

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem**  
**Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie**  
**Département de Biologie**



**UNIVERSITÉ**  
**Abdelhamid Ibn Badis**  
**MOSTAGANEM**

# Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de  
**MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

Par

**DERBALE Rania Ikram**  
**&**  
**BOUDANI Hafsa**

Thème :

*Optimisation des conditions de culture pour la solubilisation de phosphate par des rhizobactéries*

**Soutenue le 11/06/2024 devant le jury composé de :**

<b>Président</b>	<b>MEKHALDI Abdelkader</b>	<b>Pr</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
<b>Encadreur</b>	<b>HAMOUM Hakim</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
<b>Examinateur</b>	<b>BOUZNAD Ahcen</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
<b>Co-encadreur</b>	<b>NAIMI Mehdi</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Mostaganem</b>

**Année Universitaire : 2023/2024**

# *Remerciement :*

Avant toute chose, nous remercions **ALLAH** qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser cette mémoire.

Nous remercions nos parents, pour leur soutien et leur amour qui nous donné la volonté de poursuivre nos études .

Nos grands remerciements au *Mr. HËAMOUM Hakïm* pour avoir accepté d'être notre encadrant, ses conseils, ses encouragements et ses critiques constructives nous a vraiment aidés à donner le meilleur de nous-mêmes.

Nous remercions *Mr. MEKHALDI Abdelkader* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions *Mr. BOUZNAD Ahcen* pour accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier également *Mr. NAIMI Mehdi* et *Mr. BENZEKRI Mokhtar* pour leurs gentillesse et leurs aide généreuse tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de recherche pour leur patience, leur aide précieux et leurs valeureux conseils .

Nous remercions tous les professeurs qui ont contribué à notre formation au cours des cinq dernières années.

Pour finir, Nous remercions tous ceux qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*À mes chers parents, vos encouragements incessants et votre soutien indéfectible ont été les piliers de mon éducation. Votre amour inconditionnel a été ma source d'inspiration et de motivation, me guidant vers la réussite*

*À mes frères Abdencour et Mchammed.*

*À mes amies Asma et Ahlem, votre amitié précieuse a apporté de la lumière et de la chaleur à mes jours les plus sombres. Vos encouragements et votre soutien ont été une source de réconfort et de joie tout au long de ce périple.*

*À mes chères cousines Chaimaa et Kawther*

*À ma chère binôme : Boudani Hafsa*

*Je dédie ce mémoire à ceux qui ont contribué à mon parcours, je célèbre non seulement mes accomplissements, mais aussi les personnes qui ont rendu ces réalisations possibles. Que nos liens continuent de s'épanouir et de nous inspirer mutuellement dans les années à venir.*

*Derbale Rania Ikram*

# *Dédicace*

*A toutes les personnes*

*qui m'ont aidé et soutenu durant ces deux années..*

*Boudani Haba*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction ..... 1

## Synthèse bibliographique

I.1.	Rhizosphère .....	4
I.2.	Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR).....	5
I.2.1.	Mécanismes d'action des PGPR .....	5
I.3.	Généralité sur le phosphore .....	6
I.3.1.	Différentes formes du phosphore dans le sol .....	6
I.3.1.1.	Phosphore solide inorganique .....	6
I.3.1.2.	Phosphore organique .....	6
I.3.1.3.	Phosphore soluble (dans la solution du sol ou forme ionique) .....	7
I.3.2.	Mécanisme de solubilisation de phosphate .....	7
I.3.2.1.	Solubilisation de phosphate minéral .....	8
I.3.2.2.	Minéralisation de phosphate organique .....	8
I.3.3.	Importance de phosphate pour la plante.....	8
I.3.4.	Les facteurs influençant la solubilisation de phosphate .....	9
I.3.5.	Micro-organismes solubilisant les phosphates .....	9

## Matériel et méthode

II.1	Échantillonnage .....	11
II.1.1	Lieu de l'expérimentation.....	11
II.1.2	Localisation des sites de prélèvement.....	11
II.2	Isolement des bactéries solubilisant de phosphate .....	12
II.3	Purification et conservation des isolats.....	13
II.4	Identification des isolats .....	13
II.4.1	Réactivation des isolats.....	13
II.4.2	Caractérisations macroscopiques.....	14
II.4.3	Caractérisation microscopique.....	14
II.4.4	Caractérisations biochimiques.....	14
II.4.4.1.	Recherche du catalase .....	14
II.4.4.2.	Recherche de l'oxydase.....	14
II.5.	Évaluation de la solubilisation de phosphate par les isolats .....	15
II.5.1.	Test qualitatif sur milieu solide .....	15
II.5.2.	Test quantitatif sur milieu liquide .....	16

## **Résultat et discussion**

III.1.	Isolement et identification des isolats.....	18
III.1.1.	Caractérisation biochimique .....	19
III.2.	Évaluation de solubilisation de phosphate .....	20
III.2.1	Test qualitative sur milieu solide .....	20
III.2.2.	Test quantitative sur milieu liquide .....	22
	<b>Conclusion</b> .....	<b>24</b>
	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>26</b>
	<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

**BSP** : Bactéries solubilisant le phosphate

**DO** : Densité optique

**GN** :Gélose nutritive

**Jrs** : Jours

**mg** : Milligramme

**ml** : Milliliters

**MSP** : microorganisme solubilisant le phosphate

**NBRIP** : De l'anglais "National Botanical Reseach Institute of Phosphate medium"

**P** : Phosphore.

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

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**PI** : Phosphore inorganique

**PO** : Phosphore organique

**PVK** : Pikovskaya

**RPM** : Rotation par minute

**TCP** : Phosphate tri-calcique

**Tr/min** : Tour par minute

**µg** : Microgramme

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Représentation schématique des zones de la rhizosphère ( <b>Lepinay, 2015</b> ).	4
<b>Figure 2</b>	Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère ( <b>Khan et al., 2009</b> ).	5
<b>Figure 3</b>	Mécanisme de solubilisation des phosphates inorganique et organiques par les microorganismes ( <b>Prabhu et al.,2019</b> ).	7
<b>Figure 3</b>	Localisation des région de prélèvement des échantillons (Google maps)	12
<b>Figure 4</b>	Prélèvement des echantillons de sol.	14
<b>Figure 5</b>	Schéma représentatif d'isolement des bactéries solubilisant de phosphate.	15
<b>Figure 6</b>	Schéma représentatif de réactivation des souches.	15
<b>Figure 7</b>	Schéma représentatif d'évaluation qualitative sur milieu solide .	16
<b>Figure 8</b>	Schéma représentatif d'évaluation quantitatif sur milieu liquide.	16
<b>Figure 9</b>	Isolement sur gélose PVK.	18
<b>Figure 10</b>	Observation macroscopique des isolat.	18
<b>Figure 11</b>	Aspect microscopique (G X100) après coloration de Gram.	19
<b>Figure 12</b>	Pourcentage des isolats de Gram- et Gram+.	19
<b>Figure 13</b>	Pourcentage des isolats qui possèdent l'oxydase	20
<b>Figure 14</b>	Observation de quelque isolat qui ont la capacité de solubilisé le phosphate .	20
<b>Figure 15</b>	Efficacité de solubilisation de phosphate sur milieu PVK solide par les isolats.	21
<b>Figure 16</b>	Dosage de phosphore soluble selon la méthode de vanado-molybdate.	21
<b>Figure 17</b>	Taux de solubilisation de phosphate en milieu NBRIP liquide par les isolats .	22



## Résumé

La capacité des BSP à solubiliser le phosphate est considéré comme l'un des caractères les plus importants associés à la nutrition des plantes. Dans notre étude 26 isolats des bactéries rhizosphérique ont été obtenus. Ces isolats ont été évalués pour leur capacité à solubiliser le phosphate tri-calcique .L'étude de la solubilisation de phosphate sur milieu liquide a montré que le taux de solubilisation maximale été observé chez l'isolat TP1 (6,5ug/mL).

**Mots clés** : solubilisation de phosphate , BSP.

## Abstract

The ability of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) to solubilize phosphate is considered one of the most important traits associated with plant nutrition. In our study, 26 isolates of rhizospheric bacteria were obtained. These isolates were evaluated for their ability to solubilize tricalcium phosphate. The study of phosphate solubilization in liquid medium showed that the maximum solubilization rate was observed in isolate TP1 (6.5 µg/mL).

**Keywords**: phosphate solubilization, PSB.

### المخلص :

تعتبر قدرة البكتيريا المذيبة للفوسفات (PSB) على إذابة الفوسفات واحدة من الصفات الأكثر أهمية المرتبطة بتغذية النبات. في دراستنا، تم الحصول على 26 عزلة من البكتيريا الجذرية. تم تقييم هذه العزلات لقدرتها على إذابة فوسفات الكالسيوم الثلاثي. أظهرت دراسة إذابة الفوسفات في وسط سائل أن معدل الإذابة الأقصى كان ملاحظاً في العزلة TP1 (6.5 ميكروغرام/مل).

**الكلمات المفتاحية** : إذابة الفوسفات ، البكتيريا المذيبة للفوسفات.

# *Introduction*

# Introduction

Le phosphore (P) est un nutriment clé pour la productivité biologique et agricole durable, il joue un rôle fondamental dans tous les processus métaboliques majeurs des plantes, y compris la photosynthèse. Une grande partie (95% à 99%) se trouve sous nombreuses formes inaccessible aux végétaux (**khan et al., 2009**).

En agriculture généralement, l'application des engrais à base de phosphore vient comme une réponse à la déficience du phosphore, mais malheureusement l'utilisation et l'ajout d'engrais en excès de la quantité favorisée par les plantes peut provoquer des problèmes environnementaux nocifs (**Kang et al., 2011**).

Certaines bactéries dénommées comme les BSP (Bactéries solubilisant phosphate) (**Zhu et al., 2011**), sont capables de solubiliser le phosphate insoluble dans le sol pour être accessible pour la plante, c'est un moyen d'augmenter sa disponibilité pour la plante dans l'environnement naturellement (**Bhattacharyya et Jha 2012**). Ces bactéries sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (**Vessey, 2003**), en permettant la disponibilité du phosphore pour les plantes par solubilisation des phosphates précipités (**Kucey et al., 1989**).

L'utilisation de BSP peut non seulement améliorer la disponibilité du phosphore, mais également réduire la dépendance aux engrais chimiques, ils pourraient être une source prometteuse comme agent bio-fertilisant contribuant ainsi à une agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement (**Sharma et al., 2007**).

Pour maximiser l'efficacité des BSP dans la solubilisation du phosphate, il est crucial d'optimiser les conditions de culture, divers facteurs peuvent influencer l'activité de ces bactéries, une compréhension approfondie de ces paramètres et de leurs interactions est nécessaire pour déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir une solubilisation maximale du phosphate.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer les rhizobactéries efficaces dans la solubilisation du phosphate.

Notre travail s'organise autour de trois parties :

La première partie fait état des connaissances existantes sur les rhizobactéries et de leurs capacités à solubiliser le phosphate.

La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la sélection des BSP.

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

***Chapitre I :***  
***Synthèse bibliographique***

## I.1 Rhizosphère

Le terme rhizosphère, employé pour la première fois en 1904 par l'agronome allemand Hiltner, signifie étymologiquement "*rhiza*" racine et "*sphere*" ce qui entoure la rhizosphère est donc la région du sol immédiatement adjacent (environ 2 mm) aux racines des plantes et qui est directement ou indirectement influencé par celles-ci (Bais *et al.*, 2006).

Elle représente le lieu d'échange essentiel entre la plante et le sol. On y observe une présence importante de micro-organismes liés les uns aux autres par de complexes réactions positives ou négatives (Fuchs et Herisse, 1999). Globalement, il existe trois éléments distincts reconnus dans la rhizosphère : Ectorhizosphère, le rhizoplan, et la racine elle-même ou l'endorhizosphère (Fig 1).

L'ectorhizosphère est la zone de sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats affectant l'activité microbienne, le **rhizoplan** est la surface de la racine, comprenant les particules de sol adhérant fortement et l'**endorhizosphère** est une partie du système, car certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus des racines internes (Bowen et Rovira, 1999).

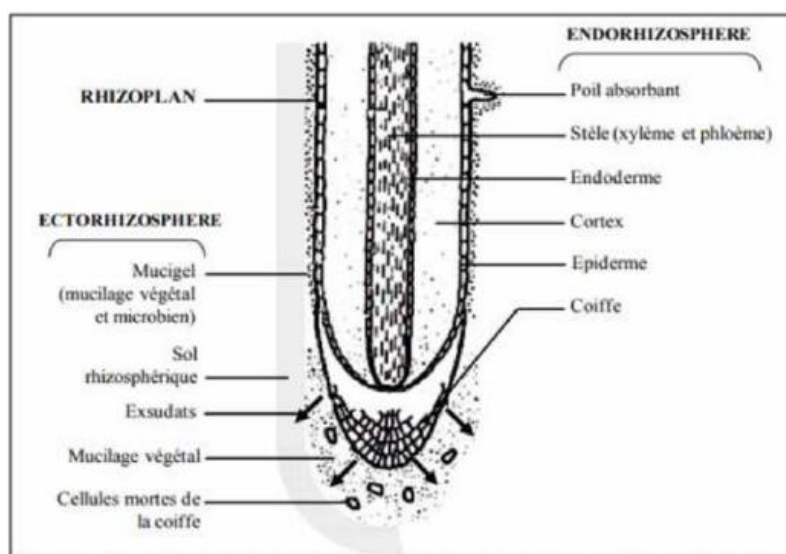
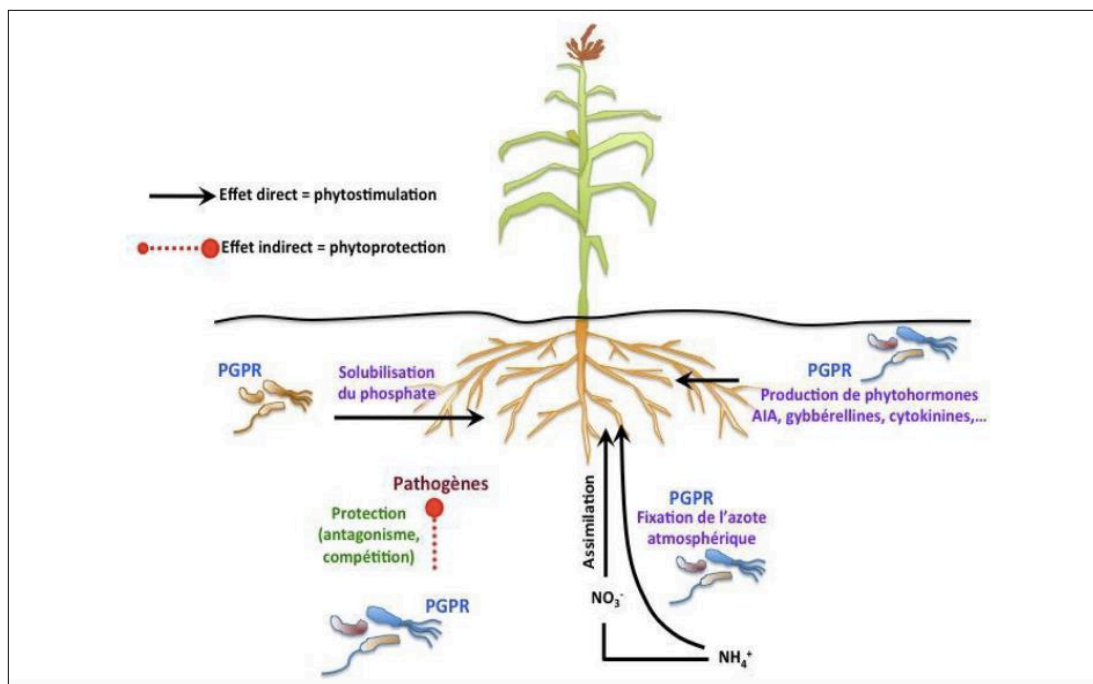


Figure 1 : Représentation schématique des zones de la rhizosphère (Lynch, 1983).

La rhizosphère contient une grande diversité de bactéries appelés les rhizobactéries. Elles peuvent être neutres, pathogènes ou bénéfiques aux plantes qui les entourent. Le groupe des bactéries vivant autour, en contact ou à l'intérieur des racines et ayant la capacité d'apporter des avantages bénéfiques aux plantes sont communément appelé PGPR, de l'anglais : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, signifiant : bactéries promotrices de la croissance des plantes (Rai *et al.*, 2018).

## I.2. Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR)

Le terme PGPR a été proposé pour la première fois par Kloepper en 1980. Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes, de manière directe ou indirecte (**Fig. 2**). Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (**Khan *et al.*, 2009**).



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

### I.2.1. Mécanismes d'action des PGPR :

Les PGPR peuvent modifier la structure des racines et favoriser le développement des plantes (**Kloepper *et al.*, 2007**), et leur croissance par l'un des deux mécanismes direct ou indirect.

Pour le mode direct, les PGPR améliorent la croissance des plantes en solubilisant des minéraux essentiels (azote et phosphore) les rendant ces nutriments plus accessibles aux plantes. Ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (**Munees et Mulugeta, 2014**). Concernant le mode indirect, les PGPR protègent les plantes contre les pathogènes en produisant des antibiotiques, des enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes, et en induisant des résistances systémiques chez les plantes. Ces actions combinées contribuent à une meilleure croissance et à une résilience accrue des plantes.

### I.3. Généralité sur le phosphore :

Le phosphore est un élément qui est largement distribué dans la nature (**Zapata, 2004**). C'est un constituant chimique non métallique (**Beaudin, 2006**). Il est considéré comme le nutriment le moins disponible pour les plantes du fait de sa réactivité élevée avec d'autres éléments présents dans le sol, tels que le calcium, le fer et l'aluminium (**Giroux et al., 2002**).

Malgré les réserves abondantes de phosphore, cet élément n'est pas disponible sous une forme adaptée à l'absorption par les racines des plantes, cette faible disponibilité du phosphore pour les plantes est due au fait que la majorité du P du sol se trouve sous des formes insolubles, alors que les plantes n'absorbent que deux formes solubles du P : les ions monobasiques ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) et dia basiques ( $\text{HP}_2\text{O}_4^-$ ) (**Glick, 2012**).

#### I.3.1. Différentes formes du phosphore dans le sol :

Les différentes formes du phosphore présentes dans le sol résultent de variations dans son acidité, son alcalinité et l'activité biologique du sol. Une première analyse permet d'identifier les formes suivantes :

##### I.3.1.1. Phosphore solide inorganique :

Dans les sols, le phosphate dicalcique dihydraté et le phosphate dicalcique sont principalement présents dans les sols neutres et calcaires. Dans les sols calcaires, le phosphore à faible concentration est retenu par la surface du  $\text{CaCO}_3$  grâce au remplacement des ions de  $\text{CO}_3^{2-}$  par le phosphate. Lorsque la concentration en phosphore est plus élevée, une précipitation de phosphate de calcium se produit à la surface du  $\text{CaCO}_3$  (**Yin et al., 1989**). Initialement, le phosphate de calcium formé est amorphe, mais il se transforme progressivement en une structure cristalline de faible solubilité (**Parfitt, 1978**).

##### I.3.1.2. Phosphore organique :

**Stevenson (1986)** a rapporté que de 15 à 80 % du phosphore (P) présent dans les sols se trouve sous forme organique, avec la quantité exacte dépendant de la nature et de la composition du sol. Selon **Hon et Yuan (1990)**, ce phosphore organique est présent sous forme de phosphate d'inositol (12,1- 32,3 %), de phospholipides (1,9- 5,8 %) et d'acides nucléiques (0,7- 3,7 %).

Pour que le phosphore contenu dans la matière organique du sol puisse être absorbé, il doit être converti en anions orthophosphates par les microorganismes présents dans le sol. La libération du phosphore par la matière organique dépend de plusieurs facteurs, notamment le matériau parental, la profondeur du sol, la température, l'humidité, le niveau d'oxygène et le pH. Lorsque les sols sont cultivés pour la première fois, la teneur en carbone et en azote organiques diminue généralement, ce qui est également observé pour le phosphore organique (**Stevenson, 1986**).



### I.3.1.3. Phosphore soluble (dans la solution du sol ou forme ionique) :

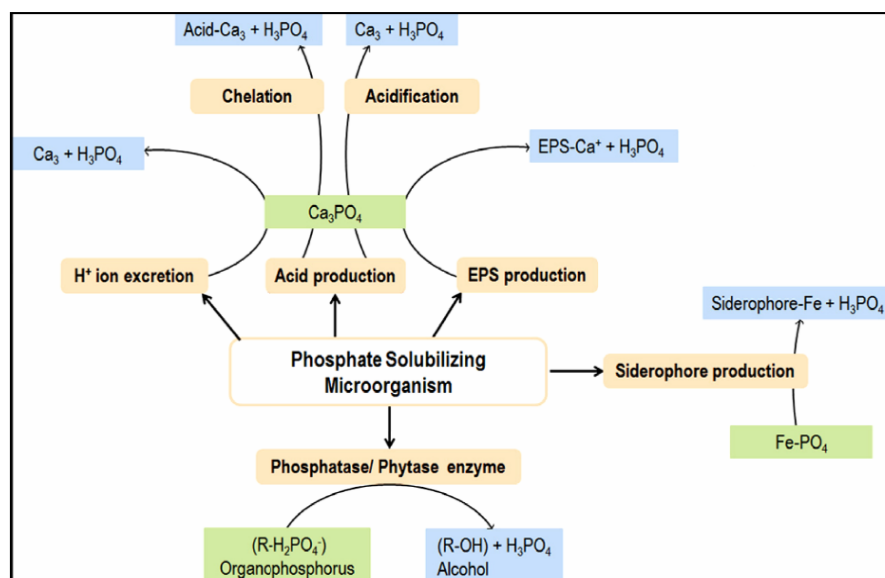
Selon **Pereda Campos (2008)**, le phosphore présent dans la solution du sol représente moins de 1% du phosphore total, Le phosphore dans la solution du sol peut varier de 0,02 à 5,46 mg/L (**Morel et Plenchette., 1994**), avec une valeur moyenne autour de 0,05 mg/L dans la solution du sol.

Le phosphore labile est une fraction particulièrement importante en agriculture car elle est facilement disponible pour les plantes et peut être rapidement lessivée (**Hedley et al., 1982**). Cette fraction englobe le phosphore présent dans la solution du sol, le phosphore organique facilement minéralisable, ainsi que les phosphates peu retenus par les colloïdes argileux (**Demers, 2008**).

### I.3.2. Mécanisme de solubilisation de phosphate :

L'établissement de complexes insolubles tels que le phosphate tricalcique dans les sols alcalins ou neutres et le phosphate d'aluminium et le phosphate de fer dans les sols acides rend le phosphore indisponible pour l'absorption racinaire des plantes (**Barber, 1995**).

Les PSB sont capables de dissoudre le phosphore organique ou inorganique en utilisant plusieurs mécanismes: abaisser le pH du sol en produisant des acides organiques, en libérant des protons et en produisant une minéralisation phosphatase acide (**Fig. 3**) (**Prabhu et al., 2019**).



**Figure 3** : Mécanisme de solubilisation des phosphates inorganique et organiques par les microorganismes (**Prabhu et al.,2019**).

### I.3.2.1. Solubilisation de phosphate minéral

Le phosphore inorganique est solubilisé par l'action d'acides organiques et inorganiques sécrétés par les PSB, dans lesquels les groupes hydroxyle et carboxyle des acides chélatent les cations (Al, Fe, Ca) résultant par une diminution de pH dans les sols basiques (**Stevenson, 2005**).

Parmi les acides organiques, l'acide gluconique semble être l'agent le plus fréquemment impliqué dans la solubilisation et est rapporté comme l'acide organique principal produit par des bactéries solubilisant le phosphate telles que *Pseudomonas sp.* (**Illmer and Schinner, 1992**), *Erwinia herbicola* (**Liu et al., 1992**), et *Pseudomonas cepacia* (**Goldstein et al., 1993**).

Des souches de *Bacillus liqueniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens* ont été découvertes produisant des mélanges d'acides lactique, isovalérique, isobutyrique et acétique (**Rodríguez et Fraga, 1999**).

D'autres mécanismes ont également été envisagés, tels que la production de substances chélatrices par les micro-organismes (**Duff and Webley, 1959**) qui lient les cations métalliques, empêchant la précipitation du phosphate, ainsi que la production d'acides inorganiques tels que l'acide sulfurique, nitrique et carbonique qui réagissent avec les phosphates minéraux, formant des composés plus solubles. Cependant, l'efficacité de ces processus a été remise en question et leur contribution à la libération de P dans le sol semble négligeable (**Vázquez, 1996**).

### I.3.2.2. Minéralisation de phosphate organique

Le phosphore organique peut constituer de 4 à 90 % du phosphore total du sol. Près de la moitié des micro-organismes présents dans le sol et les racines des plantes possèdent un potentiel de minéralisation du P sous l'action des phosphatases (**Cosgrove, 1967 ; Tarafdar et al., 1988**).

Le phosphore présent dans les composés organiques labiles peut être lentement minéralisé (décomposé et libéré) sous forme de phosphate inorganique disponible, ou il peut être immobilisé (incorporé dans des matériaux organiques plus stables) en tant que partie de la matière organique du sol (**Tate, 1984 ; McKenzie and Roberts, 1990**). Le processus de minéralisation ou d'immobilisation est effectué par des micro-organismes et est fortement influencé par l'humidité du sol et la température. La minéralisation et l'immobilisation sont les plus rapides dans les sols chauds et bien drainés (**Busman et al., 2002**).

### I.3.3. Importance de phosphate pour la plante

Le phosphore joue un rôle central dans la nutrition de toutes les plantes en tant qu'élément essentiel participant à une large gamme de processus physiologiques et biochimiques se déroulant dans les organismes vivants (**Vance et al., 2003**). Il favorise : la maturation des

grains, en effet, des teneurs élevées en phosphore réduisent le temps de maturation et améliore ainsi la qualité et la résilience des récoltes. De plus, il stimule la croissance des racines, un apport localisé en phosphore, ainsi qu'en nitrate, favorise la prolifération des racines dans la zone d'application. Enfin, le phosphore est un composant crucial de l'ATP (adénosine triphosphate), la principale molécule d'énergie utilisée par les plantes pour réaliser des réactions chimiques, y compris la photosynthèse. Ainsi, le phosphore est indispensable pour le bon fonctionnement de la photosynthèse, contribuant à l'énergie nécessaire pour les processus vitaux des plantes.

#### **I.3.4. Les facteurs influençant la solubilisation de phosphate**

Parmi les facteurs influençant la solubilisation microbienne du phosphate on note ; les interactions avec d'autres micro-organismes dans le sol, les conditions écologiques car l'environnement global où vivent les micro-organismes, y compris la température, l'humidité et la lumière, peut affecter leur capacité à solubiliser le phosphate, Le phosphore est solubilisé plus rapidement dans les climats chauds et humides et plus lentement dans les climats frais et secs. Un sol bien aéré permettra plus facilement une solubilisation rapide du phosphore par rapport à un sol humide saturé. Ainsi qu'un sol riche en matière organique favorisera la croissance microbienne et favorisera donc la solubilisation microbienne du phosphore (**Alori et al., 2017**).

#### **I.3.5. Micro-organismes solubilisant les phosphates**

Les micro-organismes solubilisant le phosphate (MSP) ont été considérés comme les meilleurs moyens écologiques pour la nutrition des cultures par le phosphate. Bien que, plusieurs bactéries (*Pseudomonas* et *Bacillus*) et des souches fongiques (*Aspergillus* et *Penicillium*) ont été identifiés comme des MSP mais leurs performances dans des conditions in situ n'est pas fiable et doit être améliorées (**Sharma et al., 2013**).

Les PSB peuvent donc constituer une meilleure alternative au problème de la déficience en P dans les terrains agricoles. C'est une technologie agricole écologique et rentable. Selon **Prabhu et al., (2019)**, les travaux sur la formulation de biofertilisants ont évolué au cours des années.

Actuellement, diverses formulations commerciales de PSB sont en vente, comme la formulation **Fosforina®** à base de *Pseudomonas fluorescence* utilisé pour améliorer la biodisponibilité de phosphate pour la plante aidant ainsi à réduire la dépendance sur les engrais chimique, une autre formulation à base de *Bacillus subtilis* nommé **Bio-phospho**, un biofertilisant commerciale en Asie qui permet une meilleure croissance des plantes et une augmentation des rendements agricoles en rendant le phosphore du sol plus accessible.

***Chapitre II :***  
***Matériel et méthode***

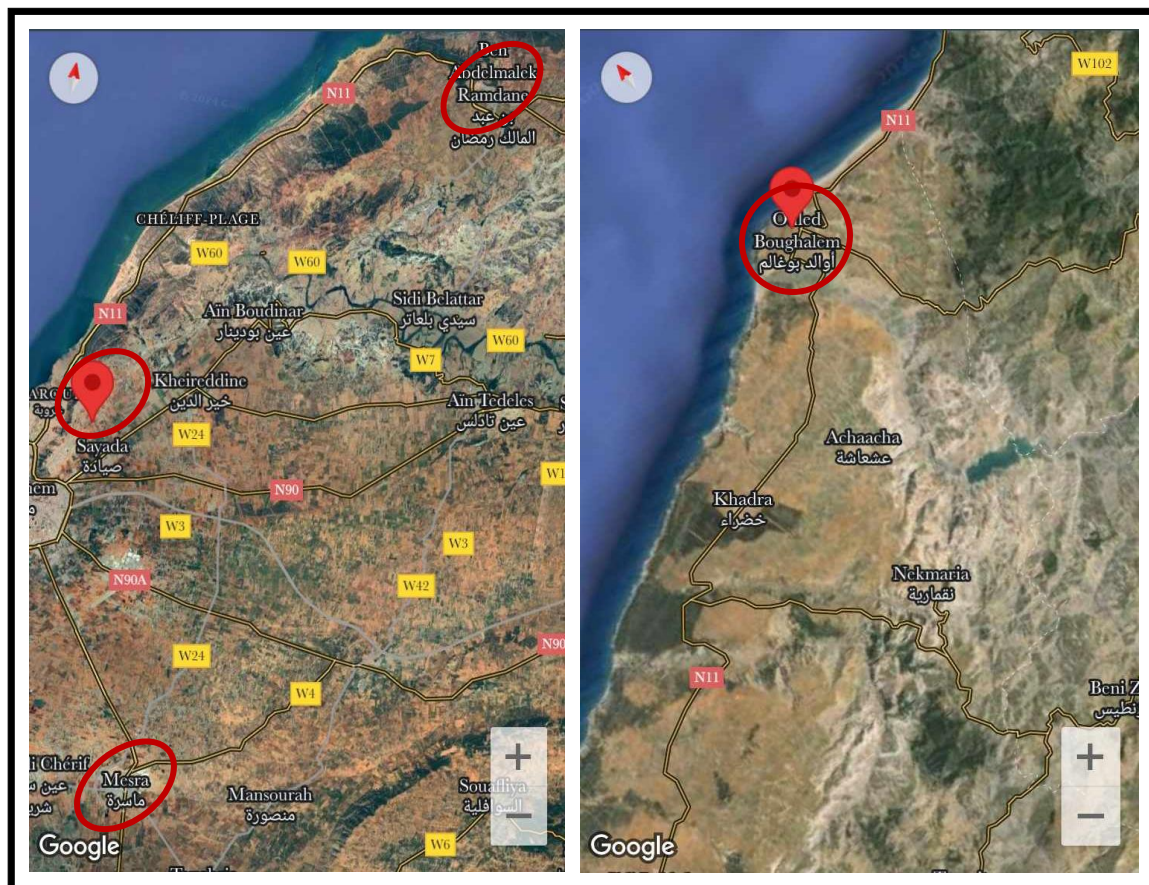
## II.1 Échantillonnage

### II.1.1 Lieu de l'expérimentation

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche de microbiologie et de biologie végétale à l'université « Abd Elhamid Ibn Badis- Faculté SNV » de Mostaganem pendant une période de 4 mois.

### II.1.2 Localisation des sites de prélèvement

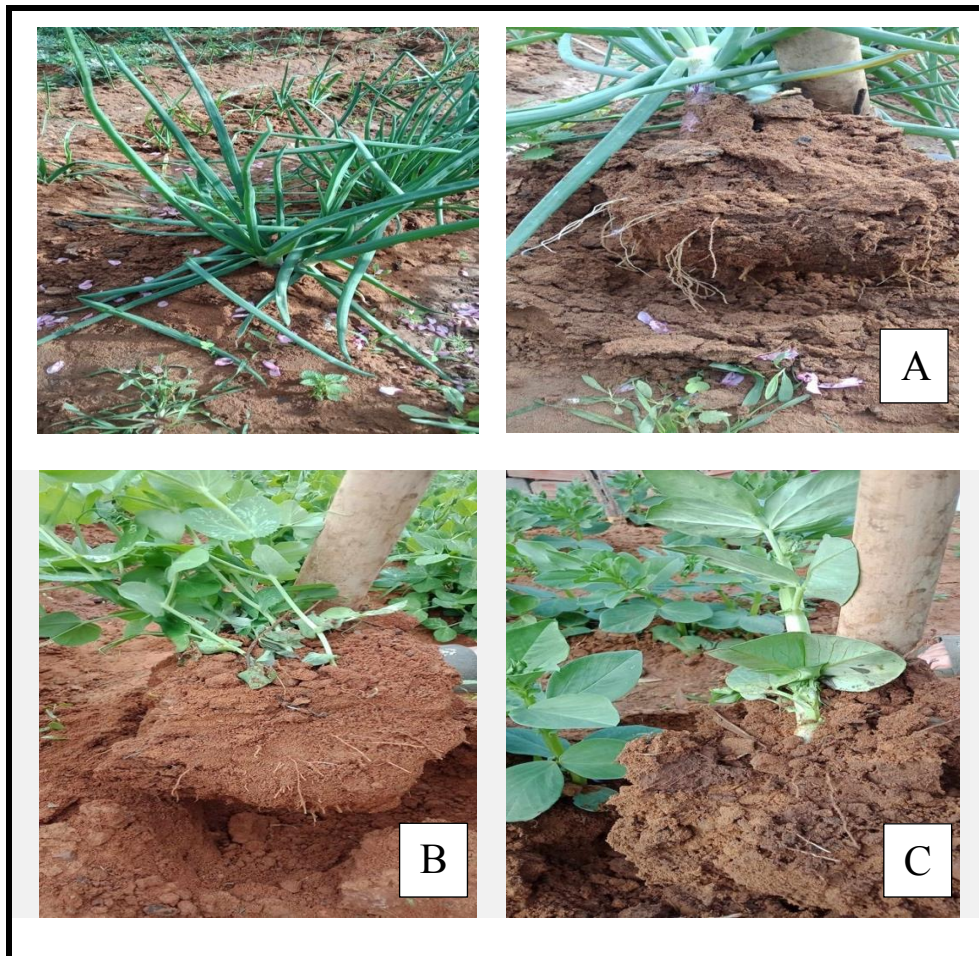
Les échantillons de sol ont été prélevés dans la rhizosphère de différentes espèces végétales, notamment : fève, oignon et petit pois dans les régions Ben –Abdel Malek Ramdane, Ouled boughalem, Hchem et Mesra de la wilaya de Mostaganem (**Fig. 4**). Les coordonnées cartographiques sont données dans (**Annexe V**), les prélèvements ont été effectués durant le mois de février.



**Figure 4** : localisation des régions de prélèvement des échantillons (Google maps)

Pour isoler les bactéries solubilisant le phosphate, 12 échantillons ont été prélevés dans la partie rhizosphérique du sol, à des profondeurs variant de 10 à 15 cm. Ces échantillons ont été placés dans des sachets hermétiquement fermés et stériles, puis transportés directement au

laboratoire à 4°C. Les échantillons collectés ont été tamisés afin d'éliminer les cailloux et les gros débris de matière organique.



**Figure 5** : prélèvement des échantillons de sol

A : oignon ,B : petit pois ,C : fève

## II.2 Isolement des bactéries solubilisant de phosphate

Les racines ont été soigneusement secouées afin de séparer la terre des racines. 10g de sol rhizosphérique de chaque échantillon a été pesé aseptiquement, homogénéisé dans un flacon contenant 90 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une solution mère, 1 ml de cette solution 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 préparé jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-6}$ , ensuite, 0.1ml des trois derniers dilutions ont été étalés 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 I) .les boites ont été incubés pendant 7 jours à 30°C, La solubilisation du phosphate a été mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie sur milieu PVK (Tamietti et Pramotton, 1990).

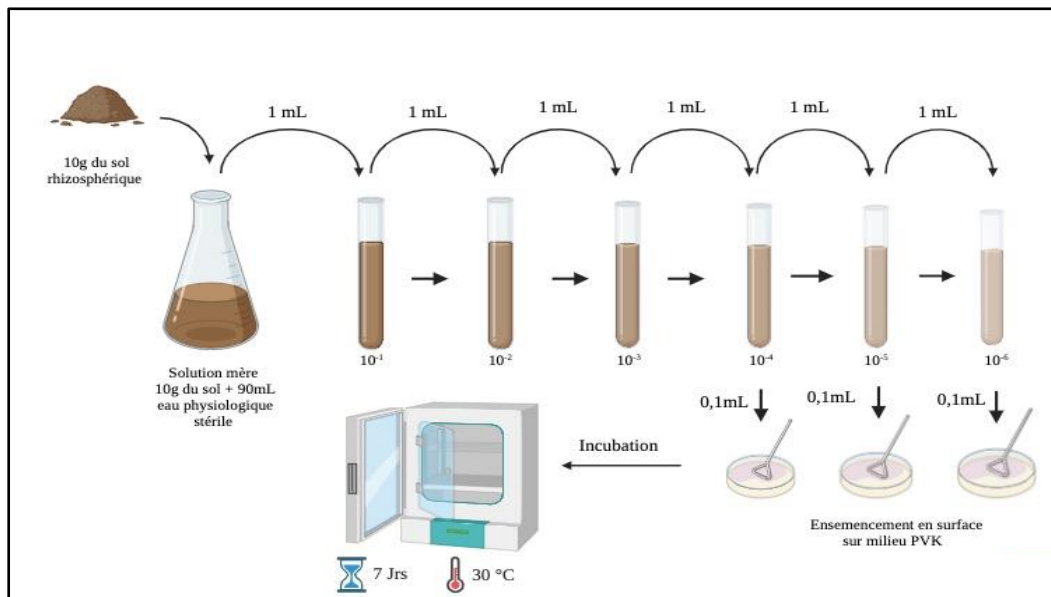


Figure 6 : schéma représentatif d'isolement des bactéries solubilisant de phosphate.

### II.3 Purification et conservation des isolats

La purification des isolats a été effectuée selon la méthode de stries d'épuisement sur gélose nutritif (Annexe I) et incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures, ensuite les isolats purs obtenues ont été conservées à 4 °C après 24 heures d'incubation à 30°C dans des tubes de gélose nutritive incliné.

### II.4 Identification des isolats

#### II.4.1 Réactivation des isolats

Pour la réactivation des isolats, ils ont été ensemencés dans des boîtes Pétri contenant la Gélose nutritive, et incubés à 30°C pendant 24h (Fig. 7).

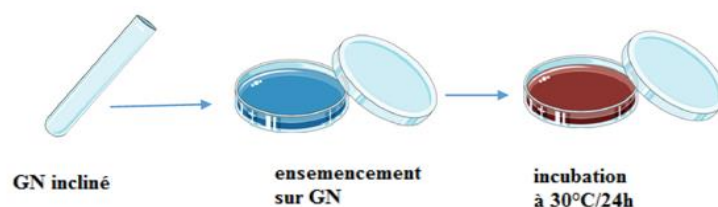


Figure 7 : Schéma représentatif de réactivation des isolats.

## II.4.2 Caractérisations macroscopiques

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification sur les éléments suivant : la taille et la forme des colonies, la couleur des colonies, l'élévation, l'opacité et la surface des colonies étudier (Joffin et Leyral, 2006).

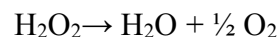
## II.4.3 Caractérisation microscopique

La coloration de Gram est une technique de coloration différentielle, permet de distinguer les bactéries Gram-positif des bactéries Gram-négatif en fonction de la structure de leur paroi cellulaire et de leur forme. Cette analyse a été réalisée sur des frottis minces préparés à partir des culture jeunes de chaque isolat obtenu. Après coloration(Annexe II), les frottis ont été examinés au microscope optique à un grossissement de x100 . Les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose.

## II.4.4 Caractérisations biochimiques

### II.4.4.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. 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. Une colonie bactérienne a mélangé 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).

### II.4.4.2. Recherche de l'oxydase

C'est une enzyme qui intervient dans divers couples d'oxydoréduction, l'enzyme recherchée est la phényle-diamine-oxydase. Le test oxydase a été réalisé grâce à des disques d'oxydase prêts à l'emploi contenant de l'oxalate N- diméthyl-paraphénylène diamine. Les bactéries oxydases positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes (Marchall et al.,1982).

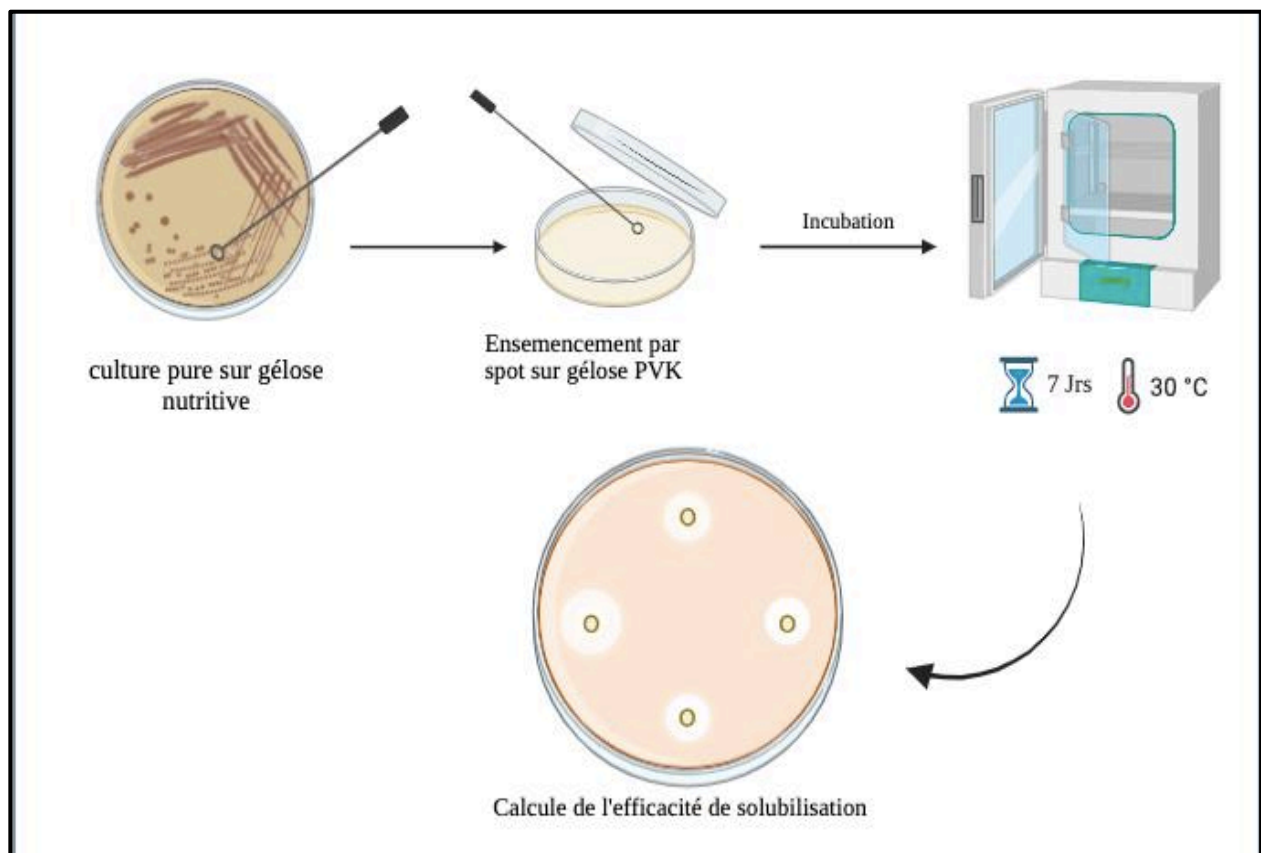


## II.5. Évaluation de la solubilisation de phosphate par les isolats

### II.5.1. Test qualitatif sur milieu solide

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate a été évaluée qualitativement en utilisant le milieu gélosé de Pikovskaya (**Pikovskaya, 1948**) (**Annexe I**). Des cultures pures de chaque isolat ont été ensemencées par spot sur la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Pikovskaya. Après incubation à  $28 \pm 2$  °C pendant 7 jours, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies indique la capacité de solubilisation du phosphate par l'isolat bactérien (**Fig. 8**). Les diamètres des colonies et des halos ont été mesurés, et les résultats ont ensuite été exprimés en efficacité de solubilisation (ES), calculée selon la formule suivante de (**Nguyen et al., 1992**).

L'efficacité de la solubilisation % = (diamètre de halo / diamètre de colonie) x 100



**Figure 8** : Représentation schématique d'évaluation qualitative sur milieu solide.

### II.5.2. Test quantitatif sur milieu liquide

La capacité des isolats a solubilisé le phosphate a été testé quantitativement en milieu NBRIP liquide (National Botanical Research Institutes's phosphate growth medium) ; (Nautiyael,1999) (Annexe I), des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu NBRIP ont été inoculé avec des cultures bactériennes jeunes et incubé à 30°C sous agitation à 160 rpm pendant 7 jrs, après incubation les cultures ont été centrifugées à 6000 trs/min pendant 30min.

La quantité de phosphate soluble dans le surnageant a été déterminé par la méthode spectrophotométrique de jaune vanado-molybdate (Jackson, 1985) (Fig. 9), 1ml de surnageant a été ajouté à 2.5 ml de réactif de Barton (Annexe III) et le volume est complété jusqu'à 50ml avec l'eau distillée. Le développement de couleur jaune indique la présence de forme soluble de phosphate, Après 10 min, la concentration du phosphate a été déterminé par mesure de la densité optique à longueur d'onde 430nm par spectrophotométrie UV-Visible (Spectrophotomètre JENWAY 6715), La quantité de phosphore libéré a été exprimée en µg/ml par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage (Annexe IV).

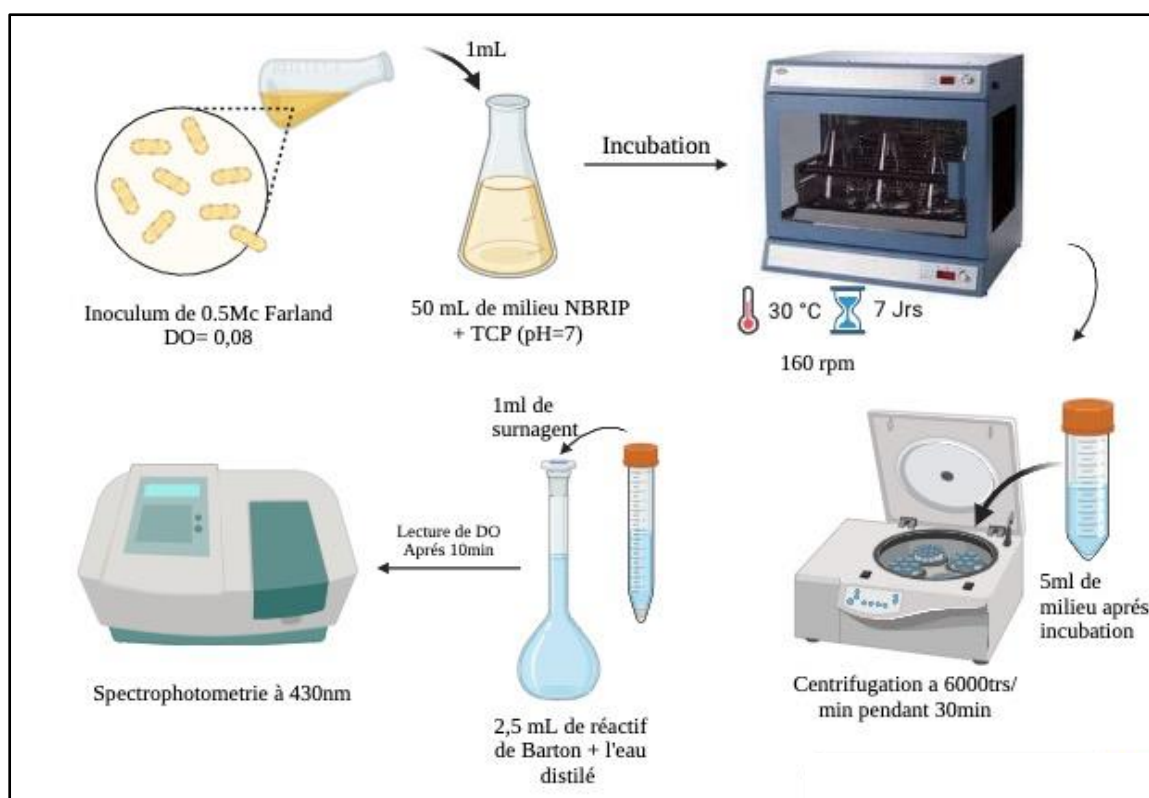


Figure 9 : Schéma représentatif d'évaluation quantitative sur milieu liquide

***Chapitre III :***  
***Résultat et discussion***

### III.1. Isolement et identification des isolats :

Après incubation à 30°C pendant 7 jrs sur le milieu d'isolement (PVK) et purification sur gélose nutritif, 26 isolats ont été sélectionnés à partir du sol rhizosphérique de 12 échantillons après avoir présenté un halo (Fig. 10).

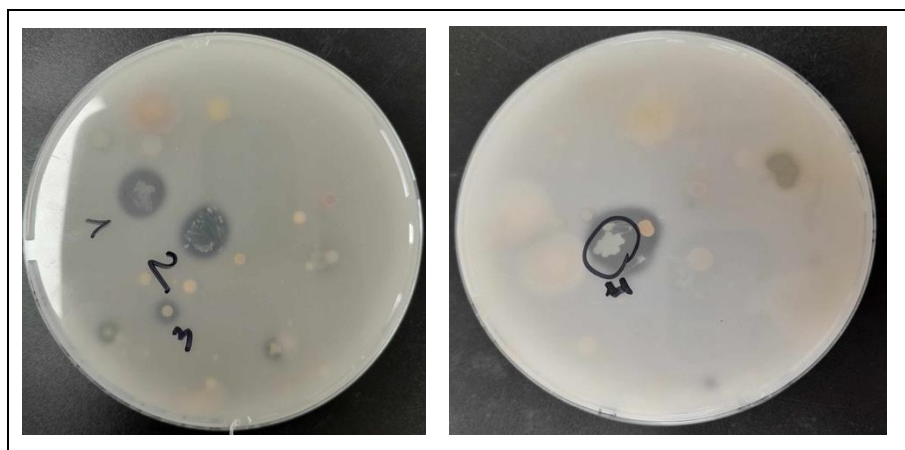


Figure 10 : isolement sur gélose PVK

L'identification des isolats est basée sur leur étude macroscopique, microscopique et leur caractérisation biochimique (Annexe VI).

L'étude macroscopique des isolats ont montré la présence des colonies de forme rond et de taille variable, transparente et opaque, de couleur blanche, beige et jaune (Fig. 11).

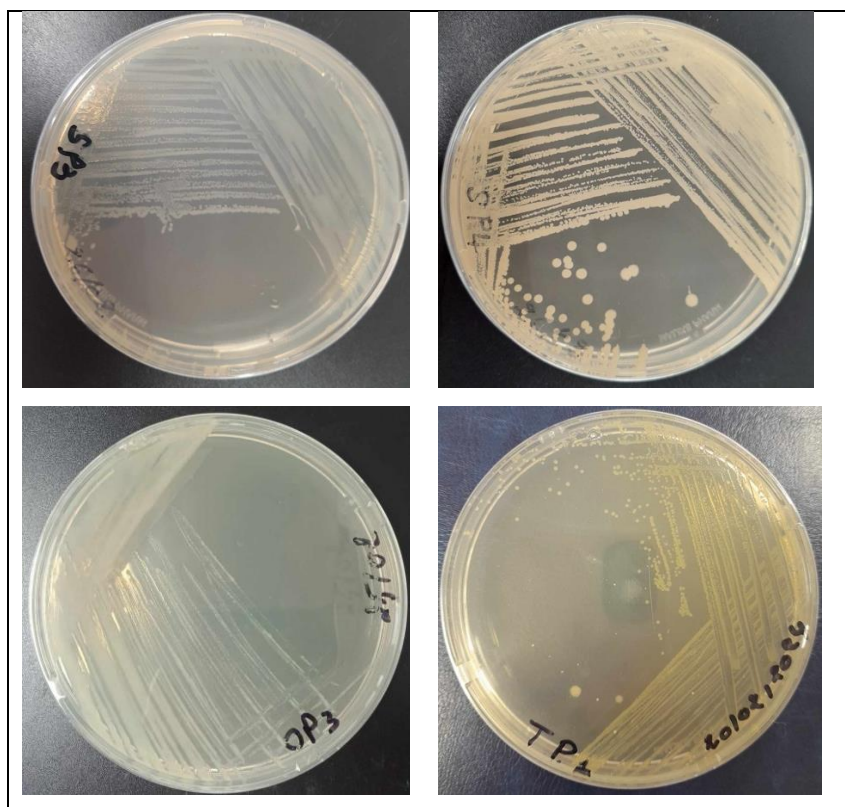
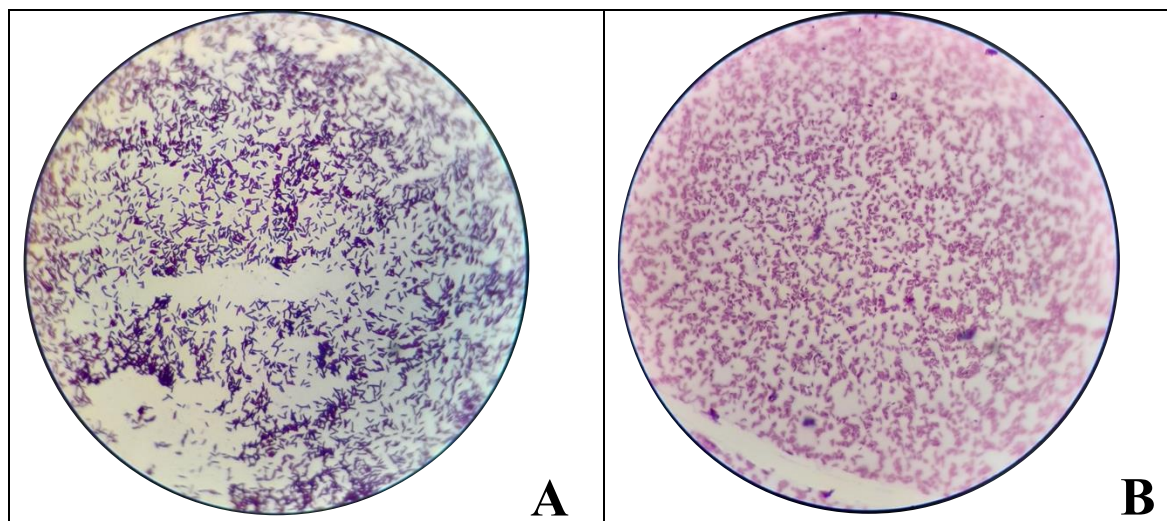
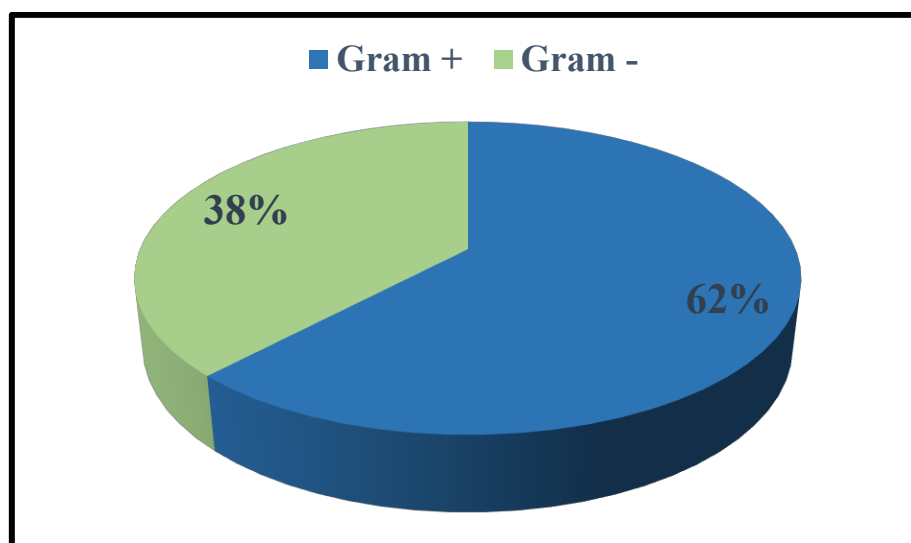


Figure 11 : observation macroscopique des isolats

L'observation microscopique a été faite après coloration de Gram qui nous a permis de différencier les bactéries selon leur forme et leur coloration. Parmi les 26 isolats, 16 isolats (62%) ont été Gram+ avec une couleur violette, et le reste avec un pourcentage (38%) ont été Gram- avec une couleur rose, telle que (OP3, SP2), (Fig. 12), (Fig. 13).



**Figure 12** : Aspect microscopique (G X100) après coloration de Gram.  
A: isolate Gram-positive B: isolate Gram-negative.



**Figure 13** : Pourcentage des isolats de Gram- et Gram+.

### III.1.1. Caractérisation biochimique

Le test catalase a montré que (100%) des isolats étaient catalase +.

La recherche de l'oxydase est parmi les tests biochimique d'identification des isolats, les résultats de ce test ont montré que (85%) des isolats sont oxydase + et (15%) (Fig. 14) sont oxydase -.

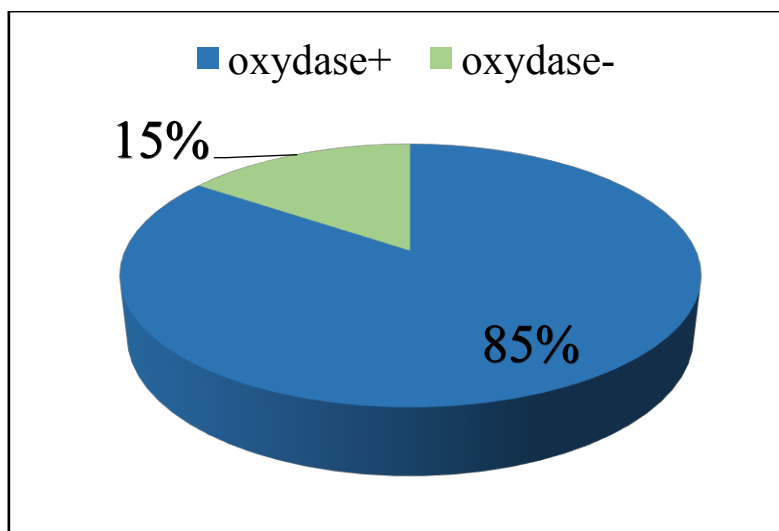


Figure 14 : Pourcentage des isolats qui possèdent l'oxydase.

## III.2. Évaluation de solubilisation de phosphate

### III.2.1 Test qualitatif sur milieu solide

Le pouvoir de solubilisation du phosphate inorganique des isolats a été évalué après leur croissance sur le milieu gélosé de Pikovskaya, il se révèle par un halo de transparence autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 30°C (Fig. 15) L'importance de cette capacité est mesurée par l'efficacité de solubilisation qui varie d'un isolat à l'autre.

Les résultats montrent que la majorité des isolats (19 isolats), (73%) ont la capacité de solubiliser le phosphate sur milieu PVK solide.

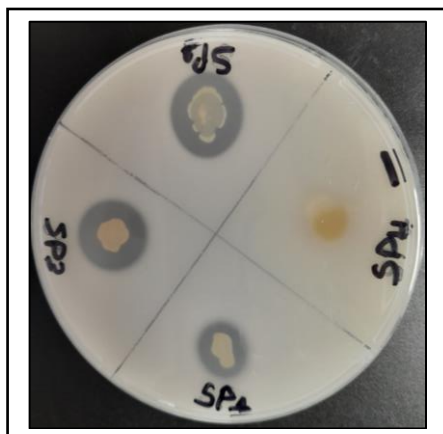
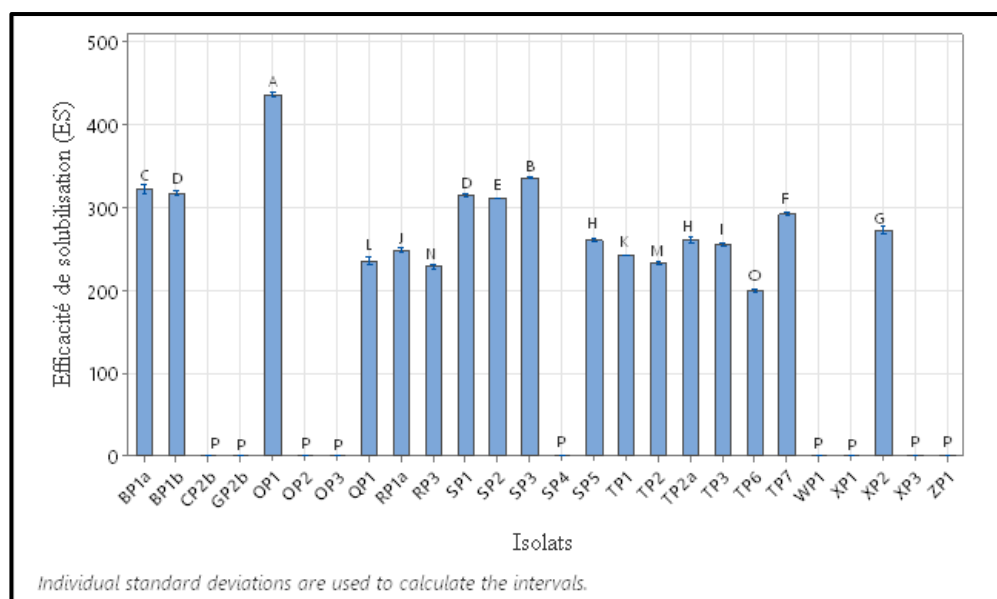


Figure 15 : Observation de quelques isolats qui ont la capacité de solubiliser le phosphate.

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du facteur isolat sur la solubilisation du phosphate ( $P = 0$ )

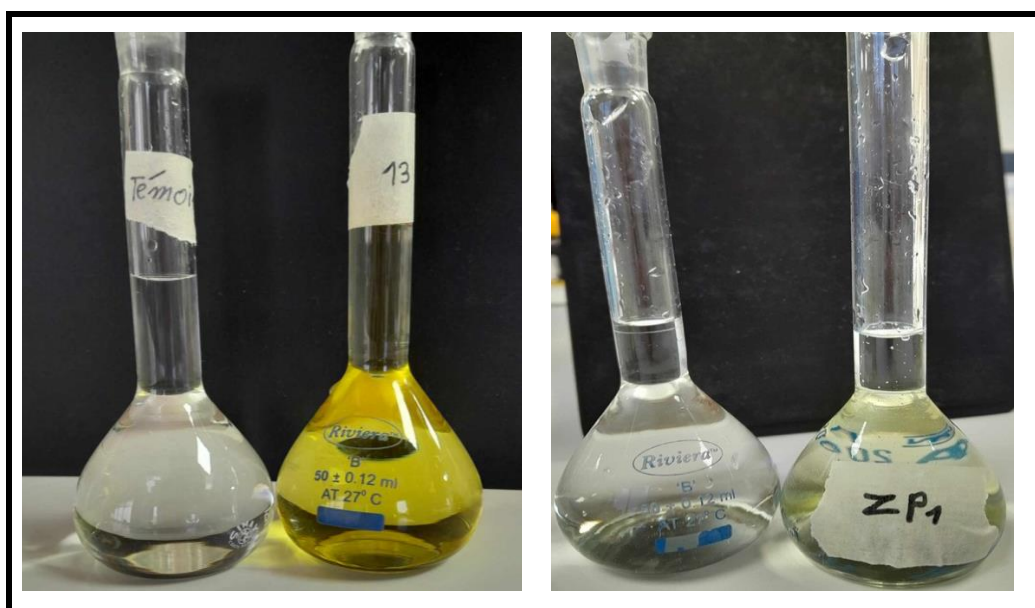
La comparaison entre les isolats a montré une solubilisation maximale chez l'isolats OP1, (435,8<sup>a</sup>), et une solubilisation moyenne chez les 16 isolats entre 335,31<sup>b</sup> et 200,3<sup>p</sup>, et un résultat de solubilisation négative chez 9 isolats comme SP4 (Fig. 16).



**Figure 16** : Efficacité de solubilisation de phosphate sur milieu PVK solide par les isolats

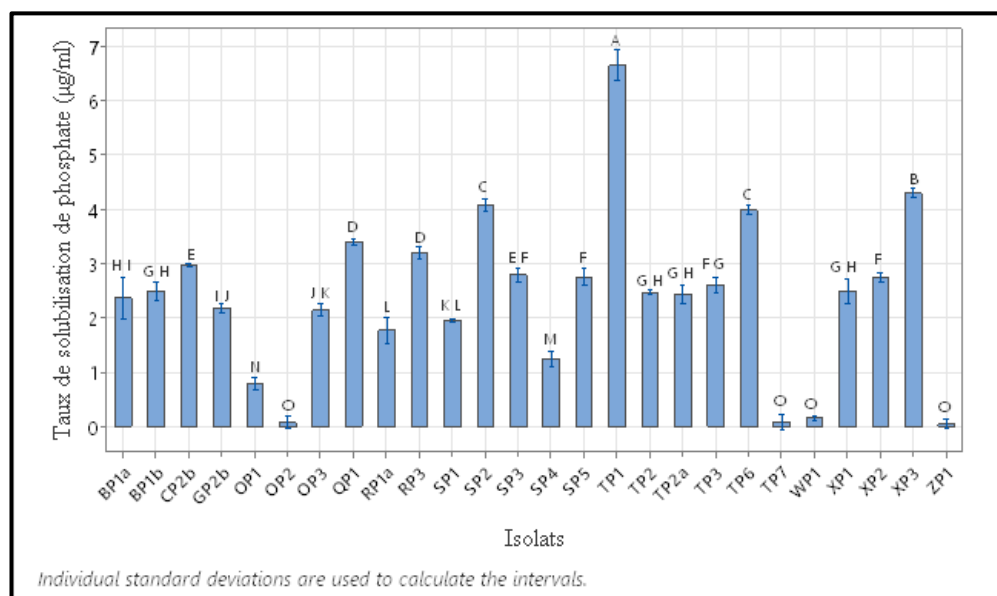
### III.2.2. Test quantitatif sur milieu liquide

L'estimation des quantités de phosphates solubles libérés par les isolats dans le milieu a été réalisée par la méthode de jaune de vanado-molybdate (Fig. 17) après culture en bouillon NBRIP, les concentrations déterminées varient de 6.5 $\mu\text{g/ml}$  à 0,07  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 18) L'analyse de la variance révèle une différence significative pour les différents isolats testés ( $P\text{-value}=0$ ).



**Figure 17** : dosage de phosphore soluble selon la méthode de vanado-molybdate.

La comparaison entre les isolats a montré que l'isolat TP1 a un taux maximum de solubilisation du phosphate par rapport aux autres isolats testés, avec une concentration de 6.5 µg/ml. De plus, la plupart des isolats (21 isolats) ont montré des valeurs entre 4,3 et 1,25 µg/ml. Tandis qu'une concentration minimale de phosphates libres de 0,07 µg/ml a été obtenue par l'isolat ZP1 (**Fig. 17**).



**Figure 17** : Taux de solubilisation de phosphate en milieu NBRIP liquide par les isolats

Les résultats de l'évaluation de la solubilisation de phosphate sur milieu solide et milieu liquide ont montré qu'il y a des isolats qui ont une forte activité sur milieu solide et une activité négligeable sur milieu liquide et vice versa, l'analyse de coefficient de détermination entre les résultats des deux méthodes confirme qu'il y a une corrélation négative ( $R^2 = 0,04$ ).

**El-Azeem et al., (2007)** ont testé la capacité de 81 souches de rhizobactéries à solubiliser le P tricalcique sur milieu solide (méthode qualitative) et liquide (méthode quantitative). 53 des souches testées ont été capables de solubiliser le  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sur milieu solide. Cependant, l'estimation quantitative a montré que 100% des souches sont capables de solubiliser le P. Par conséquent, l'isolement des souches BSP, basé sur la formation d'un halo n'est pas une technique fiable. Les résultats obtenus peuvent être liés au taux de diffusion variable des différents acides organiques sécrétés par les BSP.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Gupta et al. (1994)**, mettant en cause la composition des milieux, le caractère diffusible des composés impliqués dans la solubilisation et les conditions optimales de la croissance bactérienne.



# *Conclusion*

## **Conclusion**

Les bactéries solubilisant le phosphate (PSB) sont couramment présentes dans la rhizosphère et peuvent être employées pour améliorer la disponibilité du phosphore pour les plantes par des mécanismes de solubilisation de phosphate inorganique précipité et de minéralisation de phosphate organique.

Au cours de ce travail un total de 26 isolats a été obtenu à partir de 12 échantillons de sol. Ces isolats ont soumis à des tests clés d'identification et ont été évalués pour leur capacité à solubiliser le phosphate sur milieu solide et liquide.

Les résultats obtenus peuvent avoir des implications significatives pour l'agriculture durable, en particulier dans le développement de biofertilisants à base de BSP. Ces biofertilisants pourraient réduire la dépendance aux engrais chimiques, améliorer la disponibilité du phosphate pour les plantes et ainsi favoriser une croissance végétale saine et productive. Cependant, des bons résultats obtenus *In vitro* ne peuvent pas toujours être reproduits de manière fiable dans des conditions sur champ. La variabilité des performances du PGPR peut être due à divers facteurs environnementaux qui peuvent affecter leur croissance et leur activité métabolique sur la plante, pour cela il serait intéressant d'approfondir les données scientifiques sur les PSB, leurs mécanismes d'action, leurs effets à long terme sur l'environnement et la plante inoculée. Également, l'étude de la sécurité des PSB sur la santé humaine doit être incluse dans les travaux de screening au futur.

# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

- **Alori, E.T., (2017).** "Solubilisation microbienne du phosphore et son potentiel d'utilisation dans l'agriculture durable." *Frontières en microbiologie* ,8, 971. 2 .

### B

- **Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*,57:233-266.
- **Barber S.A., (1995).** Soil nutrient bio availability : a mechanistic Approach. John Wiley & Son N.Y. 398p.
- **Bashan Y., Kamnev AA., de-Bashan LE., (2013)** A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biol Fertil Soils* 49(1):1–2.
- **Beaudin, I., (2006).** Revue de littérature : la mobilité du phosphore .version
- **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.
- **Bowen G. et Rovira A., (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.*, 66, 1-102. *Can. J. Microbiol.*, 12: 531-537.
- **Buddhi, C.W., Won-Sik Kong and Min-Ho Yoon, (2013).** Solubilization of Inorganic Phosphates and Plant Growth Promotion by *Pantoea* Strains, Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764
- **Burns IG., Hutsby W., (1986).** Critical comparison of the vanadomolybdate and the molybdenum blue methods for the analysis of phosphate in plant sap. *Commun Soil Sci Plant Anal* 17(8):839–852
- **Busman L., Lamb J., Randall G., Rehm G., Schmitt M., (2002).** The nature of phosphorus in soils. Université of Minnesota Extension Service, Available de Saint-Lambert-de-Lauzon. Cahiers de l'observatoire de la qualité des sols du Québec, Institut de recherche et de développement en agroenvironnement Inc, 165 P .

## C

- **Chen, Y.P., Rehha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C., (2005).** Phosphate solubilizing bacteria subtropical soil and their tricalcium phosphate abilities, 34 :33-41.
- **Cherif H., (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas .Algérie, 134p comme amendements des sols agricoles.
- **Cosgrove, D. J., (1967).** Metabolism of organic phosphates in soil. In: A. D. McLaren and G. H. Peterson (eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. I. Marcel & Dekker, New York pp. 216-228.
- **Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Delgado, J. and Vinas, I., (2002).** Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Can. J. Microbiol.* 48:987-992.

## D

- **Dastager, S.G., Deepa, C.K., Puneet, S.C. Nautiyal, C.S., and Pandey, A., (2009).** Isolation and characterization of plant growth promoting strain *Pantoea* NII-186 from Western Ghat forest soil, India. *Lett. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02616.x
- **Dave, A., Patel, H.H., (2003).** Impact of different carbon nitrogen sources on phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian J Microbiol*, 43(1): 33- 36.
- **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.
- **Duff, RB., and Webley, DM., (1959).** 2-Ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. *Chem. Ind.* 1376–1377.

## E

- **El-Azeem, S. A. M., Mehana, T.A., Shabayek, A. A., (2007).** Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. *African Crop Science Conference Proceedings*, El-Minia, Egypt. 8, 1517-1525.

## F

- **Fuchs J.G., Herisse J.M., (1999).** Fertilité des sols: Les produits biologiques: bien les connaître pour mieux les utiliser. *biophytosa*. pp. 17-33. 41 p. gestion durable des sols. La Grande Muraille Verte, IRD Éditions, pp. : 369-376.

## G

- **Giroux M., Enright P., (2002).** Concentrations et charges d'azote et de phosphore
- **Glick BR., (1995).** Enhancement of plant growth by living free bacteria. *Can J Microbiol* ,41(2),145–148P.
- **Goldstein, AH., Rogers, RD., and Mead, G., (1993).** Mining by microbe. *Bio/Technology*; 11.1250–1254.
- **Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., Saxena, R. K., (1994).** A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3), 255–260.

## H

- **Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., and Chauhan, B. S., (1982).** Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am.*J.46, 970–976.
- **Hildebrand D.C., Schroth 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. Paluel .Minnostosa.pps.
- **Hon HZ, Yuan KN., (1990).** Studies on organo-mineral complex in soil. IV. Distribution of organic phosphorus compounds in organo-mineral complexes. *Acta Pedol Sin* 27:286–292.

## I

- **Illmer, P., and Schinner, F., (1992).** Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24. 389–95.

## J

- **Jackson, M.L., (1958).** Soil chemical analysis, *Prentice Hall of Engelwood cliffs*, New jersey, USA , 500P.

- **Jeon, J.S., Lee, S., Kim, H.Y., Ahn, T.S., et Song, H., (2003).** Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The J. Microbiol. Soc. Korea*. 41: 271–276.
- **Joffin, J. N & Leyral G., (2006).** Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques, 4ème Ed., Collection Biologie Technique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux. 368 p.
- **Joseph, S., Jisha, M.S., (2008).** Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci* Khartoum, Sudan, 4: P110–112.

## K

- **Kang, J., Amoozegar, A., Hesterberg, D., and Osmond, D. L., (2011).** Phosphorus leaching in a sandy soil as affected by organic and incomposted cattle manure. *Geoderma* 161, 194–201.
- **Karunai Selvi, B., Ravindran, A.D., (2012).** Influence of different carbon and nitrogen sources on insoluble inorganic phosphate solubilization by *Bacillus subtilis*, 2(3): P441-445 .
- **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.
- **Kim KY., McDonald GA., Jordan D., (1997).** Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fertil Soils* 24(4):347–352.
- **Kloepper, JW. Gutierrez-Estrada A., McInroy JA. (2007).** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2): P159-167.
- **Kucey R.M.N., Janzen H.H., Leggett ME., (1989).** Microbial increase in plantavailable phosphorus. *Advances in Agronomy*, P 42, 199-228.
- **Kucey RMN, (1983).** Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and pristine soils of Alberta. *Can J Sol Sci* 63(4), P 671–678.

## L

- **Liu TS., Lee LY., Tai CY., Hung CH., Chang YS., Wolfram JH., Rogers R., Goldstein AH., (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. *J Bacteriol*;174:5814–9.

- **Liu, TS., Lee, LY., Tai, CY., Hung, CH., Chang, YS., Wolfram, JH., Rogers. R., and McKenzie, RH; Roberts TL., (1990).** Soil and fertilizers phosphorus update. In: Proc. Alberta Soil Science Workshop Proceedings, Edmonton, Alberta. Feb. 20-22,, 84-104.
- **Lynch, J.M., (1983).** Microbiological factors in crop productivity, black well Scientific Publications ,Soil Biotechnology, Oxford.

## M

- **Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A.,Farooq, L., (2004).** Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7: P187–196.
- **Marchall, N., Bourdon, J.L. & Richard, C., (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris.
- **McKenzie, RH; Roberts TL., (1990).** Soil and fertilizers phosphorus update. In: Proc. Alberta Soil Science Workshop Proceedings, Edmonton, Alberta. Feb. 20-22, 84-104.
- **Morel, C., Plenchette, C., (1994)** .Is isotopically exchangeable phosphate of a loamy soil and plant available P? *Plant Soil* 15:287–297.
- **Munees, A., Mulugeta, K., (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, *Journal of King Saud University – Science*, January volume 26, Issue 1, P 1–20.

## N

- **Nautiyal C.S., (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*,170(1), 265- 270P.
- **Nguyen,C ., Yan W, Le Tacon F., Lapyire F., (1992).** Genetic variability of phosphate Solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *laccaria bicolor* (Maire) PDOrton, *PlantSoil*143, P 193-199.

## O

- **Olsen, S.R ., Sommers, L.E., (1982).** Phosphorus. Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties. A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin,403-430.



## P

- **Parfitt RL., (1978)** . Anion absorption by soils and soil materials. *Adv Agron* 30:1–50. perdues dans les drains souterrains selon les cultures et les modes de fertilisation.
- **Pikovskaya, R.I., (1948)**. Mobilization of phosphorus in soil inconnection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362-370.
- **Prabhu, N., Borkar, S., Garg, S., (2019)**. Phosphate solubilization by microorganisms. *Advances in Biological Science Research*, 161-176.

## R

- **Rai, A., Cherif, A., Cristina, C. R. U. Z., Nabti, E., (2018)**. Extracts from Marine macroalgae and *Opuntia ficus-indica* cladodes enhance halotolerance and enzymatic potential of diazotrophic rhizobacteria and their impact on wheat germination under salt stress. *Pedosphere*, 28(2), 241-254.
- **Rodríguez, H., and Fraga, R., (1999)**. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech Adv.* 17.319–339.

## S

- **Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi, T.A., (2013)**. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2(1), P 1-14.
- **Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M., Sharma, R., (2007)**. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed sand seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol*, 1: 61-63.
- **Silini-Cherif, H., Silini, A., Ghoul, M., and Yadav S., (2012)**. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. *Pakistan J. Biol. Sci.* 15:267-276
- **Son HJ., Park GT., Cha MS., Heo MS., (2006)**. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores Technol* 97(2):204–210.
- **Stefanoni-Rubio, P.J.; Godoy, M.S.; Della-Mónica, I.F.; Pettinari, M.J.; Godeas, A.M.; Scervino, J.M., (2016)**. Carbon and nitrogen sources influence tricalcium phosphate solubilization and extracellular phosphatase activity by *Talaromyces flavus*. *Curr. Microbiol.*
- **Stevenson EJ., (1986)**. *Cycles of soil*. Wiley, New York.

- **Stevenson, F. J., (2005).** Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley and Sons, New York.

## T

- **Taiwo LB ., Ogundiya M., (2008).** Microbial solubilization of Ogun rock phosphate in the laboratory and in soil. *Afr J Microbiol Res* 2,308–312P.
- **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.
- **Tarafdar, J. C., A. V. Rao and K. Bala., (1988).** Production of phosphatases by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiol.* 33:453- 457.
- **Tate, KR., (1984).** The biological transformation of P in the soil. *Plant Soil*, 76, 245-256.
- **Thakker, J., Narsian, V., Patel, H.H., (1993).** Inorganic phosphate solubilization by certain soil bacteria. *Indian J Exp Biol*, 31: 743-746.
- **Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., Ciardiello, F., (2003).** Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase a antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clinical cancer research*, 9(4), 1566-1572.

## V

- **Vance, CP., Uhde-Stone, C., and Allan, DL., (2003).** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157. 423–447.
- **Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y., (2000).** Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Ferti. Soils* 30, 46–468.
- **Vessey, J. K., (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

## Y

- **Yin JL, Cao CR, Shi RH., (1989).** Study on the phosphorus fixation of calcareous soils in Xu-Huai districts. *Acta Pedol Sin* 26:131–136. (in Chinese).

## Z

- **Zapata F., Roy R.N., (2004).** Utilisation des phosphates naturels pour une agriculture durable.
- **Zhang L., Ding X., Chen S., He X., Zhang F., Feng G., (2014).** La réduction du rapport carbone/phosphore peut améliorer la minéralisation microbienne de la phytine et réduire la concurrence avec le maïs pour le phosphore. *J. Plant Interact.*
- **Zhu, F., Qu, L., Hong, X., and Sun, X., (2011).** Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*

# *Annexes*

## Annexe I

### Composition des milieux de culture

- **Milieu Gélose nutritive(GN)**

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	3g
Extrait de levure .....	3g
NaCl .....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée .....	1000mL
PH =7,0 + 0,2	
Stérilisation à 121°C pendant 20 min.	

- **Milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948)**

Glucose.....	10g
Extrait de levure .....	0,5 g
KCl .....	0,2g
NaCl .....	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O .....	0,002g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,002g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ).....	5g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000mL
PH =7,0	
Stérilisation à 121°C pendant 20 min.	

- **Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's Phosphate medium)**  
**(Nautiyal, 1999)**

Glucose .....	10 g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	5 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ).....	5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
KCl .....	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1g
Eau distillée.....	1000 ml

pH= 7

Stérilisation 120°C pendant 20 minutes.

## Annexe II

### Les technique de coloration

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram, est réalisée selon la technique classique (**Hildebrand *et al.*, 1988**).

Un frottis fixé à la chaleur a été coloré pendant une minute au Crystal violet ; 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 fuchsine 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.

- **Coloration des endospores**

D'abord, le frottis fixé à la chaleur est recouvert par le vert de Malachite, colorant primaire, puis chauffé jusqu'à évaporation pendant environ 5 minutes, la chaleur favorise la pénétration du colorant à travers la paroi de l'endospore. La préparation est ensuite lavée à l'eau pendant environ 30 secondes. Pour colorer les constituants bactériens qui ne sont pas des endospores, le frotti est traité par la safranine qui est un contre colorant. Si le frottis est correctement préparé, les endospores apparaîtront en vert à l'intérieur des cellules bactériennes colorées en rouge ou rose (**Tortora *et al.*, 2003**).

## **Annexe III**

### **Les réactifs**

- **Réactif de Barton**

**Solution A : Ammonium molybdate**

Dissoudre 12,5g d'ammonium molybdate  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , dans 200 ml d'eau distillée.

**Solution B: Ammonium Vanadate**

Dissoudre 0,625g d'ammonium Vanadate  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_4$ , dans 150 ml d'eau distillée bouilli et laisse au froid puis ajouter 125 ml d'acide nitrique à 60%.

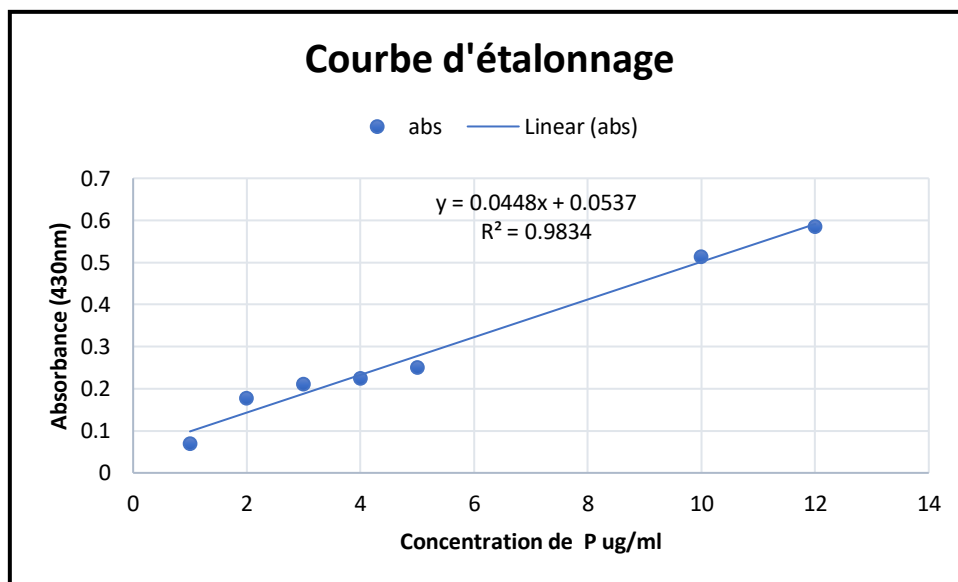
**La réaction de Vanado-molybdate (Barton):**

La solution B est mise dans une fiole de 500 ml, puis la solution A est ajoutée et le volume est complété par l'eau distillée



# Annexe IV

## Courbe d'étalonnage



## Annexe V

### Coordonnées cartographiques des échantillons

Échantillon	Plante	Cordonnées cartographique
B	Petit pois	36° 6'39.3552" N 0° 16'26.9508" E
C	Petit pois	36° 6'39.3552" N 0° 16'26.9508" E
G	Oignon	36° 6'39.3552" N 0° 16'26.9508" E
O	Petit pois	35° 49'55.6248" N 0° 9'58.3884" E
Q	Petit pois	35° 57'23.1444" N 0° 7'31.9836" E
R	Fève	36° 17'48.6528" N 0° 40'51.8736" E
S	Petit pois	36° 17'48.6528" N 0° 40'51.8736" E
T	Oignon	36° 17'48.6528" N 0° 40'51.8736" E
W	Petit pois	35° 49'55.6248" N 0° 9'58.3884" E
X	Oignon	36° 6'39.3552" N 0° 16'26.9508" E
Z	Fève	35° 49'55.6248" N 0° 9'58.3884" E

## Annexe VI

### Caractérisation morphologique et biochimique des isolats

Isolat	Gram	Forme	Couleur	Opacité	cat	oxy	spore
BP1a	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
BP1b	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
CP2b	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
GP2b	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
OP1	-ve	Rond	Jaune	Translucide	+ve	+ve	/
OP2	+ve	Rond	Blanche	Translucide	+ve	-ve	-ve
OP3	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
QP1	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
RP1a	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
RP3	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
SP1	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	-ve	-ve
SP2	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
SP3	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
SP4	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	-ve
SP5	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
TP2a	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	+ve
TP1	+ve	Rond	Jaune	Translucide	+ve	+ve	+ve
TP2	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	-ve	+ve
TP3	+ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	-ve
TP6	+ve	Rond	Jaune	Translucide	+ve	+ve	-ve
TP7	-ve	Rond	Blanche	Translucide	+ve	+ve	/
WP1	+ve	Rond	Blanche	Opaque	+ve	+ve	+ve
XP1	-ve	Rond	Beige	Translucide	+ve	+ve	/
XP2	-ve	Rond	Blanche	Translucide	+ve	+ve	/
XP3	+ve	Rond	Blanche	Opaque	+ve	+ve	+ve
ZP1	+ve	Rond	Blanche	Opaque	+ve	+ve	+ve

Cat :catalase , Oxy :oxydase, +ve : positive , -ve : négative.