

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

REZIGA Fatima Zohra

BOUZIANE Nor Imane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

**Isolement et caractérisation des bactéries solubilisant
phosphore à partir de la rhizosphère**

JURY

Président : *Mékhaldi A* *Professeur* U. Mostaganem

Encadreur : *Chibani .H.R* *MCB* U. Ain Témouchent

Examineur : *Djibaoui Rachid* *Professeur* U. Mostaganem

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Dieu « **ELLAH** » merci de nous avoir donné La chance de vivre et de pouvoir étudier.

Nos vifs remerciements, à nos parents pour leurs encouragements, soutiens moraux, tout au long de notre formation.

Un grand merci à **Melle. Chibani Hiba Rahman** pour nous avoir encadrées dans ce travail. Le regard critique, juste et avis qu'elle a porté sur nos travaux ne peut que m'encourager à être plus perspicace et engagée dans nos recherches.

Nous remercions **Mr. Hamoum Hakim** pour son aide tout au long de ce travail

Nous remercions **Mr. Djibaoui R** et **Mr. Mekhaldi A** d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions Notre responsable de promotion **Mr. Djibaoui** ainsi que tous les enseignants(es) qui ont contribué à notre formation chacun par son nom.

Nous remercions les responsables des laboratoires **Mm. Hafida, Mm. Haouria et Mr. Abaidi** qui nous a permis de travailler dans des conditions favorables.

Aussi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Modeste travail A tous ces personnes nous retirons nos remerciements du fond de cœur.

Dédicaces

C'est avec une immense joie que je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A tous mes frères : Chrif , Moussa , Abd Rahman et Anes.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés.

A ma chère binôme : Rzigá Fatíma Zohra.

BOUZIANE Nor Imane

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma très cher grand-mère qui a toujours cru en moi, pour les sacrifices et tous les efforts quelle est fait pour faire de moi la femme que je suis aujourd'hui.

Que dieu l'écompensé pour tous ces bienfaits.

Ma très chère maman a qui je souhaite bonne santé et longue vie.

Mon très cher « Papa Abdallah » que j'aurai tant voulu avoir auprès de moi le dernier jour de mes études comme je l'ai eu à mes cotés la première fois en allant à l'école, j'espère qu'il sera fier de moi.

Mon frère Ladjel et mes sœurs Hadil, Manar et Alou pour leur soutien, leur encouragement, leur affection et leur patience.

Mes tata Aicha, Hassnia et mon oncle Abdelkader qui su être la pour moi qui quand j'en avais besoin.

Mes cousines Soumia, Fatima et Asma et mon cousin Ibrahim.

Mes amies : Asma, Turkia, Amina, Imane, Fatima et Meriem.

REZIGA Fatima Zohra

Sommaire

Sommaire

| | |
|-----------------------------|-----|
| Résumé..... | I |
| Liste des abréviations..... | II |
| Liste des tableaux..... | III |
| Liste des figures..... | IV |
| Introduction..... | 1 |

Chapitre 1

Revue bibliographique

| | |
|--|----|
| 1. Généralité sur le phosphore..... | 03 |
| 1.1. Le phosphore dans le sol..... | 03 |
| 1.2. Différentes formes du phosphore dans le sol..... | 04 |
| 1.3. Rôle du phosphore dans la plante..... | 05 |
| 1.4. L'effet de la déficience en phosphore chez les plantes..... | 06 |
| 2. Diversité microbienne dans le sol..... | 06 |
| 2.1. La rhizosphère..... | 07 |
| 2.2. Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR)..... | 08 |
| 2.3. Principaux genres de PGPR (isolement des BSP) | 08 |
| 3. Les bactéries solubilisant le phosphate..... | 09 |
| 3.1. Mécanismes de solubilisation du phosphate..... | 10 |
| 4. Activité PGP des rhizobactéries | 13 |
| 4.1. Effet directe des PGPR sur la plante..... | 14 |
| 4.2. Effet indirect des PGPR sur les plantes..... | 18 |
| 5. Intérêt des PGPR pour l'agriculture..... | 20 |
| 5.1. Application de la technologie microbienne des PGPR..... | 21 |

Chapitre II

Matériels et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Échantillonnage du sol..... | 23 |
| 1.1. Lieu de l'expérimentation..... | 23 |
| 1.2. Localisation des sites de prélèvement..... | 23 |
| 1.3. Prélèvement des échantillons..... | 24 |
| 2. Analyses physico-chimiques du sol..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 3. Isolement des bactéries solubilisant du phosphate..... | 26 |
| 3.1. Purification des isolats bactériens..... | 26 |
| 4. Identification des isolats bactériens..... | 26 |
| 5. Solubilisation du phosphate..... | 28 |
| 7. Analyses statistiques..... | 29 |

Chapitre III

Résultats

| | |
|--|----|
| 1.Échantillonnage du sol..... | 30 |
| 2. Isolement des bactéries solubilisant du phosphate..... | 30 |
| 3. Identification phénotypique des isolats bactériens..... | 30 |
| 4. Solubilisation du phosphate..... | 34 |

Chapitre IV

Discussion

| | |
|--|----|
| 1. Analyse physique chimique..... | 41 |
| 2. isolements et identification des bactéries solubilisant le phosphate..... | 41 |
| Conclusion..... | 44 |

Références bibliographiques.

Annexe.

Résumé

La capacité des BSP à solubiliser le phosphate est considérée comme l'un des caractères les plus importants associés à la nutrition des plantes. Ces bactéries jouent un rôle important dans l'apport de phosphate aux plantes. L'objectif de la présente étude est l'isolement des bactéries solubilisant le phosphate ainsi que l'amélioration par mutation de leur potentiel de solubilisation de phosphate. Au cours de notre travail 23 bactéries ont été isolées à partir de la rhizosphère de lentille, artichaut, pois chiche, haricot et fève de deux régions différentes. Les isolats bactériens sélectionnés ont été testés pour leur capacité de solubilisation de phosphate tricalcique. Des quantités importantes de phosphore solubilisé par les isolats ont été enregistrées atteignant une valeur de 729 µg/ml de phosphore libre chez l'isolat GC1.

Mots clés : BSP, Mutation, Phosphate tricalcique,

Abstract

The ability of PSB to solubilize phosphate is considered to be one of the most important traits of plant nutrition. These bacteria play an important role in providing plants with phosphorus. The objective of the present study is the isolation of phosphate solubilizing bacteria as well as the improvement by mutation of their phosphate solubilizing ability. During our work 23 bacteria were isolated from the rhizosphere of lentil, artichoke, chickpea, bean and broad bean from two different regions. The selected bacterial isolates were tested for their ability to solubilize tricalcium phosphate. Significant amounts of phosphorus solubilized by the isolates were recorded reaching a value of 729 µg / ml of free phosphorus by the isolate GC1. For the improvement of phosphate solubilization.

Keywords: BSP, Mutation, Tricalcium phosphate,

الملخص

تعتبر قدرة BSP على إذابة الفوسفات من أهم السمات المرتبطة بتغذية النبات. تلعب هذه البكتيريا دورًا مهمًا في تزويد النباتات بالفوسفات. الهدف من هذه الدراسة هو عزل البكتيريا المذابة للفوسفات وكذلك التحسين عن طريق الطفرة في قدرتها على إذابة الفوسفات. خلال عملنا، تم عزل 23 بكتيريا من جذر العدس والخرشوف والحمص والفاصوليا والبقول من منطقتين مختلفتين. تم اختبار العزلات البكتيرية المختارة لقدرتها على إذابة ثلاثي فوسفات الكالسيوم. تم تسجيل كميات كبيرة من الفسفور المذاب بواسطة العزلات بلغت 729 ميكروجرام / مل من الفسفور الحر في العزلة GC1.

الكلمات المفتاحية: BSP ، الطفرة ، الفوسفات ثلاثي الكالسيوم ،

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole -3- Acétique

ANOVA : Analyse de la variance

BSP : Bactéries solubilisant le phosphate

BN : Bouillon nutritif.

DO : Densité optique

LB : Milieux Luria-Bertani

µg: microgramme

MSP : Microorganisme solubilisant le phosphate

NBRIP : De l'anglais "National botanical research institut of phosphate medium"

Nm : Nanomètre

P : Phosphore.

PGP : De l'anglais "plant growth promonte"

PGPB : De l'anglais "Plant Growth Promonting bacteria "

PGPR : De l'anglais "Plant growth promoting rhizobacteria"

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PI : Phosphore inorganique

PO : Phosphore organique

PSI : Résistance systémique induite

PVK : Pikovskaya

Tr/min : Tour par minute

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violets

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Quelques acides organiques produits par les PSB..... | 11 |
| Tableau 2: Promotion de la croissance des plantes et protection contre les maladies par les rhizobactéries..... | 21 |
| Tableau 3: Les informations géographiques des sites de prélèvements..... | 24 |
| Tableau 4: Analyses physico-chimiques des échantillons de sol prélevés..... | 30 |
| Tableau 5: Caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries sélectionnées.. | 32 |
| Tableau 6: Solubilisation de phosphate par les isolats bactériens..... | 36 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Représentation schématique de la rhizosphère..... | 07 |
| Figure 2: Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère.... | 14 |
| Figure 3: Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale..... | 17 |
| Figure 4: Fonctions biologiques des sidérophores..... | 20 |
| Figure 5: Localisation géographique de la region de Hadjadj (Google Maps)..... | 23 |
| Figure 6: Localisation géographique de la region de Mesra(Google Maps)..... | 24 |
| Figure 7 : Pourcentage de Gram négatif et positif des isolats bactériens..... | 31 |
| Figure 8 : Aspect microscopique d'isolat PC1..... | 33 |
| Figure 9: Aspect microscopique d'isolat LD2..... | 33 |
| Figure 10: Aspect microscopique d'isolat LB3..... | 34 |
| Figure 11: Aspect microscopique d'isolat PA1..... | 34 |
| Figure 12 : Solubilisation de phosphate par les isolats bactériens..... | 35 |

Introduction

Introduction

Le phosphore est un élément nutritif essentiel pour la croissance et le développement des plantes. Les ions ortho-phosphates représentent les seules formes de phosphore utilisable par les plantes. Dans les sols, ils sont généralement présents à de faibles concentrations dans la solution, en raison des nombreux processus géochimiques contraignant leur mobilité et disponibilité (**Plassard et al., 2015**). Une grande partie (95% à 99%) se trouve sous forme inaccessible aux végétaux (**khan et al., 2009**). De plus la majorité du phosphore soluble ajoutée au sol est soit absorbé (immobilisé) par le calcium, soit précipité par les formes libres de fer ou d'aluminium et ce selon le type de sol (**choudhury et al., 2007**).

En agriculture, le manque du phosphate est généralement compensé par l'ajout d'engrais chimiques phosphatés au sol. Cependant, il est rapidement immobilisé et devient donc inutile pour les plantes (**Mara et al., 2014**). De plus, le coût élevé des engrais, l'accumulation des contaminants phosphatés dans le produit agricole, les sous-produits de l'agroalimentaire et l'atmosphère, mais aussi l'accumulation de métaux lourds en trace dans le sol, grâce à leur effet nocif pour la plante, ont obligé à rechercher de meilleurs outils pour réduire l'utilisation de tels engrais chimiques (**Song et al., 2008 ; Sharma et al., 2013**). Parmi ces alternatives, l'utilisation de bactéries solubilisant le phosphates (PSB) est l'une des options les plus écologiques pour éviter ou minimiser l'utilisation exagérée des produits chimiques en agriculture (**Vijayalakshmi et al., 2016**) et pourraient être une source prometteuse comme agent bio-fertilisant dans l'agriculture (**Sharma et al., 2007**).

Les PSB sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (**Vessey, 2003**), ces micro-organismes permettent la disponibilité du phosphore pour les plantes par solubilisation des phosphates précipités (**Kucey et al., 1989; Pradhan et al., 2005**). Les BSP sont un groupe des bactéries utiles appartiennent au groupe hétérogène de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Ces dernières peuvent promouvoir la croissance des plantes grâce à plusieurs mécanismes à savoir la fixation biologique de l'azote, la synthèse des phytohormones, l'augmentation de la disponibilité du phosphate, la diminution du stress environnemental et la synergie avec d'autres microorganismes dans le sol (**Fuentes et al., 2005**). Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp.* (**subba rao, 1988 ; kucey et al., 1989**).

B. megaterium, *polymyxa*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis*, *sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (**Podile et al., 2006**).

L'objectif principal de notre travail consiste à isoler des bactéries solubilisant le phosphate.

Chapitre I

Revue

Bibliographique

1. Généralité sur le phosphore

Le phosphore est un élément essentiel à tous les organismes vivants. Chez les végétaux il joue un rôle indispensable dans de nombreux processus biologiques comme la croissance, la photosynthèse et la fixation symbiotique d'azote atmosphérique (**Marschner, 1995**). Il entre dans la composition de l'ADN ainsi que dans celle de l'ARN. Il est également impliqué dans les transferts d'énergie à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de molécules telles que l'ATP. Enfin, il entre dans la composition des phospholipides qui contrôlent la stabilité et les propriétés des membranes cellulaires (**Marschner, 1995**). En agronomie le phosphore est l'élément le plus important après l'azote.

1.1. Le phosphore dans le sol

Le phosphore est un constituant des roches. Les teneurs habituelles sont de 3 à 10% de P_2O_5 dans les roches éruptives et de 0.5 à 3 % dans les roches sédimentaires. Sur 1 à 2 m de profondeur, le sol contient plusieurs tonnes à l'hectare de P_2O_5 sous forme d'orthophosphate (PO_4^{3-}), qui sont soit cristallisés (avec Ca, Fe, Al), soit liés aux argiles ou la matière organique (**Frossard et al. 2004**). Les teneurs en phosphore sont exprimées en P_2O_5 et non en P. Certains auteurs anglophones utilisent P comme unité bien que traditionnellement l'usage est de P_2O_5 , et que cette forme n'existe ni dans les engrais, ni dans le sol, ni dans la plante.

Les plantes absorbent l'ion PO_4^{3-} à partir de la solution du sol, qui en contient une quantité très faible mais qui se renouvelle rapidement, par solubilisation des autres formes et par minéralisation de la matière organique. Les racines peuvent augmenter la solubilisation dans la rhizosphère, en modifiant le pH ou en excréant des acides organiques (**Guivarch, 2001; Morel, 2002**). Les racines fines et les poils absorbants, qui offrent une surface de contact importante avec le sol, permettent une absorption plus efficace du **phosphore** (**Li et al., 2003 ; Ström et al., 2005**). Le phosphore est présent en faibles concentrations dans la plupart des sols (**Hinsinger 2001; Raghothama 1999; Vance et al., 2003**). Il est le moins mobile des éléments nutritifs dans le sol (**Hinsinger, 2001**), ceci est dû à la réactivité des ions phosphate vis à vis de nombreux constituants du sol et à la rétention du phosphore par les phases solides du sol (**Hinsinger, 2001**).

1.2. Différentes formes du phosphore dans le sol

Les formes du phosphore dans le sol sont multiples et variées, La présence de chacune de ces formes dépend des conditions d'acidité, d'alcalinité ainsi que de l'activité biologique du sol considéré. Une première approche, permet d'identifier les formes suivantes :

1.2.1. Forme soluble (dans la solution du sol ou forme ionique)

C'est le phosphore dissout dans la solution du sol, forme ionisée de l'acide phosphorique $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} dont les proportions relatives dépendent du pH du milieu concerné. Ces formes sont à l'origine de la nutrition phosphatée des cultures (**Morel, 1996**). Selon Pereda Campos (2008), le phosphore de la solution du sol constitue moins de 1% du phosphore total, mais il est la source principale pour les végétaux. La quantité de phosphore contenant dans la solution du sol est cependant faible du fait de la très faible solubilité de cet élément : entre 0,5 et 1 mg/l en moyenne, ce qui représente entre 0,04 et 1,6 kg P/ha (**Doré et al., 2006**).

Le phosphore labile est une fraction de grande importance en agriculture puisqu'elle est facilement disponible aux plantes et peut être facilement lessivée (**Hedley et al., 1982; Sharpley et moyer, 2000**). Cette fraction représente le phosphore présent dans la solution du sol, le phosphore organique facilement minéralisé et les phosphates faiblement retenus sur les colloïdes argileux (**Demers, 2008**).

1.2.2. Forme minérale

La partie du phosphore dite inorganique (minérale) peut constituer une part importante (sinon majoritaire) des réserves en phosphore du sol (**Drouet, 2010**).

1.2.2.1. Phosphore échangeable (ou adsorbé sur les constituants du sol)

Les ions phosphates ont une charge électro-négative, ils sont retenus dans le sol par le biais de cations métalliques essentiellement par le Ca^{2+} . L'acide phosphorique est un anion, et ne peut être retenu par le complexe que par l'intermédiaire d'un cation: fer, aluminium, potassium, mais plus généralement le calcium (**Lambert, 1979**).

Ce sont les ions phosphoriques adsorbés sur le complexe adsorbant du sol ; ils participent aux échanges constants (sol-solution) et constituent l'essentiel du «pool alimentaire» des plantes (**Fardeau, 1991**).

1.2.2.2. Phosphore peu soluble ou précipité

Ces composés sont représentés généralement par les phosphates calciques, les **phosphates de fer et d'aluminium. (Hountin, 1996), ajoute qu'il ya plus de 200 formes de** phosphore minéral dans la nature ; les fluoroapatites sont les formes les plus couramment rencontrées sous forme de minerai et de composé de la plupart des sols cultivés.

D'une façon générale, le phosphore insoluble (et donc pas directement disponible) représente 95 à 99% du phosphore total ; le phosphore absorbé ou précipité est principalement sous forme de phosphate de fer ou d'aluminium dans les sols acides et sous formes de phosphate de calcium et de magnésium dans les sols alcalins et calcaires. La distribution relative entre les différentes catégories et la disponibilité dépend notamment du pH du sol **(Pereda Campos, 2008).**

1.2.3. Phosphore organique

Les sols contiennent des formes très variées de Po. On distingue, en fonction des liaisons existant entre atomes de P et de O ou C, des monoesters-P, des diesters-P, et en plus faible proportion des phosphonates et des polyphosphates et des pyrophosphates. Les formes organiques de P ne sont pas disponibles pour les racines. Elles doivent d'abord être hydrolysées par des enzymes de la famille des phosphatases, produites par les racines, les bactéries et les champignons, pour libérer du Pi qui peut être prélevé **(Richardson et al., 2001; Zimmermann, 2003)**. De plus la fertilisation en Pi n'est pas une voie d'avenir, compte tenu à la fois de l'épuisement futur des stocks et des problèmes environnementaux qu'elle procure (eutrophisation). Une des voies alternatives possible serait une optimisation de l'utilisation du P organique présent dans les sols et les amendements organiques (fumier, compost etc....). Le phosphore organique représente de 20 à 80% du phosphore du sol ; Il est présent sous forme de phosphore soluble dans la solution du sol et sous forme de phosphore insoluble absorbé sur les particules du sol ou comme composant de la matière organique du sol **(pereda campos, 2008)**. Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) **(Mengel et Kirby, 1987)**.

1.3. Rôle du phosphore dans la plante

Le phosphore est l'un des constituants jouant un rôle-clé pour la plante (Rifat, *et al.*, 2010), il forme avec l'azote et le potassium un groupe de composé essentiels pour la survie des êtres vivants. Le phosphore joue divers rôles vis-à-vis les plantes. En d'autre terme, il

intervient dans le phénomène de photosynthèse en tant que fixateur et transporteur d'énergie et favorise également (**Behera et al., 2013**) :

- une bonne croissance.
- Un bon développement racinaire et un accroissement de la masse des racelles, favorisant ainsi l'amélioration et la croissance de la plante.
- La rigidité des tissus, ainsi ils sont plus résistants à la verse et aux maladies dues à des champignons.
- La reproduction à travers une bonne fécondation et une bonne fructification.
- La qualité des produits (tissus riches en phosphore) pour l'alimentation des hommes et des animaux.

Finalement, une alimentation adéquate et convenable en P permet un développement harmonieux des plantes qui peuvent prélever les quantités nécessaires de nutriments dont elles ont besoin (**Khan, et al., 2014**).

1.4. L'effet de la déficience en phosphore chez les plantes

La déficience en phosphore entraîne une réduction très importante de la croissance foliaire mais le taux de la photosynthèse n'est que faiblement affecté (**Nielsen et al., 2001**). La réduction de la biomasse aérienne sous l'effet de la déficience phosphatée entraînant une faible demande pour les photoassimilats et favorise la translocation du C vers les racines qui se développent d'avantage en quête de phosphore (**Nielsen et al., 2001**).

En réponse au manque de P, les plantes développent plus leur enracinement, augmentent le taux de prélèvement via le sol, mobilisent plus de P à partir des feuilles âgées et mobilisent celui stocké dans les vacuoles (**Schachtman et al., 1998**).

Snapp et Lynch (1996) ont trouvé que les racines conservaient le phosphore en conditions limitantes en cet élément à la différence des tiges et des feuilles qui le mobilisaient vers les graines en croissance aussi bien en conditions de suffisance qu'en condition de déficience.

2. Diversité microbienne dans le sol

Le sol constitue un réservoir de biodiversité microbienne de grand intérêt sur la terre. En effet, il est considéré comme un support de la vie terrestre, où on trouve une large diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) jouant des rôles primordiaux

dans la biotransformation et le transfert des éléments ou des composés. Ces activités biologiques sont intimement liées à une large diversité fonctionnelle et à une importante variété d'interactions écologiques très complexes. L'ensemble de ces processus sont assurées par des organismes divers (bactéries, champignons, protozoaires, racines et faune). Les organismes du sol ont un impact aussi sur la production végétale que ce soit de façon directe ou indirecte (modification des cycles de carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites pathogènes). (Lynch, 1990 ; Cherif, 2014).

2.1. La rhizosphère

Le sol est défini comme étant une entité naturelle vivante et dynamique sur la surface de la terre. Il est constitué d'une phase solide (matière inorganique et organique des organismes vivants), d'une phase liquide (solution de sol) et d'une phase gazeuse (dioxyde de carbone, de l'oxygène, de l'azote) (Gobat *et al.*, 2004).

La rhizosphère peut être définie comme le volume de sol autour des racines vivantes, et dont les propriétés sont influencées par la présence et l'activité de la racine, correspondant ainsi à l'interface sol-plante (Jossi, 2008 ; Hinsinger *et al.* 2009). Les modifications apportées aux propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol de la rhizosphère ont une influence significative sur la croissance ultérieure et la santé des plantes (Richardson *et al.* 2009).

La rhizosphère est constitué par des racines (rhizoplan), l'intérieur des racines (endorhizosphère), et du sol rhizosphérique, correspondant au sol environnant soumis à l'influence de la racine (exorhizosphère) (Jossi, 2008) (Figure 1).

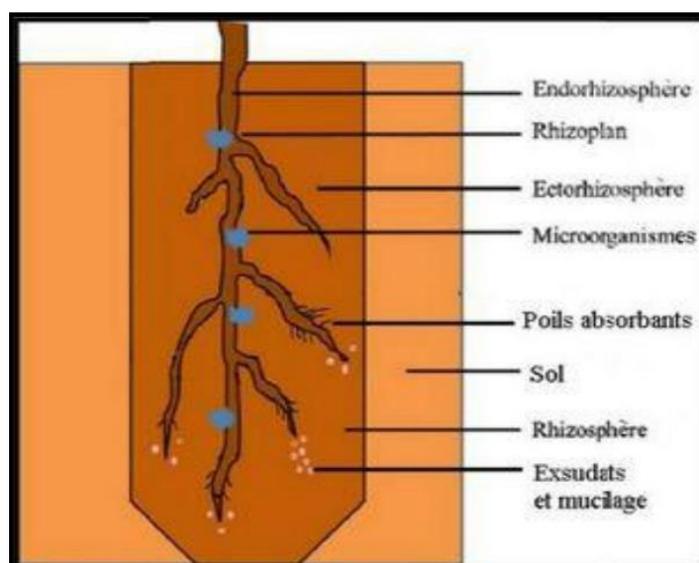


Figure 1 : Représentation schématique de la rhizosphère (Lynch et Whipps, 1990).

2.2. Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR)

Le terme PGPR a été proposé pour la première fois par Kloepper, en 1980. Ce dernier a utilisé des *Pseudomonas fluorescens* comme stimulateurs de croissance capables de résister aux phytopathogènes. Ce terme s'est métamorphosé pour inclure toute rhizobactérie capable d'améliorer la croissance végétale. Parmi les rôles majeurs attribués à l'action des PGPR, la protection contre les pathogènes, l'augmentation l'absorption des nutriments, l'amélioration des fonctions racinaires, de la germination et de la production des graines sont les plus notables (Amir *et al.* 2005 ; Kenneth *et al.* 2019). Le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés.

De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques (Lynch, 1990 ; Cook *et al.*, 1995). Afin d'optimiser les interactions favorables et développer des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement il est nécessaire de mieux connaître le mécanisme de ces interactions. Actuellement, l'inoculation par les microorganismes tels que les champignons mycorhizogènes (Elhassan *et al.*, 2010 ; Gianinazzi *et al.*, 2010) et les bactéries fixatrices d'azote (Elhassan *et al.*, 2010) représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance et la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique.

2.3. Principaux genres de PGPR

Les PGPR forment un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être trouvées dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, qui peuvent améliorer, la qualité de croissance de la plante. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genre et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002). De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers. Elles sont majoritairement composées d'espèces du genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, et *Pseudomonas* et sont considérés comme inoffensifs pour la plante hôte, la densité de leurs population est souvent très élevés (10^8 bactéries/g des racines) (Weller, 1988; Lugtenberg *et al.*, 2001).

- **Les bactéries de genre *Bacillus***

Les bacillus forment un genre des bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacees (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (Bacillales), la classe des bacilles (Bacilli).

Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. C'est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (**Nagorska et al., 2007**) elles sont capables de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, sidérophore et antibiotique métabolite (**Charest et al., 2005**). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées au voisinage des racines des plantes ou certaines espèces ont un rôle dans le cycle de carbone et l'azote.

- **Les bactéries du genre *Pseudomonas***

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonales. Ce sont des bacilles à gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0.5 µm (**Palleroni, 1984**).

Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme source de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (**Höfte et de vos., 2006**), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (**Reyes et al., 2004**).

3. Les bactéries solubilisant le phosphate

Bactéries solubilisant phosphate BSP sont un groupe des bactéries utiles appartiennent au groupe hétérogène de PGPR, capables d'hydrolyser phosphore organiques et inorganique en formes accessible, et sont fréquentes dans la rhizosphère (**Chen et al., 2006**). Les BSP jouent un rôle dans la nutrition de phosphore en améliorant sa disponibilité pour les plantes grâce à la libération à partir de pools sol de phosphore inorganiques et organiques par solubilisation et de la minéralisation. Ces micro-organismes augmentent la performance globale des plantes en fournissant Phosphore principalement soluble aux plantes dans les systèmes de production différents (**Khan et al., 2014**).

L'utilisation de PSB comme inoculant augmente l'absorption de P par les plantes. Inoculation simple de graines avec les PSB donne des rendements des cultures

réponses équivalentes à 30 kg P₂O₅/ ha ou 50 pour cent de la nécessité pour les engrais phosphatés. (**Baldani et al., 2000**).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient donc constituer une source prometteuse comme agent bio-fertilisant dans l'agriculture (**Sharma et al., 2007**). Les micro-organismes solubilisant le phosphate (MSP) ont été considérés comme les meilleurs moyens écologiques pour la nutrition des cultures par le phosphate.

Un nombre important d'espèces microbiennes ayant la capacité de solubilisation du phosphate a été isolé et identifié ; celles-ci comprennent des bactéries, des champignons, des actinomycètes et même des algues microscopiques. En plus de *Pseudomonas* et de *Bacillus*, d'autres bactéries se sont identifiées comme solubilisant le phosphate, il s'agit de : *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Delftia* sp. (**Wani et al., 2005; Chen et al., 2006**), *Azotobacter* (**Kumar et al., 2001**), *Xanthomonas* (**De Freitas et al., 1997**), *Enterobacter*, *Pantoea*, et *Klebsiella* (**Chung et al., 2005**). Alors que la flore fongique solubilisant le phosphate, est représentée essentiellement par les genres, *Aspergillus* et *Penicillium* (**Seshadi et al., 2004**).

3.1. Mécanismes de solubilisation du phosphate

Les PSB ont la capacité de solubiliser le P organique ou inorganique par l'utilisation de plusieurs mécanismes : abaissement du pH du sol par la production d'acides organiques, la libération de protons et aussi la minéralisation par production d'acide phosphatase.

3.1.1. Solubilisation du phosphate minéral

3.1.1.1. Par les acides organiques

Il est généralement connu que la production des acides organiques par les PSB est considérée comme le principal mécanisme par lequel le P inorganique est solubilisé. La quantité du P soluble libéré dépend de la force et du type d'acide organique produit (**Rodriguez et Fraga 1999**). Les acides organiques sont les produits des métabolismes microbiens, principalement par respiration oxydative ou par fermentation de sources comme le glucose (**Kumar et al. 2016 ; Gowami et al., 2019**).

L'acide gluconique semble être l'agent le plus fréquent de la solubilisation du Pi. Il est considéré comme le principal acide organique produit par les PSB telles que *Pseudomonas*

sp., *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* et *Burkholderia cepacia* (Behera *et al.*, 2014 ; Satyaprakash *et al.*, 2017). L'acide 2-cétogluconique produit par des souches PGPR telles que *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus firmus* (Kim *et al.*, 2003). Des souches des *Bacillus liqueniformis* et *B. amyloliquefaciens* produisent des mélanges d'acides lactique, isovalérique d'iso butyrique et acétique (Tableau 1). D'autres acides organiques, tels que l'acide glycolique, oxalique, malonique, fumarique, tartrique, propionique et succinique, ont également été identifiés (Kumar *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Quelques acides organiques produits par les PSB (Hansali et Banouh, 2020).

| Acide organique | Bactérie productrice | Références |
|-------------------------|--|--|
| Acide gluconique | <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Burkholderia cepaci</i> <i>Enterobacter intermedium</i> <i>Bacillus spp</i> | Oteino <i>et al.</i> , 2015 Babu-Khan <i>et al.</i> , 1995 Liu <i>et al.</i> , 1992 Kim <i>et al.</i> , 2002 Zhao <i>et al.</i> , 2014 Saeid <i>et al.</i> , 2018 |
| Acide 2- cétogluconique | <i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Enterobacter intermedium</i> | Srishty <i>et al.</i> , 2019 Barman <i>et al.</i> , 2019 Gull <i>et al.</i> , 2004 KIM <i>et al.</i> , 2003 |
| Acide acétique | <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> | Rfaki <i>et al.</i> , 2020 |
| Acide citrique | <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Serratia marcescens</i> | Rfaki <i>et al.</i> , 2020 Mohamed <i>et al.</i> , 2018 |
| Acide lactique | <i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Saeid <i>et al.</i> , 2018 Kim <i>et al.</i> , 2017 |
| Acide propionique | <i>Bacillus megaterium</i> | Gull <i>et al.</i> , 2004 Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Acide isovalérique | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Kim <i>et al.</i> , 2017 |
| Acide isobutyrique | <i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Behera <i>et al.</i> , 2013 |

3.1.1.2. Par les acides inorganiques

Les acides inorganiques tels que l'acide sulfurique, nitrique et carbonique peuvent également participer à l'abaissement du pH et donc à la solubilisation du phosphate dans le sol. Certaines espèces bactériennes sont capables d'en produire, mais leur efficacité et leur contribution à la libération du P assimilable dans les sols semble inférieure et moins efficace (**Rodriguez et Fraga, 1999 ; Kumar *et al.*, 2016**).

3.1.1.3. Autres mécanismes

Une souche de *Pseudomonas* s'est montrée incapable de produire aucun acide organique malgré son caractère PSB. Cependant, il a été hypothétisé que sa capacité à solubiliser le P est due à la libération accrue de proton H^+ provenant de l'assimilation d'ammonium NH_4^+ comme source d'azote. L'acidification par libération de proton H^+ dans le milieu est considérée comme un mécanisme alternatif de solubilisation du Pi. Il est crucial de signaler que la souche *Pseudomonas* en question provoque une acidification significativement plus élevée en utilisant l' NH_4^+ , comme seule source d'azote inorganique, comparée à d'autres sources (**Kumar *et al.*, 2016 ; Prabhu *et al.*, 2019**).

3.1.2. La minéralisation du phosphate organique

Le P organique peut constituer de 4 à 90% du P total du sol, sa solubilisation est également appelée minéralisation. La dégradation des composés organiques du P dépend principalement de la physicochimie et du potentiel biochimique d'un sol. A titre d'exemple, les acides nucléiques, les phospholipides, et les phosphates de sucre se décomposent facilement, cependant l'acide phytique, les polyphosphates et les phosphonates se décomposent plus lentement (**Rodriguez et Fraga, 1999 ; Maharajan *et al.*, 2017**).

Selon Behera *et al.*, (2014), le P peut être libéré des composés organiques du sol par trois groupes d'enzymes:

- Les phosphatases (phosphohydrolases), qui effectuent la déphosphorylation des liaisons phospho-ester ou phosphoanhydride liés aux matières organiques,
- Les phytases, qui provoquent spécifiquement la libération de P de l'acide phytique.
- Les phosphonatases et le C-P Lyases, enzymes qui effectuent le clivage de la liaison C-P dans les organophosphonates.

3.1.2.1. Par les Phosphatases (phosphohydrolases)

D'après Khan *et al.*, (2009) de nombreux PSB tels que *Emericella rugulosa*, *Serratia marcescens*, *Chaetomium globosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes* et *Citrobacter freundii* ont développé une enzyme libératrice du Pi à partir des complexes organophosphorés, cette enzyme est appelée phosphatase. En fonction de leurs pH optimaux d'activité, ces enzymes sont classées en phosphatases alcalines (pH > 7) ou acides (pH < 6). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du phosphate à partir de nombreuses macromolécules (alcools primaires, secondaires et cycliques, phénols et amines). Plusieurs gènes de phosphatase acide des bactéries Gram négatives ont été isolés et caractérisés.

2.1.2.1. Par les Phytase

Les phytases des PSB permettent la libération du P assimilable à partir des phytates, principales formes organiques du P dans le sol (Behera *et al.*, 2014 ; Satyaprakash *et al.*, 2017; Billah *et al.*, 2019).

4. Activité PGP des rhizobactéries

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects, bien que la différence entre les deux n'est pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes (Gupta *et al.*, 2000).

De plus, les PGPR peuvent contribuer dans l'amélioration de la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds) Sur la base de leur activités (Somers *et al.*, 2004). Ont classé les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques) (Figure 2).

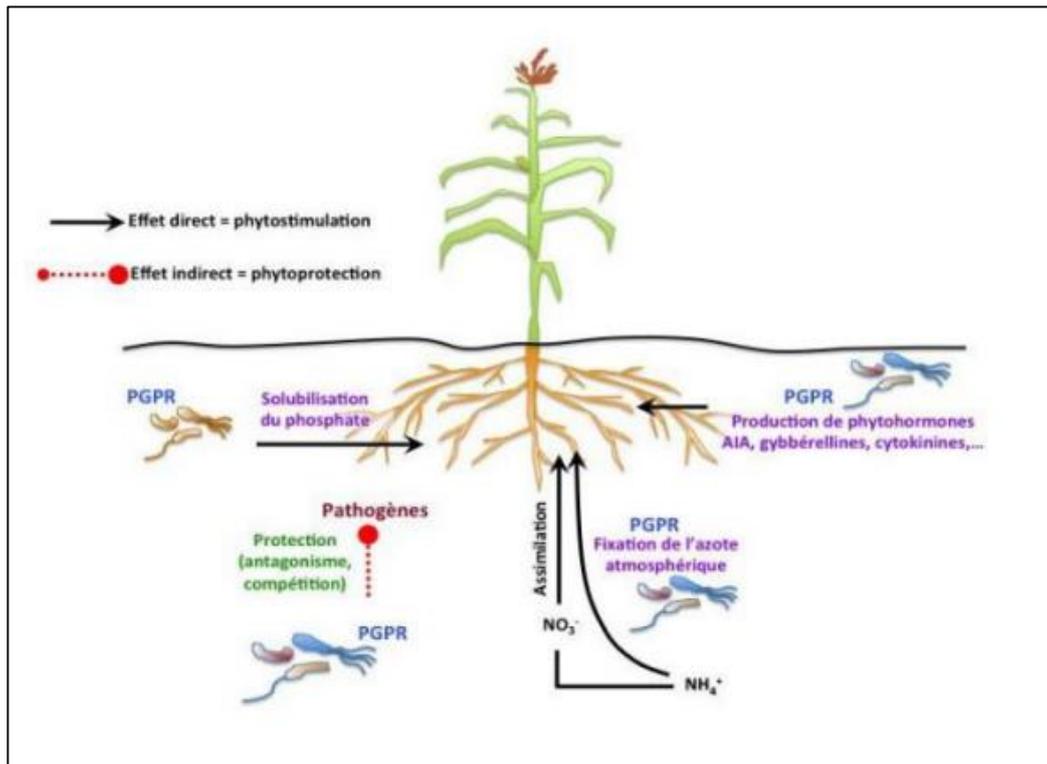


Figure 2: Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009)

4.1. Effet directe des PGPR sur la plante

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (Munees et Mulugeta, 2014).

4.1.1. Fixation d'azote

L'azote se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N_2), inaccessible aux animaux et aux plantes où aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique et de l'utiliser directement pour sa croissance (Pujic et Normand, 2009 ; Arora *et al.*, 2012).

Les PGPR les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter* *Paenibacillus* et *Azospirillum brasilens*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (Weyens *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2012).

La rhizobia est un vaste groupe de rhizobactérie qui ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques par la colonisation et forme de nodules racinaires dans le végétale, dans lesquelles l'azote est fixé en ammoniacque qui est rapidement transformé en nitrates et le rendre disponible pour l'hôte ; La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules dans lesquelles se produit la fixation de l'azote (**Munees et Mulugeta, 2013**).

4.1.2. Solubilisation du potassium

C'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (**Parmar et Sindhu, 2013**). En outre, en raison de l'application déséquilibrée des engrais, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes dans la production végétale. Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles. (**Kumar et Dubey, 2012**). On a signalé que les microorganismes des sols jouaient un rôle clé dans le cycle K naturel et, par conséquent, les microorganismes solubilisant de potassium présents dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (**Rogers et al., 1998**).

4.1.3. Production des phytohormones

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des substances qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes produisent des phytohormones telles que les auxines, les cytokines, les gibbérellines et l'éthylène peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs et d'eau (**Arora, 2013**).

4.1.3.1 L'auxine

Le nom auxin a été donné par Charles Darwin à la première phytohormone découverte en référence au terme « αυξειν », un mot grec signifiant croître ou augmenter. (**Went et Thimann, 1937; Kende et Zeevaart, 1997**). L'acide indole acétique (AIA) est l'auxine la plus couramment étudié. C'est une molécule essentielle qui régule directement ou indirectement la plupart des processus des plantes (**Kenneth et al., 2019; Spaepen., 2007**).

- **Acide Indole Acétique (AIA)**

Les plantes ont développé des systèmes élaborés pour réguler les niveaux cellulaires de l'AIA (Normanly et Bartel, 1999). L'AIA représente l'une des hormones végétales les plus importantes, ce qui renforce de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes tout au long du cycle cellulaire de la plante, de la division cellulaire, de l'allongement cellulaire et de la différenciation (Guilfoyle *et al.*, 1998).

Généralement, AIA affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales; Stimule la germination des semences et des tubercules; augmente le taux de développement du xylème et des racines; Contrôle les processus de croissance végétative; Initie la formation de racines latérales et accidentelles; médiatise les réponses à la lumière, à la gravité et à la fluorescence; affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance à des conditions stressantes. En outre, l'AIA bactériennes augmentant la surface et la longueur de la racine et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol. De plus, l'AIA rhizobactérien facilite une augmentation de l'exsudation des racines qui fournit des nutriments supplémentaires pour soutenir la croissance des bactéries rhizosphériques (Glick, 2012).

Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes. Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Cherif, 2014) (Figure 3).

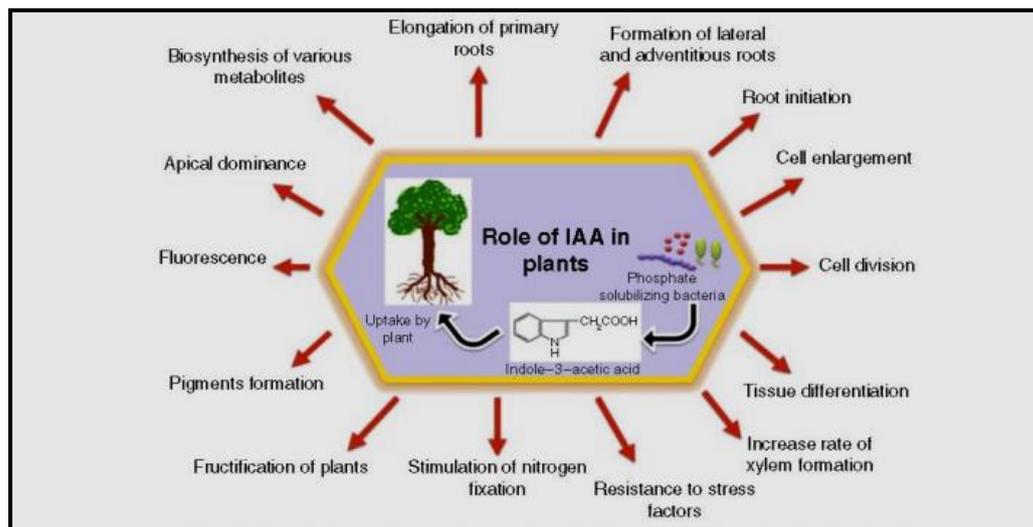


Figure 3 : Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.* , 2009).

4.1.3.2. Les cytokinines et les gibbérellines

Les cytokinines et les gibbérellines sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loon., 2007). Les Gibbérellines forment le groupe de phytohormones impliqué dans la modification de la morphologie de la plante par l'extension des tissus, en particulier de la tige. Ils affectent les processus de reproduction dans une large variété de plantes et retarde la sénescence des fruits et des feuilles. Les cytokinines sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines (Hopkins, 2003 ; De Salamone *et al.*, 2005).

4.1.3.3 L'éthylène

L'éthylène est un régulateur impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes à des concentrations modérées. Dans les conditions du stress (salinité, pollution par les métaux lourds...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (Saleem *et al.*, 2007).

4.2. Effet indirect des PGPR sur les plantes

Ce mécanisme repose sur la capacité des PGPR à réduire les effets nocifs pour la plante : la dégradation des xénobiotiques dans les sols contaminés par la production des métabolites qui sont toxiques aux pathogènes du sol, et l'hydrolyse des molécules libérées par des agents pathogènes. L'effet phytobénéfique indirect des bactéries PGPR résulte d'interactions entre PGPR et des pathogènes et/ou parasites de la plante, à l'occasion desquelles les effets négatifs de ces derniers sont diminués (**Ramette *et al.*, 2006 ; Rezzonico *et al.*, 2007**). Parmi les mécanismes d'action indirectes des PGPR : (1) La compétition pour l'espace et les nutriments, (2) la production de sidérophores et de composés allelochimiques inhibiteurs et (3) l'induction de la résistance systémique (RSI) dans les plantes hôtes à un large spectre d'agents pathogènes (**Ryu *et al.*, 2004; Haas et Défago, 2005**).

4.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour l'espace et les nutriments est l'un des mécanismes utilisés par les PGPR pour éliminer les phytopathogènes (**Dommergues, 1976; Shameer et Prasad, 2018**). Une réduction de la maladie dans certains cas, peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (**Piano *et al.*, 1997**).

Mais cette relation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale (**Reyes *et al.*, 2004**). Toutefois, la compétition pour les nutriments se produit généralement entre les microorganismes du sol. Les PGPR fixateurs du fer, par exemple, inhiberont la croissance des pathogènes d'une part et favoriseront celle des plantes d'une autre part (**Haas et Defago, 2005 ; Pal *et al.*, 2006**).

4.2.2. L'antibiose

La production et la libération des molécules qui tuent ou réduisent la croissance des pathogènes cibles est le mécanisme le plus efficace par lequel les microorganismes peuvent contrôler les maladies des plantes, (**Harman et Shores., 2007**). Il consiste à produire des antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène par l'agent antagoniste. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'amphicine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure

d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes. (Corbaz, 1990; Babalola, 2010; Shameer et Prasad, 2017).

4.2.3. Production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands, 1995). Cet oligoélément est soumis à une forte compétition. Certaines bactéries sont capables de séquestrer le fer du milieu environnant via des molécules appelées sidérophores. Ces sidérophores se lient avec l'ion ferrique et forment un complexe sidérophore-ferrique qui se lie ensuite avec des récepteurs dépendants de la suspension de fer à la surface de la cellule bactérienne. L'ion ferrique est ensuite relâché et actif dans le cytoplasme comme ion ferreux. Beaucoup de plantes peuvent utiliser divers sidérophores bactériens comme sources de fer (Figure 4). Diverses bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* de la rhizosphère (Kuffner *et al.*, 2008).

4.2.4. Induction d'un système de résistance

PGPR peut déclencher chez la plante un phénomène connu sous le nom d'induction de la résistance systémique qui est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise qui se produit lorsque la plante active ses mécanismes de défense en réponse à une infection par un agent pathogène (Corné *et al.*, 2009). Les plantes inoculées avec des PGPR peuvent également fournir une résistance systémique contre un large éventail de pathogènes végétaux. Les maladies d'origine fongique, bactérienne et virale et, dans certains cas, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'application de PGPR (Naznin *et al.*, 2012). Il confère à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire (Cherif, 2014).

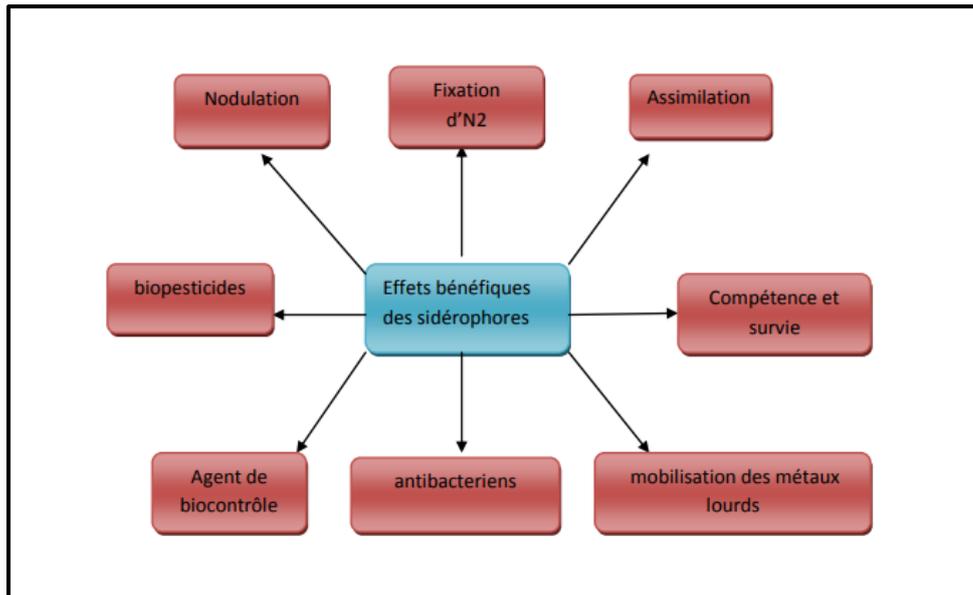


Figure 4: Fonctions biologiques des sidérophores (Khan *et al.*, 2009).

5. Intérêt des PGPR pour l'agriculture

Au cours des dernières années, plusieurs études et expériences menés à travers le monde aux champs ou sous serre ont montré des résultats favorables concernant l'inoculation des cultures végétales par les PGPR (Bresson, 2013). En se basant sur ces données, il apparaît clairement que l'inoculation peut être considérée comme une technologie émergente et écologiquement très intéressante vue les augmentations significatives des rendements de diverses cultures, même dans des conditions sévères. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes (Tableau 2). Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van Loon, *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Ainsi, l'inoculation des plantes par les PGPR a induit une modification coordonnée des mécanismes physiologiques allant tous dans le sens d'une optimisation du prélèvement de l'eau dans le sol et une réduction des pertes d'eau par les feuilles (Pantin *et al.*, 2013).

Tableau 2: Promotion de la croissance des plantes et protection contre les maladies par les rhizobactéries (Mauricio, 2010).

| Rhizobactéries | Culture | Effet | Référence |
|---------------------------------|-----------|--|------------------------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Betterave | Meilleure résistance aux maladies | Moenne-Loccoz <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Tomate | Meilleure résistance aux maladies | Benhamou <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Riz | Promotion de la croissance des plantes | Vasudevan <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | Blé | Promotion de la croissance des plantes | Kim <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Pseudomonas fluorescence</i> | Blé | Promotion de la croissance des plantes | De Freitas et Germida, 1992 |

5.1. Application de la technologie microbienne des PGPR

L'application de la technologie microbienne des PGPR dans le domaine des cultures agricoles est qualifiée parmi les pratiques les plus fiables, vue l'augmentation et la qualité du rendement de la productivité agricole (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Les souches *Pseudomonas* BA-8 et *Bacillus* OSU-142 appliquées sur les feuilles et les fleurs des pommiers ont considérablement amélioré le rendement de la superficie de la section transversale du tronc (de 13,3 à 118,5%), le poids des fruits (4.2 à 7.5%), la longueur des tiges (de 20,8 à 30,1 %), et le diamètre des tiges (9,0 à 19,8%) par rapport au témoin (Pirlak *et al.*, 2007). Ainsi, les combinaisons *Bacillus* M3 et/ou OSU-142 et/ou *Microbacterium* FS01 ont le potentiel d'accroître le rendement et la croissance des pommiers. En outre, *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 et M3 ont également donné un effet bénéfique sur la longueur, le rendement des cultures et la qualité des fruits d'abricot, de cerise et de framboise (Esitken *et al.*, 2005 ; Orhan *et al.*, 2006). Le poids moyen des fruits de tomate par plante traitée avec *Rhodopseudomonas* sp KL9 (82,7 g) est supérieur par rapport au témoin non inoculé.

La teneur en lycopène dans la tomate mûre a augmenté de 48,3% avec l'application de 13 *Rhodopseudomonas sp.* KL9 (Lee *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que *Burkholderia gladii* BA-7, *Pseudomonas* BA-8, et *Bacillus OSU-142* ont un grand potentiel pour accroître les paramètres de croissance des plantes de *Eruca sativa* (Dursun *et al.*, 2008). Les espèces efficaces de *Bacillus*, comme OSU-142, RC07 et M-13, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *P. putida* RC06 et RC04 et *Rhodobacter capsulatus* peuvent être utilisées dans l'agriculture biologique et durable. De nombreux travaux ont prouvé le potentiel de ces bactéries dans la croissance et le rendement des plantes (De Freitas, 2000; Herman *et al.*, 2008).

Actuellement, diverses formulations commerciales de PGPR sont en vente. Des formulations bactériologiques de *Rhizobium sp.* sont disponibles dans plusieurs pays afin de favoriser la nodulation des légumineuses et de diminuer la fertilisation azotée des cultures. La formulation Zea-nit Plus est en vente en Italie. Il s'agit d'un inoculum à base d'*Azospirillum sp.* développé pour inoculer le maïs. De même, la formulation Quantum 4000, à base de *Bacillus subtilis*, est commercialisée aux États-Unis pour lutter contre le *Rhizoctonia solani* Kühn chez l'arachide, le haricot et le coton. Depuis 1985 En Chine, des PGPR qui accroissent les rendements sont utilisées dans plusieurs cultures (Beauchamp, 1993).

Chapitre II

Matériels et

Méthodes

1. Échantillonnage du sol

1.1. Lieu de l'expérimentation

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie N° 01 de l'université « ABDLHAMID IBN BADIS » de Mostaganem pendant une période de 2 mois et demi.

1.2. Localisation des sites de prélèvement

Les échantillons de sol ont été collectés de la rhizosphère de différentes plantes à savoir : la lentille , l'artichauts, le poischiche, le haricot et la fève de deux régions différentes :

Region 1 : Les échantillons de lentille, artichaut, poischiche, haricot et fève ont été prélevés le 17 Février 2021 de la région « Hadjadj » qui est limitée du nord par la mer Méditerranée , du sud par la commune de Sidi – Belatar , de l'ouest par la commune de Ben – Abdel Malek Ramdane et de l'est par les communes Sidi – Ali et Sidi – Lakhdar.

Region 2: un autre échantillon de fève a été prélevé le 17 février 2021 de la région « Mesra » situé à 13 Km au sud-est de Mostaganem.

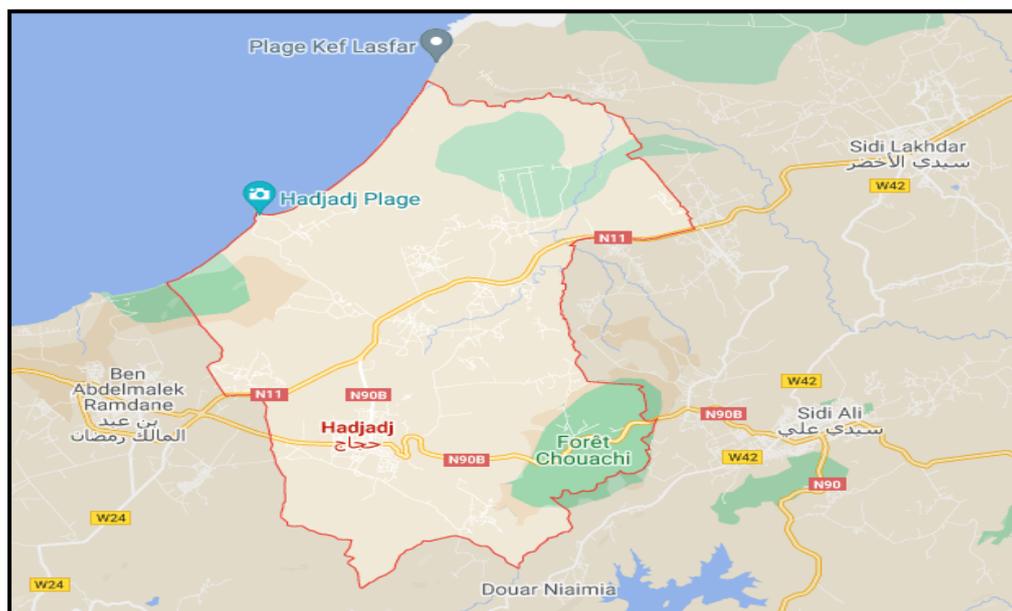


Figure 5 : Localisation géographique de la région de Hadjadj (Google Maps).

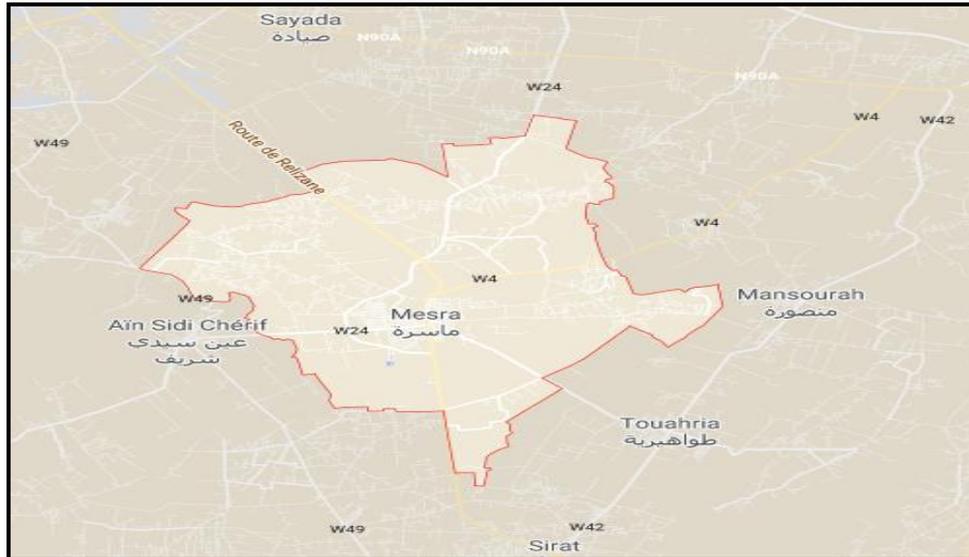


Figure 6: Localisation géographique de la region de Mesra(Google Maps).

Tableau 3 : Les informations géographiques des sites de prélèvement.

| Echantillon | Plante | Date d'échantillonnage |
|--------------------|---------------|-------------------------------|
| A | Lentille | 17/04/2021 |
| B | Artichaut | 17/04/2021 |
| C | Pois chiche | 17/04/2021 |
| D | Haricot | 17/04/2021 |
| E | Fève | 17/04/2021 |
| F | Fève | 17/04/2021 |

1.3. Prélèvement des échantillons

Afin d'isoler des bactériessolubilisant du phosphate, des prélèvements de six échantillons (A, B, C, D, E et F) à partir de la partie rhizosphérique du sol ont été effectués à une profondeur variant de 0 à 15 cm, ces échantillons ont été mis dans des sachets fermés préalablement stérilisés dans un autoclave, puis transportés directement au laboratoire. Les échantillons recueillis ont été tamisés pour éliminer les cailloux et les gros débris de matière organique. Chaque échantillon de sol ainsi obtenu a été divisé en deux parties. Une première moitié pour l'analyse physico-chimique du sol et l'autre moitié pour l'isolement.

2. Analyses physico-chimiques du sol

La qualité physico-chimique du sol est importante à connaître car elle conditionne la diversité de la microflore tellurique.

2.1. Humidité

L'humidité est une mesure importante pour la détermination du potentiel de production d'une culture. 20 g de chaque échantillon du sol prélevé ont été séchés dans un four pasteur pendant 72 h à 70°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le poids frais et le poids sec des échantillons ont été déterminés et l'humidité est ensuite calculée selon la formule suivante:

$$\text{Humidité \%} = \frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{Poids humide}} \times 100$$

2.2. Mesure du pH

Pour la détermination du pH du sol, 20 g du sol frais de chaque échantillon ont été mélangés avec 40 ml d'eau distillée sous agitation vigoureuse à l'aide d'un agitateur pendant 30 min (Pauwels *et al.*, 1992). Le pH des solutions a été déterminé à l'aide d'un pH mètre.

3. Isolement des bactéries solubilisant du phosphate

L'isolement des bactéries solubilisant le phosphate a été effectué selon la méthode de suspensions-dilutions décrite par Vidhyasekaran *et al.*, (1997). Environ 10g de chaque échantillon (A, B, C, D, E, F) ont été mélangés avec 90 ml d'eau physiologique stérile (NaCl : 9 g/L), les solutions ont été bien agitées pendant 30 min pour une bonne homogénéisation. 1 ml de la solution mère a été introduite dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de 10^{-1} . Une série de dilution a été préparée jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-7} (Tamietti et Pramotton, 1990) . 500 μ L (0,5ml) des dilutions de 10^{-6} et 10^{-7} ont été étalées sur le milieu gélose nutritive (Annexe 1).

Les boîtes de Pétri portant les indications nécessaires (dilution, type du milieu de culture, origine de l'échantillon, la date) ont été incubées à 30°C pendant 24-72 heures. Ces mêmes dilutions ont été étalées sur le milieu Pikovskaya (PVK) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme seule source de phosphate (Pikovskaya, 1948) (Annexe 1) . La capacité de solubilisation a été évaluée par la formation d'un halo transparent autour de la colonie bactérienne après 10 jours d'incubation à 30°C.

3.1. Purification des isolats bactériens

Les bactéries obtenues ont été purifiées par la méthode des stries en partant du principe qu'une bactérie donne naissance à une colonie, d'où l'importance d'obtenir des colonies bien isolées. Les colonies bactériennes ont été repiquées plusieurs fois à l'aide d'une anse en platine flambée au bec bunsen dans des conditions stériles. Ceci conduit à l'obtention d'une culture pure. Après purification, les isolats purs ont été conservés au réfrigérateur (4°C), dans des tubes à essai contenant la gélose nutritive inclinée.

4. Identification des isolats bactériens

4.1. Caractérisation morphologique

- Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué pour l'identification des bactéries par l'étude de l'aspect des colonies bactériennes (la taille, la couleur, l'opacité, la consistance et la forme des colonies) . L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées.

- **Etude microscopique**

La coloration de Gram, est réalisée selon la technique classique (**Hildebr *et al.*, 1988**). Un frottis fixé à la chaleur a été coloré pendant une minute au violet de cristal; ensuite il a été rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. Le frottis coloré a été ensuite soumis à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol à 95% pendant 30 secondes puis il a été rincé à l'eau distillée. Ensuite le frottis a été coloré par la fushine pendant 1 minute et après un bref rinçage à l'eau distillée, et il a été séché au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec bunsen .

L'observation a été faite au microscope optique avec un grossissement de 1000 avec immersion. En utilisant cette coloration double, les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose (**Delarras, 2007**).

4.2. Caractirisation biochimique

- **Test catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.



Une goutte d'eau oxygénée a été Déposée sur une lame propre. Des colonies bactériennes ont mélangées avec l'eau oxygénée . Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (**Delarras, 2007**)

- **Test oxydase**

C'est une enzyme qui intervient dans divers couples d'oxydoréduction, l'enzyme recherchée est la phénylène-diamine-oxydase. Pour cela, un disque d'oxydase imbibé avec une goutte d'eau physiologique stérile a été déposé sur une lame. Puis une partie de la colonie a été étalée sur le disque (**Flandroits et Chomarar, 1988**). Une coloration de violet foncé apparaît immédiatement sur le disque indiquant une oxydase positive. L'absence de coloration indique que l'oxydase est négative.

5. Solubilisation du phosphate

La capacité de solubilisation du phosphate des isolats isolés précédemment a été testée quantitativement au milieu liquide. 50 ml du milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium ; **Nautiyael, 1999**) (Annexe 2), contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme seule source de phosphate ont été inoculés avec des cultures bactériennes fraîches puis incubés à 30°C sous agitation à 160 tr/min pendant 6 jours (**Cherif, 2014**). Après incubation, les cultures bactériennes ont été ensuite centrifugées à 6000 tr/min pendant 30 min et le surnageant a été récupéré.

La quantité de phosphate soluble dans le surnageant a été déterminée par la méthode Spectrophotométrique du jaune de vanado-molybdate (**Subba Rao, 1988**). Pour ceci 1 ml du surnageant a été ajouté à 2,5 ml de réactif de Barton (Annexe 3), ce volume a été complété à 50 ml avec l'eau distillée. Le développement d'une couleur jaune indique la production de phosphate soluble. Après 10 min, la concentration du phosphate a été déterminée par la mesure de la densité optique à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La quantité de phosphore libéré a été exprimée en $\mu\text{g/ml}$ par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage.

7. Analyses statistiques

Les résultats ont été traités par analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel « StatBox » version 6.4, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls à $p \leq 0,05$.

Chapitre III

Résultats

1. Échantillonnage du sol

1.1. Analyses physico-chimiques du sol

Les analyses physico-chimiques des échantillons du sol sont enregistrées dans le Tableau 4. Le taux d'humidité du sol estimé varie de 10.88 à 17.21 %. Les valeurs de pH varient entre 7.02 et 7.81 ce qui indique que les sols analysés sont neutre.

Tableau 4: Analyses physico-chimiques des échantillons de sol prélevés.

| Echant N° | Plante | Date d'échantillonnage | Humidité % | pH |
|-----------|--------------|------------------------|-------------|------------|
| A | Lentille | 17/04/2021 | 15,88 ±0,32 | 7,31 ±0,11 |
| B | Artichaut | 17/04/2021 | 16,64 ±0,62 | 7,73 ±0,01 |
| C | Pois chiches | 17/04/2021 | 14,33 ±0,54 | 7,22 ±0,44 |
| D | Haricot | 17/04/2021 | 15,21 ±0,12 | 7,81 ±0,21 |
| E | Fève | 17/04/2021 | 17,21 ±0,12 | 7,54 ±0,25 |
| F | Fève | 17/04/2021 | 10,88 ±0,38 | 7,02 ±0,86 |

autres, comprises entre

2. Isolement des bactéries solubilisant du phosphate

Après incubation des milieux inoculés (GN et PVK) par des dilutions précédemment préparé l'isolement de 23 bactéries ont été isolées. Ces bactéries sont été purifiées par des repiquages successifs sur la gélose nutritive.

3. Identification phénotypique et biochimique des isolats bactériens

L'identification phénotypique des isolats bactériens est basée sur leurs critères macroscopiques et microscopiques décrits dans le tableau 5.

3.1. Etude macroscopique

L'examen macroscopique comprend toutes les techniques reposant sur la détermination de caractéristiques morphologiques des bactéries via des techniques standardisées. L'observation des colonies bactériennes isolées à partir de la rhizosphère après ensemencement sur le milieu gélosé donne des colonies aux caractéristiques similaires pour quelques-unes et relativement variables pour d'autres ; des colonies grandes et petites de différentes couleurs (blanche, orange, beige, beige clair, beige jaunâtre et jaune). La majorité des colonies isolées sont rondes avec un contour régulier, transparentes avec une consistance non visqueuse et le reste des colonies bactérienne sont envahissantes avec un contour irrégulier, opaques, visqueuses, sèches et crémeuses (**Tableau 5**).

3.2. Etude microscopique

Après coloration de gram une observation microscopique des isolats bactériens (à grossissement de 1000) a été effectuée. Parmi les isolats observés 56.52% ont une forme bacille (fin ou épais) et le reste sont des coccobacille avec un pourcentage de 43.47%. La coloration de Gram nous a permis de différencier les bactéries d'après leur couleur (rose et violet) : les bactéries à Gram positif se caractérisent par une couleur violette. Quant aux bactéries à Gram négatif, sont identifiées par une couleur rose (Figure 8, 9,10 et 11) (**Tableau 5**). Un pourcentage important des bactéries se sont révélés Gram négatif (82.60%) et pour les Gram positive était 17.39% (**Figure 7**)

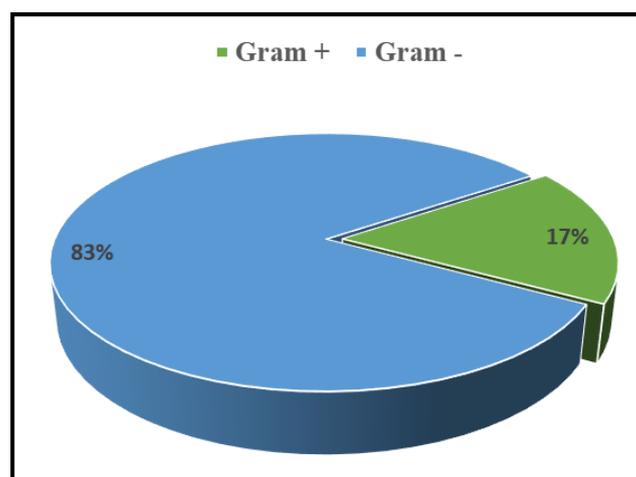


Figure 7 : Pourcentage de Gram négatif et positif des isolats bactériens.

3.3. Caractérisation biochimique

Pour une identification biochimique des bactéries isolées de la rhizosphère de différents plantes une recherche des enzymes catalase et oxydase a été effectuée. Le dégagement gazeux chez les isolats sélectionnés est expliqué par la présence de catalase, l'enzyme responsable de la dégradation du peroxyde dihydrogène (H_2O_2), les résultats obtenus ont montré que la majorité des isolats sont catalase positive sauf deux bactéries (LB1 et LC1). Concernant l'enzyme oxydase 34,75 % des isolats bactériens s'est révélé positive pour cette enzyme et 65,21 % sont négatives (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries sélectionnées.

| Isolat | Taille | Couleur | Forme | Contour | Opacité | Consistance | Gram | Catalase | Oxydase |
|------------|--------|-----------------|--------------|------------|--------------|---------------|------|----------|---------|
| GC1 | Petite | Beige | Ronde | Irrégulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | + |
| LB1 | Petite | Jaune | Ronde | régulier | Transparente | Sèche | + | - | + |
| LF1 | Petite | Beige | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| GB1 | Grande | Jaune | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| LF2 | Grande | Blanche | Ronde | Irrégulier | Opaque | visqueuse | - | + | - |
| PA1 | Grande | Blanche | Ronde | Irrégulier | Opaque | visqueuse | - | + | + |
| LD1 | Grande | Beige | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| LF3 | Petite | Jaune | Ronde | Régulier | Opaque | Non visqueuse | + | + | + |
| LF4 | Grande | Blanche | Ronde | Irrégulier | Opaque | visqueuse | + | + | - |
| GE1 | Grande | Beige jaune | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| LD2 | Grande | Blanche | Ronde | Irrégulier | Opaque | visqueuse | + | + | - |
| LB2 | Grande | Jaune | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | + |
| GF3 | Grand | Orange | Ronde | Régulier | Opaque | Non visqueuse | - | + | - |
| PB1 | Petite | Beige claire | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| GE2 | Grande | Jaune | Ovale | Régulier | Opaque | visqueuse | - | + | - |
| LB3 | Petite | Beige | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | - |
| LC1 | Petite | Jaune | Envahissante | Régulier | Opaque | crémeuse | - | - | - |
| PD1 | Grande | Beige jaune | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | + |
| LF5 | Grande | Beige claire | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | + |
| PC1 | Petite | Blanche | Ovale | Irrégulier | Opaque | visqueuse | + | + | - |
| GB2 | Petite | Beige claire | Ronde | Régulier | Transparente | Non visqueuse | - | + | + |
| LE1 | Petite | Beige | Envahissante | Irrégulier | Opaque | crémeuse | - | + | - |
| LD1 | Grande | Jaune | Envahissante | Régulier | Transparente | Sèche | - | + | - |

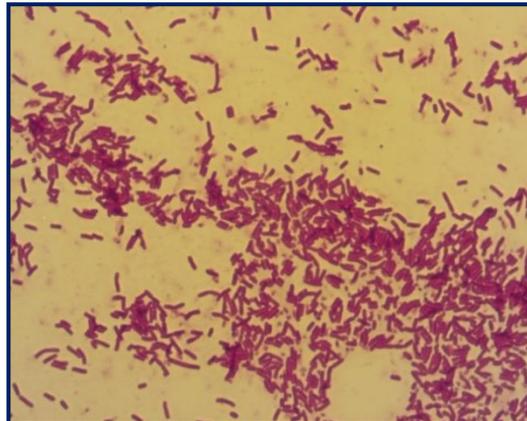


Figure 8 : Aspect microscopique d'isolat PC1 (observation microscopique (G x1000) après coloration de gram).

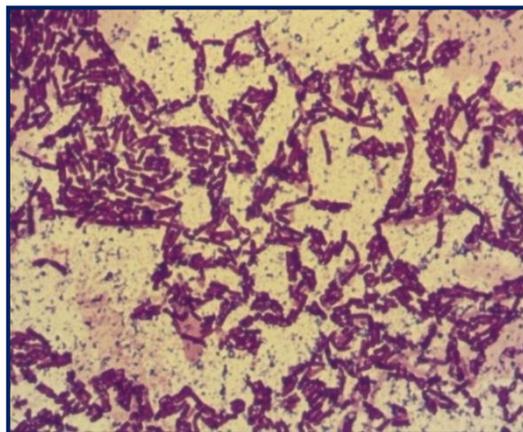


Figure 9 : Aspect microscopique d'isolat LD2 (observation microscopique (G x1000) après coloration de gram).

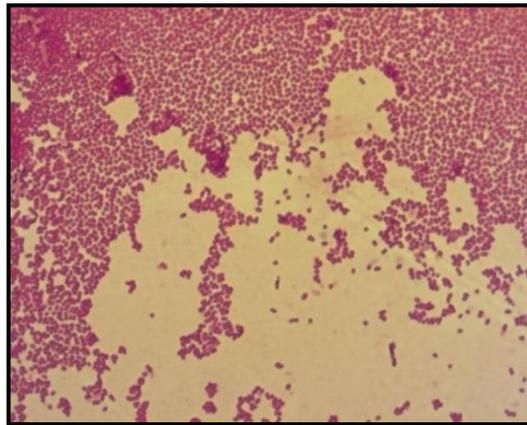


Figure 10 : Aspect microscopique d'isolat LB3 (observation microscopique (G x1000) après coloration de gram).

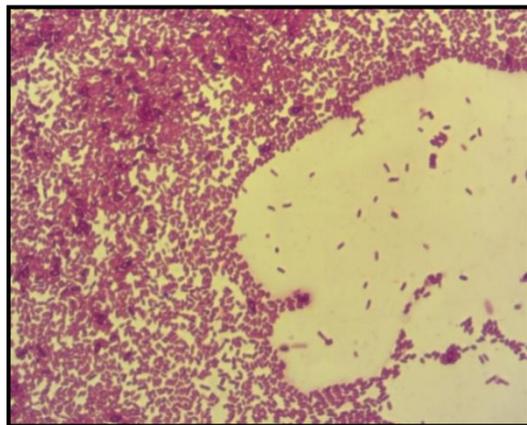


Figure 11 : Aspect microscopique d'isolat PA1 (observation microscopique (G x1000) après coloration de gram).

4. Solubilisation du phosphate

Le pouvoir de la solubilisation est basé sur la mesure du phosphore soluble sous forme d'orthophosphate libérée en milieu liquide contenant un composé de phosphate minéral insoluble comme seule source de phosphore. La capacité des isolats étudiés à solubiliser le phosphate inorganique a été testée en utilisant le milieu liquide NBRIP. L'intensité de la couleur jaune indiquent la quantité de phosphore libérée après l'addition de réactif Barton aux surnagent. Le phosphore soluble a été calculé à partir de l'équation de régression d'après la courbe d'étalonnage.

La quantité de phosphore soluble libérée par les isolats bactériens dans le milieu de culture varie entre 29,91 à 729 $\mu\text{g/ml}$. La solubilisation maximale a été observée chez l'isolat GC1 suivie par PB1 et LC1, avec une solubilisation de 702,545 et 670,95 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore libre respectivement. Le nombre des bactéries qui ont une forte capacité à solubiliser le phosphore insoluble est 15 bactéries. Ces dernières ont permis de libérer des quantités importantes de phosphore, allant de 313,495 à 729 $\mu\text{g/ml}$. Parmi ces 15 isolats, 7 avaient une production entre 313.495 et 458.61 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore et le reste avaient des quantités plus élevées variant entre 458.83 et 729 $\mu\text{g/ml}$ (**Tableau 6 ; Figure 12**).

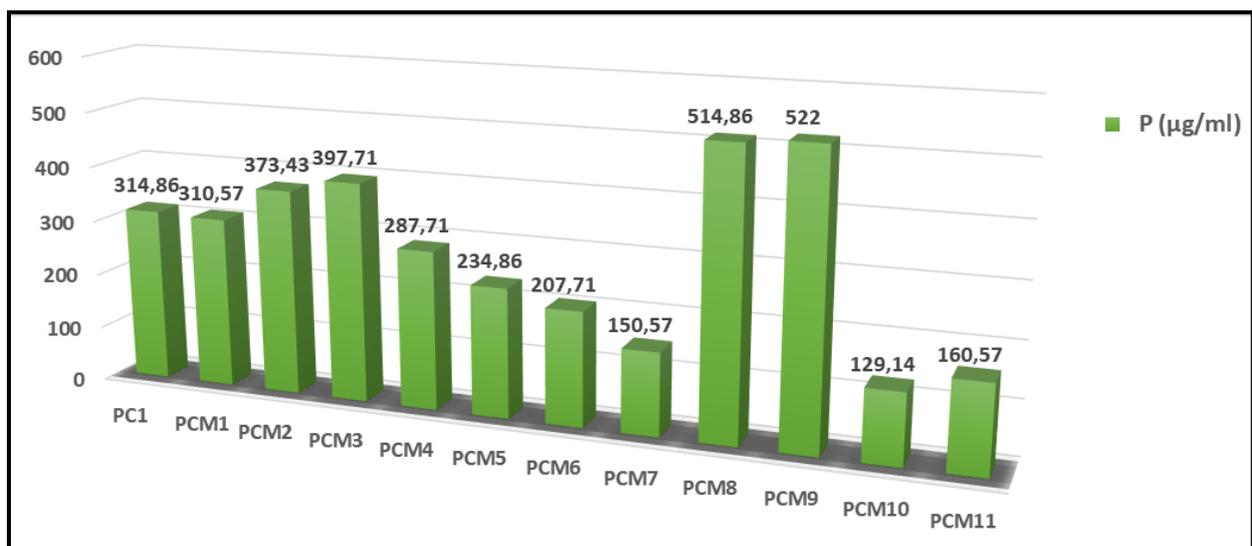


Figure 12 : Solubilisation de phosphate par les isolats bactériens.

Tableau 6 : Solubilisation de phosphate par les isolats bactériens.

| Isolat | Solubilisation du phosphate ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------|--|
| GC1 | 729 \pm 22,198 ^a |
| LB1 | 124,26 \pm 3,780 ⁱ |
| LF1 | 282,5 \pm 8,602 ^h |
| GB1 | 293,1 \pm 8,924 ^h |
| LF2 | 613,175 \pm 18,671 ^c |
| PA1 | 81,725 \pm 2,488 ^j |
| LD1 | 366,075 \pm 11,146 ^g |
| LF3 | 319,73 \pm 9,735 ^h |
| LF4 | 601 \pm 18,300 ^c |
| GE1 | 29,66 \pm 0,903 ^k |
| LD2 | 29,91 \pm 0,910 ^k |
| LB2 | 282,72 \pm 8,608 ^h |
| GF3 | 293,07 \pm 8,923 ^h |
| PB1 | 702,545 \pm 21,375 ^a |
| GE2 | 541,28 \pm 16,481 ^d |
| LB3 | 535,92 \pm 16,318 ^d |
| LC1 | 670,95 \pm 20,430 ^b |
| PD1 | 322,705 \pm 9,826 ^h |
| LF5 | 319,8 \pm 9,737 ^h |
| PC1 | 313,495 \pm 9,545 ^h |
| GB2 | 458,61 \pm 14,786 ^e |
| LE1 | 522,83 \pm 15,920 ^d |
| LD1 | 400,06 \pm 12,181 ^f |

Chapitre IV

Discussion

1. Analyses physico-chimiques du sol

Le teneur en humidité superficielle d'un sol représente le stockage temporaire de l'eau, généralement limitée à la zone d'aération. La teneur en humidité du sol est très variable, tant du point de vue spatial que du point de vue temporel, en raison de l'hétérogénéité des propriétés du sol ; de la topographie ainsi que de la distribution des précipitations et de l'évapotranspiration (**Juglea, 2011**). La différence du pourcentage de l'humidité dans les échantillons du sol est due principalement à la période de l'échantillonnage. Les six prélèvements sont effectués pendant un temps ensoleillé, ce qui explique le taux d'une humidité moyenne des échantillons.

Le pH est une indication du niveau général du sol en éléments chimiques assimilables. Le pH du sol se trouve en relation directe avec les cations et les anions échangeables. Il joue un rôle important dans le mécanisme de rétention ou de libération des éléments nutritifs (**Farah et al., 1979**).

Le pH est un facteur physicochimique important dans la caractérisation des sols. En fonction du pH, les sols sont classés en sol acide, neutre ou alcalin. Les sols cultivés sont généralement caractérisés par des pH neutre, c'est-à-dire aux environs de pH 7 (**Anonyme, 2014**). Le pH est également un facteur qui influe sur la nature et la distribution des microorganismes du sol.

2. Isolement et identification des bactéries solubilisant le phosphate

Les rhizobactéries stimulatrice de la croissance végétale (PGPR) sont des rhizobactéries bénéfiques pour les plantes (**Kloepper et al., 1989**). Elles doivent être compétitives aux autres communautés microbiennes rhizosphériques (**Antoun et Prévost, 2005**). Ce sont des rhizobactéries libres dans la rhizosphère dotée de potentialités bénéfiques très importantes pour l'agriculture (**Babalola, 2010**). La capacité de certain microorganisme a convertir le phosphore insoluble en une forme accessible, comme l'orthophosphate est une activité importante dans les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) (**Chen et al., 2006 ; Rodriguez et al., 2007**).

Au cours de notre travail, 23 bactéries solubilisant le phosphate ont été isolées de la rhizosphère des plantes (lentille, artichaut, pois chiche, haricot et fève), cultivées dans des sols ayant un PH neutre à l'égermèrent alcalin.

Cependant la composition et la structure de la population des MSP dans le sol sont très variables et influencées en grande partie par les caractéristique physico-chimique du sol (**Khan et al., 2007**). Il a été rapporté également que des concentrations plus élevées de BSP se retrouvent couramment dans le sol rhizosphérique par rapport à un sol non rhizosphérique (**Reyes et al., 2007**).

La caractérisation des isolats a permis de constater que tous les bactéries appartenant à notre collection sont des bacilles et que la plupart sont des bactéries à coloration de gram négatif. Plusieurs études ont montré la présence d'un grand nombre de bactéries très variés présentant différentes formes telles que la forme bâtonnet, la forme spiral et la forme Cocci (**khan et al., 2010**). Parmi celle-ci, les bacilles en forme bâtonnet semblent être les plus abondants dans le sol et les plus performantes en termes de solubilisation de phosphate (**khan et al., 2010**). Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère (**Milus et Rothrock 1993; Maplestone et Campbell, 1989**). De plus, la solubilisation du P est un caractère très commun chez les *Pseudomonas* comme *Pseudomonas agglomerans* et certains Enterobacteriaceae (**Sulbaran et al., 2008**). La solubilisation des PI est étroitement liée à l'activité des microorganismes telle que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium* (**Przemieniecki et al., 2015, Rodríguez, 1999**).

Une grande capacité de solubilisation de phosphate a été constaté chez la majorité de nos bactéries, les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par Chibani *et al.*, (2017). Aussi, la solubilisation du phosphate s'accompagne d'une baisse du pH du milieu ; cette corrélation négative a été signalée par plusieurs auteurs (**Chen et al., 2006; Asuming Brempong et al., 2014**) et serait due principalement à la libération par les bactéries, d'acides organiques (**Richardson, 2001; Reyes et al., 2001; Puente et al., 2004; Rodriguez et al., 2007**).

Conclusion

Conclusion

Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour augmenter la disponibilité du P aux plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités. Leurs actions permettent de libérer des phosphates solubles assimilables par les racines, de manière totalement naturelle. Malgré les grandes recherches, l'utilisation des micro-organismes du sol rhizosphérique reste insuffisante par rapport à l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques.

Concernant notre étude, 6 échantillons du sol sont prélevés de deux régions différentes de la wilaya de Mostaganem (Hadjedj et Mesra). Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries solubilisant le phosphate.

Au cours de ce travail, un isolement et purification des bactéries solubilisant de phosphate ont été réalisées. La mise en évidence de l'activité solubilisante de 23 isolats a permis d'enregistrer une grande quantité de phosphate allant jusqu'à : 729 35 µg/ml de phosphate libre.

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives semblent nécessaires à réaliser à savoir:

- Des études sur les moléculaires plus approfondies (séquençage du gène de l'ARNr 16S) pour déterminer avec précision le statut taxonomiques des rhizobactéries étudiées.
- Des Etudes sur la capacité de ces rhizobactéries à tolérer différentes conditions de stress environnemental telles : la température, la salinité, le pHetc.
- Des Etudes de pouvoir des rhizobactéries isolées à produire des phytohormones (cytokinines, 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, gibbérellines etc.) et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques telles : pectinases, lipases, chitinases, uréases.... etc.
- L'exploitations des bactéries solubilisant des phosphates dans les champs, à travers l'inoculation des plantes par des produits bio fertilisants à base de souches solubilisant de phosphore, afin de contribuer à la lutte contre l'utilisation intensive des engrais et des pesticides chimiques en agriculture.
- L'exploitation des activités enzymatiques (amylases, cellulases.....) D'origine microbienne dans le domaine industriel et biotechnologique

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ahemad, M., & Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- **Amir, H. G., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Marziah, M., & Ramlan, M. F. (2005).** Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 36(15-16), 2059-2066.
- **Anand, K. U. M. A. R., Kumari, B. A. B. Y., & Mallick, M. A. (2016).** Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. *J Pharm Pharm Sci*, 8(2), 37.
- **Antoun, H., & Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization*(pp. 1-38). Springer, Dordrecht.
- **Arora, N. K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., & Maheshwari, D. K. (2012).** PGPR for protection of plant health under saline conditions. *Bacteria in agrobiology: stress management*, 239-258.
- **Asuming-Brempong, S. (2014).** Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and its usefulness in soil microbial ecological studies-a review. *African Journal of Biotechnology*, 13(6), 723-728.
- **Babalola, O. O. (2010).** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*, 32(11), 1559-1570.
- **Babalola, O. O. (2010).** Ethylene quantification in three rhizobacterial isolates from *Striga hermonthica*-infested maize and sorghum. *Egyptian Journal of Biology*, 12.
- **Babu-Khan, S., Yeo, T. C., Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D., & Goldstein, A. H. (1995).** Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and environmental microbiology*, 61(3), 972-978.
- **Barman, S., Das, S., & Bhattacharya, S. S. (2019).** The prospects of bio-fertilizer technology for productive and sustainable agricultural growth. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 233-253). Elsevier.
- **Beauchamp, C. J. (1993).** Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agent. *Phytoprotection*.
- **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*, 3(2), 97-110.

- **Behera, S. N., Sharma, M., Aneja, V. P., & Balasubramanian, R. (2013).** Ammonia in the atmosphere: a review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8092-8131.
- **Benhamou, N., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1998).** Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204(2), 153-168.
- **Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- **Bialeski, R. L. (1973).** Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annual review of plant physiology*, 24(1), 225-252.
- **Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. (2019).** Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916.
- **Bresson, J. (2013).** *Interaction plante-microorganismes: Implication de la rhizobactérie Phyllobacterium brassicacearum dans les réponses d'Arabidopsis thaliana au stress hydrique* (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
- **Charest, M. H., Beauchamp, C. J., & Antoun, H. (2005).** Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS microbiology ecology*, 52(2), 219-227.
- **Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006).** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- **Cherif, H. (2018).** *Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec bacillus sp. et pantoea agglomerans isolées de sols* (Doctoral dissertation).
- **CHIBANI, H. R. (2017).** *Sélection et caractérisation des bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin dans l'ouest Algérien: effet sur la promotion de la croissance du blé (Triticum sp.)* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- **Choudhury, A. T. M. A., Kennedy, I. R., Ahmed, M. F., & Kecskés, M. L. (2007).** Phosphorus fertilization for rice and control of environmental pollution problems. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(13), 2098-2105.
- **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 Biology and Biochemistry*, 37(10), 1970-1974.

- **Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., D.S. Kim. (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4197-4201.
- **Corbaz, R. (1990).** *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. PPUR presses polytechniques.
- **Corner, S. (2009).** Choosing the right type of rotation in PCA and EFA. *JALT testing & evaluation SIG newsletter*, 13(3), 20-25.
- **Coupel-Ledru, A., Lebon, E., Christophe, A., Gallo, A., Gago, P., Pantin, F., ... & Simonneau, T. (2016).** Reduced nighttime transpiration is a relevant breeding target for high water-use efficiency in grapevine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), 8963-8968. (apa)
- **Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., & Hanawalt, P. C. (2001).** Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158(1), 41-64.
- **De Freitas, J. R., & Germida, J. J. (1992).** Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(11), 1137-1146.
- **De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., & Germida, J. J. (1997).** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of soils*, 24(4), 358-364.
- **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- **Demers, I. (2008).** Formes et disponibilité du phosphore des composts utilisés comme amendements des sols agricoles.
- **Dommergues, Y. (1976).** Mycorrhizes et fixation d'azote. *An. Edafol. Robiologia*, 35, 1039-1056.
- **Drouet, T. (2010).** Pédologie. ^ eds, *Book Pédologie. BING-F-302. Ed. Lagev, 140p.*
- **Dursun, A., Ekinici, M., & Doenmez, M. F. (2008).** Effects of inoculation bacteria on chemical content, yield and growth in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*). *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 3197.
- **Dutta, J. R., & Banerjee, R. (2006).** Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. *Brazilian archives of biology and technology*, 49, 37-47.

- **El-Hamshary, O. I. M., Effat, S. A. M., Al-Muslam, H. J. K., & Al-Hebeshi, A. (2018).** Genetic comparison among high phosphate-solubilizing mutants of enterobacter clocae via rapid-pcr analysis. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, 20(2), 643-654.
- **Elhassan, G.A., Abdelgani, M.E., Osman, A.G., Mohamed, S.S., Abdelgadir, B.S. (2010).** Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *J. Nutr*, 9: 926-934.
- **Ercisli, S., Esitken, A., & Sahin, F. (2004).** Exogenous IBA and inoculation with *Agrobacterium rubi* stimulate adventitious root formation on hardwood stem cuttings of two rose genotypes. *HortScience*, 39(3), 533-534.
- **Fardeau, J. C., Morel, C., & Boniface, R. (1991).** Cinétiques de transfert des ions phosphate du sol vers la solution du sol: paramètres caractéristiques. *Agronomie*, 11(9), 787-797.
- **Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. Y. (2018).** Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in microbiology*, 9, 436.
- **Flandrois, J. P., & Chomarot, M. (1988).** L'examen cytobactériologique des urines. *Bactériologie médicale pratique, MEDSI/Mc GRAW-HILL, Paris*.
- **Frossard, E., Julien, P., Neyroud, J. A., & Sinaj, S. (2004).** *Le phosphore dans les sols: état de la situation en Suisse: le phosphore dans les sols, les engrais, les cultures et l'environnement*. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage OFEFP.
- **Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D., et Wipf, D. (2010).** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8):519-30
- **Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- **Gnanamanickam, S. S. (Ed.). (2006).** *Plant-associated bacteria* (Vol. 1). Dordrecht: Springer.
- **Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2004).** *The living soil: fundamentals of soil science and soil biology*. Science Publishers.
- **Gowami, S. P., Maurya, B. R., & Dubey, A. N. (2019).** Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. *International Journal of Chemical Studies*, 7, 3905-3913.
- **Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., & Murfett, J. (1998).** How does auxin turn on genes?. *Plant physiology*, 118(2), 341-347.
- **Guivarch, A. (2001).** *Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de stations d'épuration urbaines* (Doctoral dissertation, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).

- **Gull, M., Hafeez, F. Y., Saleem, M., & Malik, K. A. (2004).** Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 623-628.
- **Gupta, A., Gopal, M., & Tilak, K. V. B. (2000).** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria.
- **Haas, D., & Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307-319.
- **Hansali, K et Banouh, S (2020).** Les Bactéries solubilisant du phosphate : Avancées et perspectives en agriculture moderne. Thèse de mémoire. Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira, 61
- **Harman, G. E., & Shores, M. (2007).** The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. In *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 131-155). Springer, Dordrecht.
- **Hedley, M. J., Hussin, A., & Bolan, N. S. (1990).** New approaches to phosphorus fertilization. In *Phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania. Proceedings of a symposium, 6-10 March 1989.* (pp. 125-142). International Rice Research Institute.
- **Herman, M. A. B., Nault, B. A., & Smart, C. D. (2008).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*, 27(6), 996-1002.
- **Hiltdbrand D.C., Schorth M.N et Sand D.C.(1988).** Pseudomonas spp 60-77. In Shaaad, N.W.E.D Laboratory guide for identification of plant pathogen bacteria 2 nd .ST. Pael .Minnostosa.pps.
- **Hinsinger, P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2), 173-195.
- **Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009).** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and soil*, 321(1), 117-152.
- **Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale traduction de la 2ème édition américaine par SERGE RAMBOUR. *Révision scientifique de Charle Marie Evrard. Edition DEBOEK Université, Bruxelles*, 66-81.
- **Hopwood, D. A. (1985).** Genetic manipulation of Streptomyces. *a laboratory manual*.
- **Hountin, J. A. (1996).** Capacité d'adsorption du phosphore et distribution des éléments C, N et P dans un sol agricole traité avec du lisier de porc pendant 14 ans (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

- **Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), 1-8.
- **Hwangbo, H., Park, R. D., Kim, Y. W., Rim, Y. S., Park, K. H., Kim, T. H., ... & Kim, K. Y. (2003).** 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. *Current microbiology*, 47(2), 0087-0092.
- **Javed, F., Ahmed, H. B., Crespi, R., & Romanos, G. E. (2013).** Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interventional Medicine and Applied Science*, 5(4), 162-167.
- **Javed, S., Meraj, M., Bukhari, S. A., Irfan, R., & Mahmood, S. (2013).** Hyperproduction of alkaline protease by mutagenic treatment of *Bacillus subtilis* M-9 using agroindustrial wastes in submerged fermentation. *J Microb Biochem Technol*, 5, 074-080.
- **Jossi, M. (2008).** *Rhizosphere bacterial communities associated with Lolium perenne: structuration and plant-mediated influences*(Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).
- **Juglea, S. (2011).** *Simulation de l'humidité du sol/température de brillance à partir des données in situ dans le cadre de la validation des produits SMOS-site test Valencia Anchor Station*(Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- **Kende, H., & Zeevaart, J. (1997).** The five " Classical" plant hormones. *The plant cell*, 9(7), 1197.
- **Kenneth, O. C., Nwadike, E. C., Kalu, A. U., & Unah, U. V. (2019).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a novel agent for sustainable food production. *Am J Agric Biol Sci*, 14, 35-54.
- **Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009).** Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci*, 1(1), 48-58.
- **Khan, M. I. R., Asgher, M., & Khan, N. A. (2014).** Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67-74.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014).** Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate solubilizing microorganisms* (pp. 31-62). Springer, Cham.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007).** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.

- **Kim, C., Kecskés, M. L., Deaker, R. J., Gilchrist, K., New, P. B., Kennedy, I. R., ... & Sa, T. (2005).** Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. *Canadian journal of microbiology*, 51(11), 948-956.
- **Kim, K. Y., Hwangbo, H., Kim, Y. W., Kim, H. J., Park, K. H., Kim, Y. C., & Seong, K. Y. (2002).** Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 35(1), 59-67.
- **Kim, M. J., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Jeong, E. J., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2017).** Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(3), 571-580.
- **Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989).** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- **Kootstra, A. M. J., Brilman, D. W., & Kersten, S. R. (2019).** Dissolution of phosphate from pig manure ash using organic and mineral acids. *Waste management*, 88, 141-146.
- **Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., & Leggett, M. E. (1989).** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228.
- **Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., & Sessitsch, A. (2008).** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil*, 304(1), 35-44.
- **Kumar, P., & Dubey, R. C. (2012).** Plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens and yield enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *J Curr Perspect Appl Microbiol*, 1, 6-38.
- **Kumar, V., Behl, R. K., & Narula, N. (2001).** Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological research*, 156(1), 87-93.
- **Lambert, J. C. (1979).** La fertilisation phosphatée» revue Cultivar. *N*, 115, 96-97.
- **Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sub, H. S., Seong, C. K., & Lee, G. W. (2008).** Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24(7), 1139-1145.
- **Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., ... & Goldstein, A. H. (1992).** Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5814-5819.

- **Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., & Bloemberg, G. V. (2001).** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 461-490.
- **Lynch, J. M. (1990).** Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. *The rhizosphere.*, 1-10.
- **Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1990).** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil*, 129(1), 1-10.
- **Maharajan, T., Ceasar, S. A., Ajeesh krishna, T. P., Ramakrishnan, M., Duraipandiyan, V., Naif Abdulla, A. D., & Ignacimuthu, S. (2018).** Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants. *Plant Breeding*, 137(1), 10-26.
- **Maplestone, P. A., & Campbell, R. (1989).** Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against take-all. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(4), 543-550.
- **Marschner, H. (1995).** Mineral nutrition of higher plants Academic Press San Diego. *Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.*
- **Mengel, K., & Kirkby, E. A. (1987).** Principles of plant nutrition. Bern. *International Potash Institute*, 687-695.
- **Meraz, I. M., Choudhury, T., & Hoq, M. M. (2006).** Optimization of mutation conditions of *Bacillus* sp. to increase the yield of alkaline protease. *J. Human Life Sci*, 4, 43-50.
- **Milus, E. A., & Rothrock, C. S. (1993).** Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(3), 335-341.
- **Moënné-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'connor, B., & O'gara, F. (1999).** Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of applied microbiology*, 86(1), 108-116.
- **Mohamed, E. A., Farag, A. G., & Youssef, S. A. (2018).** Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* isolated from tomato plant rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 9(03), 266.
- **Morel, C. (2002).** Caractérisation de la phytodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphate entre le sol et la solution (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- **Morel, R. (1996).** *Les sols cultivés*. Technique & documentation-Lavoisier.
- **Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007).** Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495-508.

- **Nashima, K., Santhiya, P., & Palanisamy, A. (2012).** Production and optimization of lipase from wild and mutant strains of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *J. Acad. Indus. Res*, 1(2), 97-100.
- **Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- **Naznin, H. A., Kimura, M., Miyazawa, M., & Hyakumachi, M. (2013).** Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes and environments*, 28(1), 42-49.
- **Neilands, J. B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.
- **Nielsen, K. L., Eshel, A., & Lynch, J. P. (2001).** The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Journal of experimental botany*, 52(355), 329-339.
- **Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006).** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 38-43.
- **Pal, K. K., & Gardener, M. B. (2006).** *Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor DOI*, 10.
- **Palleroni, N. J. (1984).** Family I. Pseudomonadaceae Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1917, 555. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 141-213.
- **Parmar, P., & Sindhu, S. S. (2013).** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J Microbiol Res*, 3(1), 25-31.
- **Pauwels, J. M., Van Ranst, E., Verloo, M., Mvondo Ze, A. (1992).** Manuel de laboratoire de pédologie : methodes d'analyses de sols et de plantes, équipement, gestion de stocks de verrerie et de produits chimiques. *Yaoundé : Centre universitaire de Dschang . Département des sciences du sol. Cameroun*. 265 p.
- **Pereda Campos, M. V. (2008).** *Contribution à l'étude des transporteurs de phosphate de la famille PHT1 chez le Peuplier (Populus trichocarpa Torr. & Gray) et le champignon ectomycorhizien Laccaria bicolor (Maire) PD Orton* (Doctoral dissertation, Nancy 1).
- **Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997).** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131-140.
- **Pikovskaya, R. I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.

- **Pirlak, L., Turan, M., Sahin, F., & Esitken, A. (2007).** Floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to apples increases yield, growth, and nutrient element contents of leaves. *Journal of Sustainable Agriculture*, 30(4), 145-155.
- **Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., ... & Hinsinger, P. (2015).** Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.
- **Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2007).** Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.
- **Prabakaran, M., Thennarasu, V., Mangala, R. A., Bharathidasan, R., Chandrakala, N., & Mohan, N. (2009).** Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian J Sci Technol*, 2(11), 46-49.
- **Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019).** Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. *Advances in Biological Science Research*, 161-176.
- **Pradhan, N., & Sukla, L. B. (2006).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
- **Przemieniecki, W. S., Kurowski, P. T., & Karwowska, A. (2015).** Plant growth promoting potential of *Pseudomonas* sp. SP0113 isolated from potable water from a closed water well. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 663-673.
- **Puente, M. E., Li, C. Y., & Bashan, Y. (2004).** Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology*, 6(05), 643-650.
- **PUJIC, P., & NORMAND, P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes: Interactions plantes/micro-organismes. *Biofutur (Puteaux)*, (298), 26-29.
- **Raghothama, K. G. (2000).** Phosphate transport and signaling. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 182-187.
- **Rahman, C. H., Soltana, F., & Abdelwaheb, C. Enhancement of protease production by *Bacillus* sp. and *Micrococcus varians* induced by UV-mutagenesis. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(5), 238912.**
- **Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001).** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.
- **Ramette, A., Moënné-Loccozy, Y., & Défago, G. (2006).** Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and

hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS microbiology ecology*, 55(3), 369-381.

- **Resende, M. I. P., Jakoby, I. C. M. C., dos Santos, L. C. R., Soares, M. A., Pereira, F. A. D. I., Souchie, E. L., & Silva, F. G. (2014).** Phosphate solubilization and phytohormone production by endophytic and rhizosphere *Trichoderma* isolates of guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). *African Journal of Microbiology Research*, 8(27), 2616-2623.
- **Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., & Antoun, H. (2001).** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1741-1747.
- **Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., & Antoun, H. (1999).** Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3), 281-290.
- **Reyes, I., Valery, A., & Valduz, Z. (2007).** Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. In *First international meeting on microbial phosphate solubilization* (pp. 69-75). Springer, Dordrecht.
- **Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., & Paull, R. E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest biology and technology*, 33(2), 193-203.
- **Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moëgne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2007).** Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection?. *New Phytologist*, 173(4), 861-872.
- **Rfaki, A., Zennouhi, O., Aliyat, F. Z., Nassiri, L., & Ibijbijen, J. (2020).** Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*, 37(3), 230-241.
- **Richardson, A. E. (2001).** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897-906.
- **Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 305-339.
- **Rifat, Y., Parekh, V., Wilanowski, T., Hislop, N. R., Auden, A., Ting, S. B., ... & Jane, S. M. (2010).** Regional neural tube closure defined by the Grainy head-like transcription factors. *Developmental biology*, 345(2), 237-245.
- **Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.

- **Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006).** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287(1), 15-21.
- **Rodríguez, L. A. G., & Ruigómez, A. (1999).** Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. *Bmj*, 318(7183), 565-566.
- **Rogers, J. R., Bennett, P. C., & Choi, W. J. (1998).** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogist*, 83(11-12_Part_2), 1532-1540.
- **Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Klopfer, J. W.(2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026
- **Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018).** Phosphorus solubilization by Bacillus species. *Molecules*, 23(11), 2897.
- **Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S. M., & Weber, S. M. (2005).** Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Current opinion in pharmacology*, 5(1), 34-41.
- **Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A. S. (2007).** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 635-648.
- **Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B., & Vani, S. S. (2017).** Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133-2144.
- **Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M. (1998).** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology*, 116(2), 447-453.
- **Schoebitz Cid, M. I. (2010).** *Etude de l'encapsulation de rhizobactéries pour la biofertilisation du blé* (Doctoral dissertation, Nantes).
- **Seshadri, S., Ignacimuthu, S., & Lakshminarasimhan, C. (2004).** Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 191(8), 1043-1052.
- **Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2015).** PGPR: A BOON FOR AGRICULTURE. *Фундаментальные и прикладные аспекты создания*, 54.
- **Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018).** Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 603-615.

- **Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M., & Sharma, R. (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seeds and seedling growth. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1(1), 61-63.
- **Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. B. (2011).** Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95.
- **Snapp, S. S., & Lynch, J. P. (1996).** Phosphorus distribution and remobilization in bean plants as influenced by phosphorus nutrition. *Crop Science*, 36(4), 929-935.
- **Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004).** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30(4), 205-240.
- **Song, O. R., Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, S. C., Kim, K. K., & Choi, Y. L. (2008).** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 151-156.
- **Srishty, A. S. C., & Kaur, P. (2019).** Phosphate Solubilisation Potential of Screened Nitrogen Fixing *Rhizobium leguminosarum* Strains Isolated from Nodules of Pea Plant. *Ind. J. Pure App. Biosci*, 7(5), 360-363.
- **Subbarao, N. S. (1988).** Phosphate solubilizing micro-organism. *Biofertilizer in agriculture and forestry. Regional Biofert. Dev. Centre, Hissar, India*, 133-142.
- **Sulbarán, L., Drescher, K., Martínez, N., Colmenares, O., & Ricca, R. (2008).** Technical Diagnosis of the Production System With Dual Purpose Bovine in the Hilly Area in Guárico State, Venezuela.
- **Tamietti, G., & Pramotton, R. (1990).** La réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires: rapports entre résistance et microflore autochtone avec référence particulière aux *Fusarium* non pathogènes. *Agronomie*, 10(1), 69-76.
- **Trivedi, P., & Sa, T. (2008).** *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology*, 56(2), 140-144.
- **Van Loon, L. C. (1997).** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European journal of plant pathology*, 103(9), 753-765.
- **Van Loon, L. C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research* (pp. 243-254). Springer, Dordrecht.
- **Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003).** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New phytologist*, 157(3), 423-447.
- **Vasudevan, P., Kavitha, S., Priyadarisini, V. B., Babujee, L., & Gnanamanickam, S. S. (2002).** Biological control of rice diseases. *Biological control of crop diseases. Gnanamanickam ed. Marcel Dekker Inc, New York*, 11-32.

- **Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- **Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K., & Vasumathi, K. (1997).** Powder Formulations of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeonpea Wilt. *Biological control*, 8(3), 166-171.
- **Vijayalkshmi, R. K. Kairunnisa, S. Natarajan. (2016).** Phosphate solubilization by rhizosphere Bacteria isolated from Rose garden soils of Satkhol, India, J. Acad. Ind. Res. 4(11), 243-245.
- **Wani, P. A., Zaidi, A., Khan, A. A., & Khan, M. S. (2005).** Effect of phosphate on phosphate solubilization and indole acetic acid releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Annals of Plant Protection Sciences*, 13(1), 139-144.
- **Weller, D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- **Went, F. W., & Thimann, K. V. (1937).** Phytohormones. *Phytohormones*.
- **Weyens, N., Monchy, S., Vangronsveld, J., Taghavi, S., & Van Der Lelie, D. (2010).** Plant-microbe partnerships. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- **Xu, K., Ding, M. S., Zhang, S., Allen, J. L., & Jow, T. R. (2003).** Evaluation of fluorinated alkyl phosphates as flame retardants in electrolytes for Li-ion batteries: I. Physical and electrochemical properties. *Journal of the Electrochemical Society*, 150(2), A161.
- **Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014).** Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169(1), 76-82.