016/S07349750(99)00014-2.
- Rovira AD (1956) Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect I. *Plant Soil* 7:178–194
- Sagoe, C. I., T. Ando, K. Kouno and T. Nagaoka. 1998. Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44:617-625.
- Scheiner J.D., Gutiérrez Boem F.H., Lavado R.S. 2000. Dinámica de la absorción y partición de nutrientes en soja. □YTON. 69 : 77 - 84.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2, 587–600. doi: 10.1186/21931801-2-587
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. et Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2013, 2 (1) : 587.
- Singh et al. 2010. The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augements Inducted Systemic Resistance and Enhanced salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L). *PloS one*, 11(6), e0155026.
- Singh SM, Yadav LS, Singh SK, Singh P, Singh PN, Ravindra R (2011). Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Research*, 30, 7283. DOI: 10.3402/polar.v30i0.7283.
- Solano BR, Maicas JB, Gutierrez Manero FJ (2008) Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds) *Plantbacteria interactions, strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley, Weinheim

- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240
- Sommet mondial de l'alimentation, FAO, Rome (1996). Manuel d'évaluation de la sécurité alimentaire en situation d'urgence / deuxième édition.
- Sturz AV, Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol* 15:183–190
- Sumner ME (1990) Crop responses to Azospirillum inoculation. *Adv Soil Sci* 12:153–168
- Système alimentaire et sécurité alimentaire : comprendre et agir (février 2005)
- Tadano T., Ozawa K., Sakai H., Osaki M., Matsui H., 1993. Secretion of acid-phosphatase by the roots of crop plant under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant and Soil* 155, 95-98.
- Tarafdar J.C., Yadav R.S., Meena S.C., 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 279-282.
- Toro M, Azcon R, Barea JM (1998) The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of Rhizobium genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytol* 138:265–273.
- Uren NC (2001) Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York, pp 19–40
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *AnnuRevPhytopathol*36:453–483
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea : How can it occur? *Biogeochemistry* 13 : 87–115.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69:99-151.
- Zahir, ZA, M.Arshad et WT. Frankenberger (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture.*Adv. Agron.*, 81, 97-168.

- Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA, et al. Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. In: Khan MS, et al., editors. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009. pp. 23–50.
- Zehnder G, Kloepper J, Yao C, Wei G (1997) Induction of systemic resistance against cucumber beetles (Coleoptera:Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *J Econ Entomol* 90:391–396
- Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., et al. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting Burkholderiaceae with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol. Res.* 169, 76–82. doi:10.1016/j.micres.2013.07.003

Annexes

Composition des milieux de cultures :

➤ **Milieu Yeast Mannitol Agar YMA (g/l) :**

Mannitol	10
Extrait de levure	0,4
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	0,5
Nacl	0,1
Agar	15
H ₂ O	1L

Ajuster le pH à 7

➤ **Milieu yeast extract mannitol YMB (g/l) :**

Mannitol	5
Extraits de levure	0,2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	0,25
Nacl	0,05

Ajuster le pH à 7

➤ **Milieu Pikovskaya PVK (g/l) :**

Glucose	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄	0,1
Extrait de levure	0,5
Kcl	0,2
Nacl	0,2
FeSO ₄	0,002
MnSO ₄	0,002
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar	15

Ajuster le pH à 7,2

➤ **Milieu nautiyal NBRIY (g/l) :**

Glucose	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄	0,1
Kcl	0,2
Nacl	0,2
FeSO ₄	0,002
MnSO ₄	0,002
Ca ₃ (PO ₄) ₂	10
Agar	15

Ajuster le pH à 7

Stérilisation des milieux de culture a été réalisée par autoclave 120°C pendant 20min.

Résumé :

Quarante isolats de *Rhizobium* provenant de nodules de racines de légumineuses ont été examinés pour leur capacité de solubilisation du phosphate sur le milieu gélosé NBRIY. Des isolats de *Rhizobium* provenant de nodules racinaires de *Vicia sativa* et *Vicia faba* ont montré une zone de solubilisation du phosphate tricalcique (TCP). Le glucose a été sélectionné comme la meilleure source de carbone par toutes les souches bactériennes pour la solubilisation du phosphore, l'effet de changements de concentrations de glucose a montré l'apparition d'un halo autour de la colonie à partir du 6^{ème} jour de la souche 2Vsat 2L1 par contre, pour les autres souches, leur halo apparaît au cours du 3^{ème} jour. Il a été aussi observé que la concentration de glucose de 10g/l a montré une solubilisation maximale de phosphore chez la plupart des souches. Parmi les sources d'azote testées, une solubilisation maximale de 375% a été observée avec la tyrosine par la souche 2Vsat 1LC2.

Mots clés : *Rhizobium*, phosphore, solubilisation, *Vicia*.

Abstract :

Forty *Rhizobium* isolates from legume root nodules were examined for their phosphate solubilization capacity on NBRIY agar medium. *Rhizobium* isolates from root nodules of *Vicia sativa* and *Vicia faba* showed an area of tricalcium phosphate (TCP) solubilization. Glucose was selected as the best carbon source by all bacterial strains for phosphorus solubilization, the effect of changes in glucose concentrations showed the appearance of a halo around the colony from the 6th day of the 2Vsat 2L1 strain on the other hand, for the other strains, their halo appears during the 3rd day. It was also observed that the glucose concentration of 10 g / l showed maximum solubilization of phosphorus in most strains. Among the nitrogen sources tested, a maximum solubilization of 375% was observed with tyrosine by the 2Vsat 1LC2 strain.

Keywords: *Rhizobium*, phosphorus, solubilization, *Vicia*.

