

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie et Ecologie Végétale قسم بيولوجيا وايكولوجيا النبات

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

N° d'ordre :                      Domaine : Science de la Nature et de la Vie

N° de série :                      Filière : Biotechnologie Végétale

Spécialité : Biotechnologie et Génomique Végétale

**Intitulé :**

---

Etude de la solubilisation du phosphate par des bactéries isolées de la rhizosphère du blé dur

---

**Présenté par :**                      BORNI Thamina                      HADJOUR Maroua                      **Le 19/06/2022**

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** TEMAGOULT M                      (MAA Université frères mentouri.Constantine1)

**Examinatrice 1 :** LOUALI Y                      (MCB Université frères mentouri.Constantine1)

**Examinatrice 1 :** BOUCHEMAL K                      (MCB Université frères mentouri.Constantine1)

**Année universitaire : 2021-2022**

## **Remercîments :**

*Dieu merci de nous avoir donné la chance d'étudier et la patience pour dépasser toutes les difficultés.*

*Nous remercions toutes les personnes ayant contribuées à l'élaboration de ce travail, nous souhaitons tout d'abord à remercier Mr TAMEGOULT Mahmoud d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Merci pour ses conseils et son orientation dans la conception de ce travail.*

*Nous remercions Mme. LOUALI Y et Mme. BOUCHEMAL K d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Un merci spécial à madame BOULDJEDJ Rima pour les conseils et l'assistance qu'elle nous a donnée.*

*Nous remercions toute l'équipe de laboratoires de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétale.*

*Nous remercions également nos enseignants de BTGV pour leurs efforts, encouragement.*

*Un grand merci à nos collègues de BTGV.*

*Dédicace :*

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers biens aimés :*

*Mon père Samir et ma mère Mahdia*

*Ma sœur Lina*

*Mes frères Malik et Milad*

*Ma chère grand-mère Zhira*

*Tous mes amis en particulier Ghada et Nihad*

*A toutes les personnes que j'aime « FMZ »*

*Thamina*

*Dédicace :*

*A mes chers parents Nadia et Ayache, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A mes chers sœurs Zeineb, Yousra et Nesrine pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A mon cher frère Ayoub*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible.*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

**Maroua**

## **Résumé :**

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), jouent un rôle très important pour la nutrition des plantes. Parmi ces rôles la solubilisation des minéraux présents dans les sols.

Dans le présent travail nous avons fait une étude sur 20 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) pour leurs capacités à solubiliser le phosphate inorganique, dont la seule source est la roche phosphate.

Les résultats montrent que les souches étudiées ont la capacité de solubiliser le phosphate et que cette efficacité est plus élevée chez les isolats A11, A25, A34, H6, H16, H32, et elle est faible chez les souches A3, A26, B41, H10, H25, Ps « R ».

**Mots clefs :** PGPR, Blé dur, solubilisation du phosphate, roche phosphate, rhizosphère.

**Abstract:**

Plant growth promoting bacteria PGPR play a very important role for plants nutrition. Among these roles the solubilization of minerals present in soils.

In the present work, we made a study on 20 bacterial strains isolated from the rhizosphere of durum wheat (*Triticum durum*) for their ability to solubilize mineral phosphate, the only source of which is phosphate rock.

The results demonstrate that the strains studied have the ability to solubilize phosphate and that this efficiency is higher in the isolates A11, A25, A34, H6, H16, H32, and low in strains A3, A26, B41, H10, H25, Ps”R”.

**Key words:** PGPR, Durum wheat, phosphate solubilization, phosphate rock, rhizosphere.

## ملخص

تلعب البكتيريا المحفزة لنمو النبات PGPR دورا مهما للغاية في تغذية النبات. من بين هذه الأدوار إذابة المعادن الموجودة في التربة.

في العمل الحالي قمنا بدراسة على عشرين سلاسة بكتيرية معزولة من جذور القمح القاسي (*Triticum durum*)

لقدرتها على إذابة الفوسفات المعدني الذي ومصدره الوحيد هو صخور الفوسفات.

أظهرت النتائج أن السلالات المدروسة لديها القدرة على إذابة الفوسفات، وان هذه الكفاءة أعلى في العزلات

.A11, A25, A34, H6, H16, H32

وأنها منخفضة في السلالات .A3, A26, B41, H10, H25, Ps

الكلمات المفتاحية: phosphate rock, rhizosphere, PGPR, Durum wheat, phosphate solubilization .

**Liste des figures :**

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure01</b>	Le blé dur.	<b>2</b>
<b>Figure02</b>	Schéma representative d' une coupe de la rhizosphère.	<b>4</b>
<b>Figure03</b>	Mécanismes de la solubilisation du phosphate par les bactéries PSB	<b>8</b>
<b>Figure04</b>	La roche phosphate.	<b>14</b>
<b>Figure05</b>	Boîtes de pétri des différents souches bactériennes isolées de la rhizosphère de blé dur.	<b>14</b>
<b>Figure06</b>	Dispositif expérimentale pour l'étude de la solubilisation du phosphate sur milieu liquide	<b>15</b>
<b>Figure07</b>	Observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram(x1000).	<b>17</b>
<b>Figure08</b>	Test qualitatif d'analyse de phosphate à solubilisé sur le milieu PKV solide	<b>19</b>
<b>Figure09</b>	L'efficacité de solubilisation du phosphate sur milieu PKV solide	<b>20</b>
<b>Figure10</b>	Solubilisation de la roche phosphate par les souches étudiées sur milieu PKV liquide	<b>24</b>



**Liste des tableaux :**

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau01</b>	Classification botanique du blé dur ( <i>TriticumDurumDesf</i> ).	<b>3</b>
<b>Tableau02</b>	Les différentes souches utilisées.	<b>13</b>
<b>Tableau03</b>	Caractères morphologiques des espèces bactériennes isolées à partir la rhizosphère de blé dur ( <i>Triticumdurum</i> ).	<b>17</b>
<b>Tableau 04</b>	Mesure de la surface des halos et des colonies.	<b>19</b>
<b>Tableau 05</b>	Mesure de taux de Ph et le phosphate soluble sur le milieu liquide.	<b>22</b>

**Liste des abréviations :**

<b>ACC</b>	Acide-1-aminocyclopropane carboxylique
<b>AIA</b>	Acide Indole Acétique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>GBBV</b>	Laboratoire de génétique, biochimie, biotechnologie végétale
<b>N<sub>2</sub></b>	Diazote
<b>P</b>	Phosphate
<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PKV</b>	Milieu picovskaya
<b>PSB</b>	Bactéries solubilisatrice du phosphate
<b>Rpm</b>	Rotation par minute
<b>µl</b>	Microlitre

## Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Résumé

Introduction

I.	Revue bibliographique.....	3
I.1	Le blé .....	2
I.1.1	Description de l'espèce .....	2
I.1.2	Historique et origine de blé dur.....	2
I.1.3	Classification botanique .....	3
I.1.4	Intérêt économique de blé dur :.....	3
I.2	Association plante microbe dans la rhizosphère : .....	4
I.2.1	Rhizosphère .....	4
I.2.2	Rhizobactéries ou les bactéries Rhizosphériques :.....	4
I.2.3	Rhizobactéries stimulatrices de la croissance végétale (RFCP ou PGPR): .....	5
I.2.4	Diversité taxonomique des PGPR .....	5
I.2.4.1.	Les proteobacteria .....	5
A.	Alphaproteobacteria.....	6
B.	Betaproteobacteria.....	6
C.	Gamaproteobacteria.....	6
I.2.4.2	Firmicutes.....	6
I.2.4.3	Actinorhizobacteria .....	6

## Sommaire

I.2.5	Modes d'actions des PGPR .....	6
I.2.5.1	Mode direct.....	7
I.2.5.1.1	La biofertilisation.....	7
	➤ fixation biologique d'azote.....	7
	➤ solubilisation du phosphate inorganique.....	7
I.2.5.2	La biostimulation.....	8
-	auxine AIA (Acide indole acétique.....	8
-	production de l'éthylène et ACC désaminase.....	8
-	les cytokinines.....	9
-	les gibbérellines .....	9
I.2.5.2	Mode indirect.....	10
I.2.5.2.1	Le biocontrôle.....	10
	➤ la production de sidérophores.....	10
	➤ la production des antibiotiques.....	10
II.	Matériel et Méthodes .....	12
II.1	Matériel biologique .....	11
II.2	Méthodes .....	11
II.2.1	Préparation des cultures bactériennes .....	11
II.2.1.1	Préparation des cultures bactériennes sur milieu solide.....	12
II.2.1.2.	Préparation des cultures bactériennes sur milieu liquide.....	12
II.2.2	Coloration différentielle de Gram et caractérisation morphologique.....	12
A.	coloration du Gram.....	12
B.	caractérisation morphologique.....	12
	➤ Observation microscopique.....	12
II.2.3	Test de solubilisation du phosphate: .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.3.1	Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV Solide .....	14

## **Sommaire**

II.2.3.1.1 mesure de la zone de solubilisation.....	14
➤ ImageI.....	15
II.2.3.2 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide.....	15
III. Résultats et discussion:.....	16
III.1 Coloration du Gram et caractérisation morphologique .....	17
A. Coloration du Gram.....	17
B. Caractérisation morphologique.....	17
➤ Observation microscopique.....	17
III.2 Mesure de la solubilisation du phosphate .....	18
III.2.1 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV solide .....	19
III.2.2 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide .....	22
A. Acidification du milieu.....	22
B. solubilisation du phosphate.....	24

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# *Introduction*

---

## **Introduction**

Les céréales constituent une part importante des ressources alimentaires de l'homme et de l'animal (**karakas, 2011**). Parmi ces céréales, le blé dur (*Triticum durum Desf*), qui compte parmi les espèces les plus anciennes et constitue une grande partie de l'alimentation de l'humanité avec une totalité de 95% pour la population mondiale (**Greenway et Munns, 1980 ; Bonjean et Picard, 1990**).

Il y a plus de 20 millions d'hectares de cultures de blé dur (*Triticum durum*) à travers le monde entier pour atteindre l'autosuffisance de la race humaine. L'Algérie se considère comme l'un des pays qui cherche à faire ce qu'on appelle « la sécurité alimentaire à travers la production et l'importation de cette récolte ». (**Anonyme, 2000**).

Depuis longtemps les engrais sont utilisés par les agriculteurs dont l'objectif est de fournir des nutriments tels que l'azote, la potasse(K) et le phosphore(P) nécessaires pour le développement et la croissance des cultures végétales (**Elhaissoufi, 2021**).

Actuellement, il existe de nouvelles méthodes d'amélioration des plantes parmi ces méthodes l'utilisation des technologies microbiennes sur le champ d'agriculture qui signifie l'utilisation des micro-organismes .Il y a des relations bénéfiques entre les plantes et les micro-organismes,l'homme a exploité ces interactions surtout dans le cycle d'amélioration de ses cultivars afin d'obtenir un bon rendement sans l'utilisation des substances chimiques tels que les engrais, qui exercent à leurs tour des conséquences peuvent être néfastes sur la santé humaines, l'environnement...(Compant, 2007).

En effet, les microorganismes dissolvant le phosphore et améliorant la croissance des plantes constituent deux groupes, ceux qui vivent à l'état libre et ceux qui vivent en symbiose avec les plantes (**Gerretsen, 1948 ;Frommel et al, 1991 ;Leggett et al, 2001**).

Parmi les micro-organismes des sols qui vivent en symbiose avec les plantes, les rhizobactéries connues sous le terme PGPR (Plant GrowthPromotingRhizobacteria), ce genre des bactéries vit dans le sol et porte l'effet de la promotion de la croissance de la plante (**Kloepper, 1980**).

Ces PGPR favorisent la croissance des plantes grâce à des mécanismes biologiques tels que : la fixation de l'azote, la production des phytohormones, la synthèse des antibiotiques, la diminution du stress environnemental dans le sol (**Fuentes et al, 2005**).

Notre travail consiste à faire une caractérisation de 20 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé dur afin d'étudier leurs capacités à solubiliser l'un des nutriments les plus intéressants à la croissance des plantes le phosphate(P).



# *Revue bibliographique*

---

## **I. Revue bibliographique:**

### **I.1 Le blé:**

#### **I.1.1 Description de l'espèce:**

Le blé dur est une plante herbacée annuelle des climats chauds appartenant au groupe des céréales à paille, il est caractérisé par ses grains très durs, nus et translucides (**Aknouche et Laib, 2017**).



**Figure01. Le blé dur (Beaudoin, 2021)**

#### **I.1.2 Historique et origine du blé:**

Le blé est une espèce connue depuis l'antiquité, il est considéré comme étant la première source d'alimentation des populations du globe (**Yves et Buyer, 2000**).

La découverte du blé remonte à 15000 ans avant Jésus-Christ dans la région du croissant fertile.

##### **➤ Origine géographique:**

Selon **Vavilov in Erroux (1961)**, il y a deux centres d'origine de blé dur : le centre générateur est le moyen orient où il s'est différencié dans trois régions : le bassin occidental de la méditerranée, le sud de la Russie et le Proche Orient (Syrie et nord de la Palestine), et le centre secondaire est l'Afrique du nord (**chikhi, 1992**).

##### **➤ Origine génétique:**

Les savants **Riley et Chapman** ont démontré que l'origine du blé dur remonte à l'hybridation du génome de deux espèces entre *Triticum diploïde* (génome A) *Tr. beoticum* et *Tr. Monococcum*, et *l'Egilops speltoides* (génome B).

### I.1.3 Classification botanique:

Le blé dur appartient à la famille des graminées (Gramineae = Poaceae), qui comprend plus de 10000 espèces différentes (Mac Key, 2005), plusieurs espèces différentes sont regroupées dans le genre *Triticum* qui est un exemple classique de blé. Selon Bonjean et Picard, 1990 le blé dur est obéit à la classification suivante :

Classification botanique	
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Poales
Famille	Poaceae ou graminaceae
Sous famille	Festucoides
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum durum Desf</i>

**Tableau01** : Classification botanique du blé dur *Triticum Durum Desf* (Iouanes, 2010).

### I.1.4 Intérêt du blé dur:

Le blé occupe le troisième rang des céréales cultivées dans le monde, il considéré comme la première source d'alimentation humaine, car il fournit plus de 60% des calories et des protéines, le blé dur utilisé principalement pour la fabrication des pâtes alimentaires et des semoules. L'utilisation du blé est très puissante surtout dans le domaine industriel y compris la production des semences (Charles, 2010).

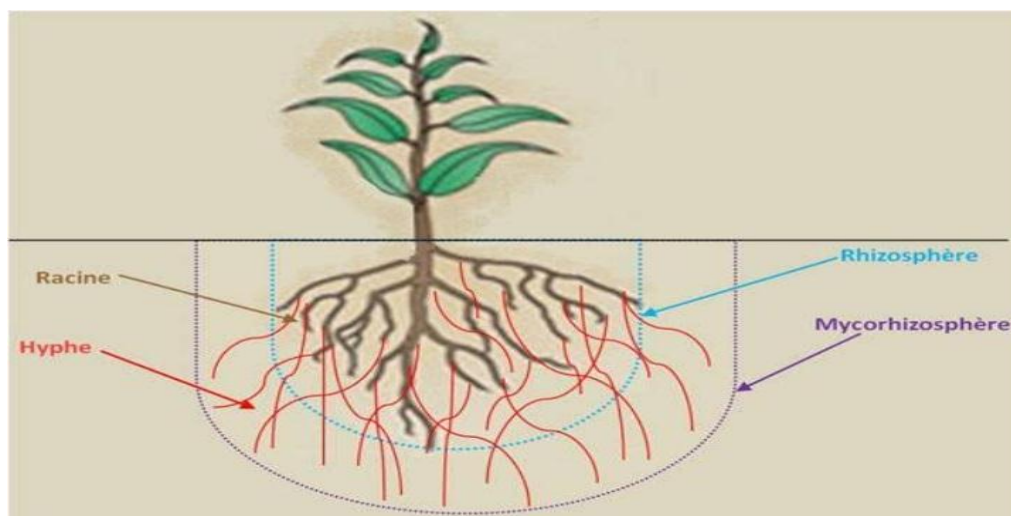
## **I.2 Association plante micro-organisme dans la rhizosphère:**

### **I.2.1 Rhizosphère:**

Le terme rhizosphère se divise en deux mots « rhiza » vient du grec qui signifie la racine, et du mot latin « sphaera » signifiant ballon ou globe qui désigne le cycle d'influence (Balzergue, 2012).

La rhizosphère est un terme qui a été décrit en 1904 par l'agronome et le microbiologiste allemand **Hiltner Lorentz** après observé une région du sol proche à des racines de plantes riche en éléments nutritifs libérés par les racines sous forme des exsudats racinaires.

Au sein de cette région il y a une grande diversité des micro-organismes au niveau du sol appelé la microflore du sol ; regroupe les champignons, les virus, les bactéries, les algues... (Alexander, 1991 ; Glick, 2014). Certains groupes de la microflore du sol sont pathogènes tandis que des autres sont bénéfiques pour plantes.



**Figure02.** Schéma représentatif d'une coupe de la rhizosphère (Stengel et Gelin, 1998).

### **I.2.2 Rhizobactéries ou les bactéries Rhizosphériques:**

Parmi la microflore du sol, les bactéries sont les plus abondantes pouvant aller jusqu'à  $10^{11}$  bactéries par gamme de racine (Egamberdieva *et al*, 2008 ; Berendsen *et al*, 2012). entre 2 à 5% des bactéries associées avec les racines appelées les rhizobactéries qui sont importants pour le développement et la croissance des plantes (Antoun et Kloepper, 2001).

La nature de l'activité, le nombre et la composition de ces rhizobactéries dépendent des substances sécrétées par les racines (les exsudats racinaires)(**Bais et al, 2006**).

### **I.2.3 Rhizobactéries stimulatrices de la croissance végétale (RFCP ou PGPR):**

Le terme PGPR a été introduit pour la première fois par les deux savants **Kloepper et Schroth** à la fin des années 1970, après avoir trouvé l'effet d'amélioration des souches de *Pseudomonas* fluorescentes en rendement des cultures de pommes de terre par la production de sidérophores (**Garcia et al, 2003**).

Les PGPR sont un groupe particulier des bactéries non pathogènes connus sous le nom(RFCP) ou (PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ») (**Kloepper et Schroth, 1978**).

Elles colonisent efficacement la rhizosphère en association avec les racines,elles peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes selon leurs établissements dans cette zone. Le bienfait de ces rhizobactéries est la stimulation de la croissance et la protection des plantes contre les agents pathogènes (**Suslow, 1982 ; Weller, 1988**). En effet, ces PGPR permettent aussi de fournir des bénéfices pour la zone rhizosphérique car elles ont la capacité d'entrer dans des différentes interactions avec les autres microorganismes tels que les compétitions, le mutualisme...

. On distingue deux groupes : les PGPR phytostimulatrices et les PGPR phytoprotectrices (**Malek, 2015**).

Il existe des genres dans ce groupe de rhizobactéries Tels que : les *Pseudomonas* non pathogènes, *Bacillus*, *Azospirillum* et *Alcaligenes*...

### **I.2.4 Diversité taxonomique des PGPR:**

Dans les dernières années, le nombre des PGPR a augmentées car les modes d'action de ces bactéries ont été suffisamment étudiés et que la rhizosphère a une importance dans le déroulement de la biosphère.

Ces PGPR appartiennent aux quatre phyla :Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (**Hugenholtz, 2002**).

#### **I .2.4.1. Les proteobacteria:**

Il existe quatre classes :

**A. Alphaproteobacteria:**

Les souches rhizobia appartenant de cette classe peuvent prendre le comportement des PGPR à cause de leurs capacité à solubiliser les nutriments insoluble tels que l'azote et leurs capacité à noduler les racines des plantes quand elles occupent la zone de la rhizosphère en association avec les racines des plantes non légumineuses (**Sawada et al, 2003**).

**B. Betaproteobacteria:**

Cette classe comprenant la famille Burkholderiaceae qui comporte diverses espèces qui peuvent être isolées à partir de la rhizosphère. Quelques bactéries de cette famille ayant la capacité de fixer l'azote (**Moulin et al, 2001**).

**C. Gammaproteobacteria:**

C'est la classe la plus importante et nombreuse, qui comprenne une diversité des micro-organismes ayant des propriétés physiologique et écologique. Cette classe comprenant la famille des *Pseudomonaceae* comprend le genre *Azotobacter* et le genre *Pseudomonas*, ces genres composé des bactéries promotrices de la croissance des végétaux (**Sturz et Christie, 2003**).

**I .2.4.2.Firmicutes:**

Ce sont des bactéries telluriques à Gram + et à Gram -, parmi ces bactéries il y a un type à Gram + plus abondants dans la rhizosphère avec un pourcentage de 95% est les *Bacillus* (**Probanza et al**) utilisées comme agent de lutte biologique et capable de produire des phytohormones et de solubiliser les minéraux (**Nagórska et al**).

**I .2.4.3. Actinorhizobacteria:**

Actinobacteries sont des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose (**Gray et Smith, 2005**).

**I.2.5 Modes d'actions des PGPR:**

Les PGPR agissent sur la croissance des plantes et le maintien de la santé des sols via deux types différents de modes d'action (**Glick, 1995**) :

- Un mode direct qui peut influencer directement la nutrition et le métabolisme de la plante en l'absence de pathogènes.
- Un mode indirect qui peut stimuler la fabrication des molécules l'extérieur de la plante en présence de pathogènes.

### **I.2.5.1 Mode direct:**

L'impact direct des PGPR sur la croissance des plantes par les mécanismes de bio fertilisation (nutrition de la plante par la fixation d'azote atmosphérique et solubilisation des phosphates...), et de bio stimulation c'est-à-dire la sécrétion ou plus précisément la production des hormones de croissances telles que l'IAA, les gibbérellines, les cytokinines, et ACC désaminase (**Glick et al, 1999**).

#### **I.2.5.1.1 La bio-fertilisation:**

##### ➤ **Fixation biologique de l'azote:**

Le diazote atmosphérique ( $N_2$ ) est la forme la plus abondante d'un élément indispensable pour la vie des végétaux ; lorsque il ya une diminution de l'azote ça conduit à une perte sur les rendements des cultures et ça contribue aussi à faire des pollutions dans l'environnement due au l'utilisation d'engrais chimiques chers ce qui augmente le cout de production. Alors qu'il est préférable d'utiliser des bio-engrais en alternatives des engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote (**Figueiredo et al, 2008**).

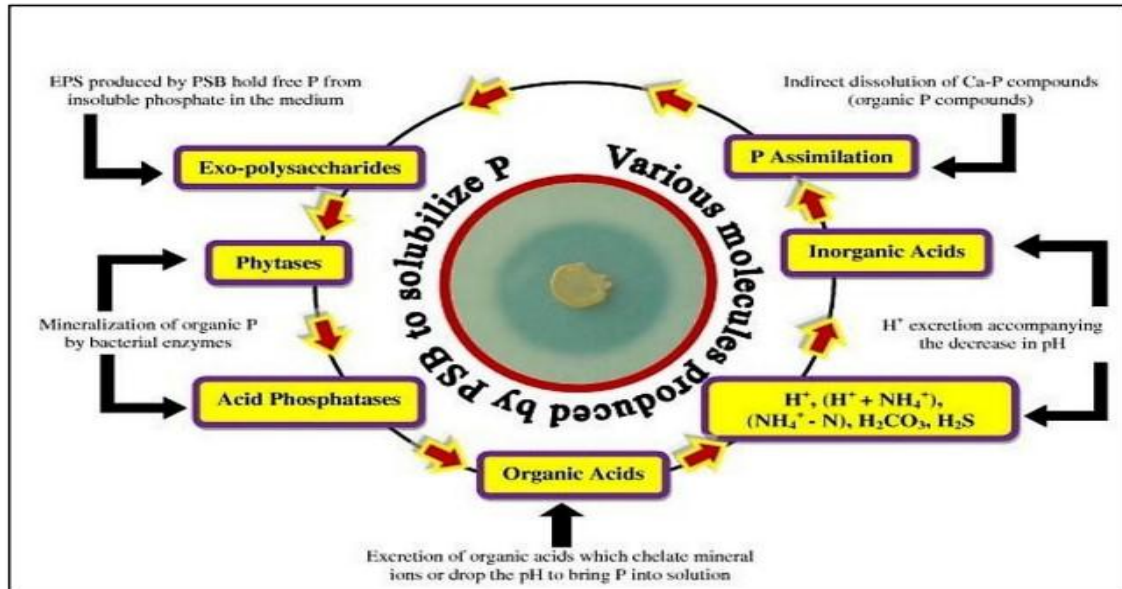
Le principe de fixation d'azote baser sur la fixation de cet élément par la symbiose PGPR/ plante ; car ces rhizobactéries à leurs tour fait une conversion de diazote en une forme assimilable par la plante est l'ammoniaque  $NH_4^+$  via l'enzyme nitrogénase réductase (**Delamotte, 2018**).

##### ➤ **Solubilisation du phosphate inorganique:**

En plus de l'azote, il existe un autre nutriment nécessaire, vital qui permet d'assurer la croissance et le développement des plantes est le phosphore (P), mais le problème c'est que ils n'existent pas une source biologiquement disponible d'une phosphore soluble même si dans les sols riches, puisque la plupart du phosphore est trouvé sous des formes insolubles (**Ezawa et al, 2008**).

Pour résoudre ce problème les chercheurs ont trouvent que la dissolution des phosphates liée à l'activité des bactéries qui colonisent la rhizosphère tels que les PGPR appelant les bactéries solubilisant le phosphate PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) ont la capacité de solubilisées le phosphore en convertissant les formes insolubles en formes solubles via des différents mécanismes (**Illmer and Schinner, 1995**).

Le mécanisme le plus utilisé est la production d'acides organiques telles que les acides glycolique, oxalique, malonique...qui diminuent le taux de pH de la rhizosphère qui conduit à une désagrégation des liaisons dans les sources des phosphores insolubles contenant dans les sols comme le  $Ca_3(PO_4)_2$  (**Afzal et Bano, 2009**).



**Figure03.** Mécanismes de la solubilisation du phosphate par les bactéries PSB (khan *et al*, 2009).

#### I.2.5.2 La bio-stimulation :

- La production des phytohormones ou hormones de croissances :

Les hormones de croissance, phytohormones ou les régulateurs de croissance sont des substances naturelles présentes dans les végétaux, ils font partie des métabolites secondaires qui produisent en faibles doses et qui coordonnent les événements de croissance des plantes.

Les PGPR produisent plusieurs types de phytohormones (Yang et Crowley, 2000).

#### - Auxines AIA (acide indole acétique) :

L'acide indole acétique (AIA) est un groupe important avec un fonctionnement d'un stimulateur de la croissance et le développement des plantes (Ryu et Patten, 2008).

Cette hormone produite par les PGPR sous forme de métabolite secondaire qui favorise la survie des rhizobactéries et le développement des plantes surtout dans le cas d'une application directe au niveau des racines (Narula *et al*, 2006). La production de l'AIA par les PGPR se fait à l'aide des exsudats racinaires (Spaepen *et al*, 2011).



- **production de l'éthylène et ACC (Aminocyclopropane-1-carboxylic acide) désaminase :**

L'ACC désaminase est une enzyme qui se trouve chez les micro-organismes du sol, et ne trouve pas dans les plantes sauf les plantes transgéniques.

L'implication de l'éthylène est l'un des mécanismes les plus importants qui a été suggéré pour la promotion de la croissance des plantes (**Burdman et al, 2000**).

L'éthylène est une hormone gazeuse produite par tous les végétaux, elle jouer un rôle très important dans la régulation des procédures physiologiques liées à la maturation et la sénescence des plantes y compris la différenciation des tissus. la formation des racines (**Frankenberger et Arshad, 1995**). Tandis que, l'éthylène a un effet négatif sur les étapes physiologiques des plantes ; lorsqu'elle augmente, la chlorophylle absorbée ce qui entraîne sa perte accompagner avec une dégradation puis une perte des ARN et protéines ce qui conduit à la perte de la pigmentation (**Oldroyd et al, 2001; VanLoon et al, 2006**).

Certaines souches PGPR possédant l'enzyme ACC désaminase qui pourrait cliver l'ACC. Son activité est aidée à la régulation de l'éthylène par la voie de la méthionine (**Danish et al, 2020**). Plus précisément l'ACC désaminase réduit le taux de l'éthylène en le séparant en acide alpha- cétobutrique et en ammoniac (**Hontzeas et al, 2004**).

- **Les cytokinine:**

Les cytokinines sont de type aminopurinesN6-substituées qui interagissent surtout dans le contrôle des processus physiologiques et de développement des plantes y compris le maintien et la régulation des divisions cellulaires la croissance racinaires (**Leibfried et al, 2005**).

- **Les gibbérellines:**

La production de cette phytohormone est très rare par les PGPR sauf il ya deux espèces *Bacillus pumilus* et *Bacillus licheniformis* qui peuvent être isolé à partir de la rhizosphère (**Chaitanya et Meenu, 2015**).

Cette capacité de production a été décrite initialement chez *A. brasilense* et rhizobium (**Tien et al, 1979 ; williams et Sicard de mallorca, 1982**). puis d'autres genres bactériens tels que *pseudomonas*, *Azobacter*, *Bacillus*... (**Mitter et al, 2002**).

### **I.2.5.2 Mode indirect:**

Les rhizobactéries sont capables d'influencer d'une manière bénéfique le développement et la croissance des plantes via :

#### **I.2.5.2.1 Le bio-contrôle:**

##### ➤ **La production des sidérophores:**

Le fer est un oligoélément très important pour les organismes vivants, il n'est pas bio-disponible avec des quantités suffisantes et il est toxique dans sa forme libre. Donc pour acquise du fer en situation de carence il existe une stratégie qui comprend la production des molécules à faible masse moléculaire entre (400 à 1500 dalton) appelées les sidérophores ayant élevée affinitée pour le fer ( $Fe^{3+}$ ) qui considérait comme une source de fer (**Kloepper *et al*, 1980**).

Les PGPR parmi les micro-organismes qui connues pour leur capacité à produire des sidérophores dans les milieux (**Kirdi et Zermane, 2010**).

##### ➤ **Production des antibiotiques:**

Les antibiotiques ce sont des facteurs nécessaires qui déterminent la vie des plantes dans la rhizosphère. Leurs production par les PGPR est un critère de performance pour le développement et la croissance des plantes (**Kirdi et Zermane, 2010**).

# *Matériel et Méthodes*

---

## **II. Matériel et Méthodes:**

### **II.1 Matériel biologique:**

Le matériel biologique sur lequel nous avons travaillé est constitué de 19 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*). Parmi les souches une souche *Pseudomonas aeruginosa* avec le numéro de référence ATCCO 9027<sup>TM</sup>. Elles font partie d'une collection de bactéries caractérisées pour leurs propriétés PGPR dans le cadre d'un projet de doctorat préparé au niveau du laboratoire Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) à ChaabatErsass, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Les différentes souches utilisées sont: A3, A11, A21, A25, A26, A34, A36, B1, B7, B12, B18, B21, B41, H1, H6, H10, H16, H25, H32, PS « R ».

### **II.2 Méthodes:**

#### **II.2.1 Préparation des cultures bactériennes:**

##### **II.2.1.1 Préparation des cultures bactériennes sur milieu solide:**

A partir des stocks bactériens conservés à -80 °C, une culture sur milieu gélose King B (**Annexe A**) a été préparé pour chaque souche étudiée.

L'ensemencement est réalisé dans des conditions stériles par la technique des stries par épuisement sur la pente de la boîte de pétri avec l'utilisation d'une anse de platine stérile. Cette méthode permet d'obtenir des colonies bactériennes séparées.

Les boîtes obtenues doivent se fermer et être incubées dans une étuve à 28°C pendant 48h.

##### **II.2.1.2 Préparation des cultures bactériennes sur milieu Liquide:**

Une colonie est prélevée à partir de la boîte pétri et puis ensemencé dans les tubes à essais contenant 5 ml du milieu King B sans agar.

#### **II.2.2 Coloration différentielle de Gram et caractérisation morphologique:**

##### **A. Coloration de Gram:**

La coloration de Gram est un test différentiel qui permet de faire la distinction entre deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par **Denis, 2007**(voir **Annexe C**).

**B. Caractérisation morphologique :**

➤ **Observation microscopique:**

L'observation des échantillons a été faite à l'aide d'un microscope optique à fort grossissement 100 (objectif à immersion), en présence d'une goutte d'huile de paraffine sur la lame du frottis préparés.

**II.2.3 Test de solubilisation du phosphate:**

C'est un test qui permet de faire une évaluation de la capacité des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère à solubiliser le phosphate. En effet Il y a des micro-organismes qui ne peuvent pas produire le halo de solubilisation du phosphate sur le milieu solide par contre peut solubiliser le phosphore en milieu liquide. Alors nous avons testées la solubilisation du phosphate minérale selon deux méthodes (milieu solide et liquide).

La méthode utilisée est celle décrite par (**Picovskaya, 1948**), Qui consiste à utiliser un milieu de culture contenant du phosphate tricalcique ou bien la roche phosphate qui sont des formes insolubles.

Dans notre travail nous avons utilisé de la roche phosphate issue du gisement de Djbel El Onk (TEBESSA, ALGERIE). La composition chimique de la roche phosphate utilisée est la suivante :

**Tableau 02 :** Composition chimique de phosphate de Djebel Onk (**Battou et Boualili, 2015**).

Composant chimique	Formule chimique
Pentoxyde de phosphore	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Oxyde de calcium	CaO
Oxyde de magnésium	MgO
Dioxyde de carbone	CO <sub>2</sub>
Fluore	F
L'eau	H <sub>2</sub> O
Trioxycde de soufre	SO <sub>3</sub>
Autres	Cd, Pb, Cu, Zn (ppm)



**Figure04.** La roche phosphate

### **II.2.3.1 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV Solide:**

La solubilisation du phosphate inorganique a été testé sur le milieu de culture Pikovskaya agar (PVK) contenant une seule source de phosphate est La roche phosphate pour développer une zone claire dans ce milieu (**Annexe B**) (**Pikovskaya, 1948**). Puis chaque bactérie est ensemencée en strie dans une boîte de pétri contenant ce milieu PVK agar.

Après préparation du milieu de culture, l'ensemencement a été effectué à l'aide d'une anse de platine en déposant l'inoculum au centre de la boîte de Pétri.

Les boîtes de Pétri ont été mise en culture à 28C° pendant 15jours.



**Figure05.** Boîtes de pétri des différentes souches bactériennes isolé de la rhizosphère de blé dur

#### **II.2.3.1.1 Mesure de zone de solubilisation:**

Pour la mesure de la surface du halo de solubilisation, nous avons utilisé le logiciel ImageJ qui est une application libre d'accès.

L'efficacité de solubilisation peut être calculée selon la formule ci-dessous (**Nguyen et al, 1992**).

$$\text{L'efficacité de la solubilisation \%} = (\text{surface du halo} / \text{surface de colonie}) \times 100$$

➤ **Image J:**

Imaj J est un logiciel a été développer pour analyser et étudier les images et les vidéos, afin d'effectuer des mesures physiques. Cet outil est fonctionne très bien sur la plateforme Windows (**Bico J *et al*, 2019**).

**II.2.4.2 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide:**

Pour chaque souche étudiée, 50 ml de milieu PKV liquide ont été préparés avec une concentration de 0,5 % en poudre de roche phosphate.

Les milieux de culture ont été ensemencés par 200 µl de culture bactérienne liquide fraiche. Puis les cultures ont été mises sous agitation à 28°C pendant 14 jours.

Après 14 jours de culture, le pH du milieu a été mesuré afin d'estimer le degré d'acidification.

Les mesures du taux de phosphate soluble dans le milieu ont été effectuées selon la méthode phosphomolybdate à l'aide d'un automate Cobas Pro<sup>(1)</sup>.



**Figure06.** Dispositif expérimentale pour l'étude de la solubilisation du phosphate sur milieu liquide

# *Résultats et discussion*

---

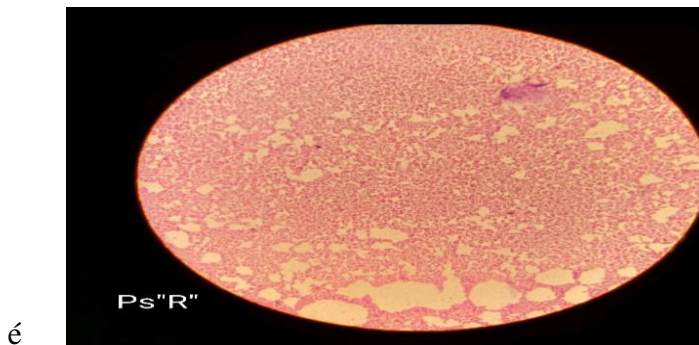


### III. Résultats et discussion:

#### III.1 Coloration du Gram et caractérisation morphologique:

##### A. Coloration de Gram:

L'observation microscopique des colonies bactériennes après la coloration de Gram à révélée que la majorité des souches étudiées sont des bâtonnets Gram négatif avec une couleur rose après la décoloration avec l'éthanol puis la recoloration avec la fuchsine, tandis que les bactéries Gram positif reste violette bien avec cette double coloration.



**Figure07.** Observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram (x1000).

##### B. Caractérisation morphologique:

**Tableau03.** Caractères morphologiques des espèces bactériennes isolées à partir de rhizosphère de blé dur (*Triticum durum*).

Isolats	Forme des colonies	Couleurs des colonies	Réaction de gram
A3	Bâtonnet long	Rose	-
A11	Bâtonnet court	Rose	-
A21	Bâtonnet court	Rose	-
A25	Bâtonnet court	Rose	-
A26	Bâtonnet court	Rose	-
A34	Bâtonnet long	Rose	-
A36	Bâtonnet court	Rose	-
B1	Bâtonnet court	Rose	-
B7	Bâtonnet court	Rose	-
B12	Bâtonnet court	Rose	-
B18	Bâtonnet court	Rose	-

B21	Bâtonnet court	Rose	-
B41	Bâtonnet court	Rose	-
H1	Bâtonnet court	Rose	-
H6	Bâtonnet court	Rose	-
H10	Bâtonnet court	Rose	-
H16	Bâtonnet court	Rose	-
H25	Bâtonnet long	Rose	-
H32	Bâtonnet long	Rose	-
PsR	Bâtonnet long	Rose	-

III.2 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV solide:

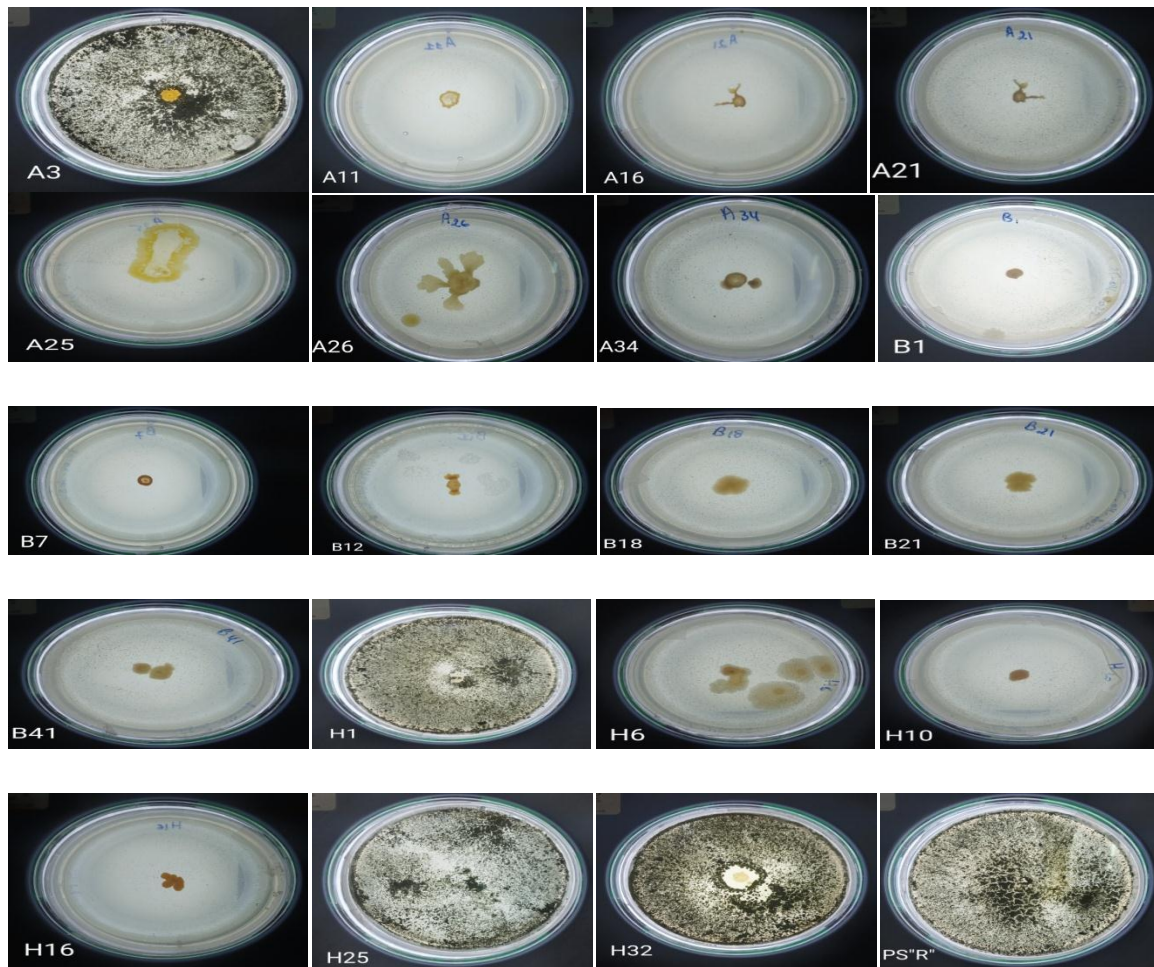


Figure08. Test qualitatif d'analyse de phosphate à solubilisé sur le milieu PKV solide

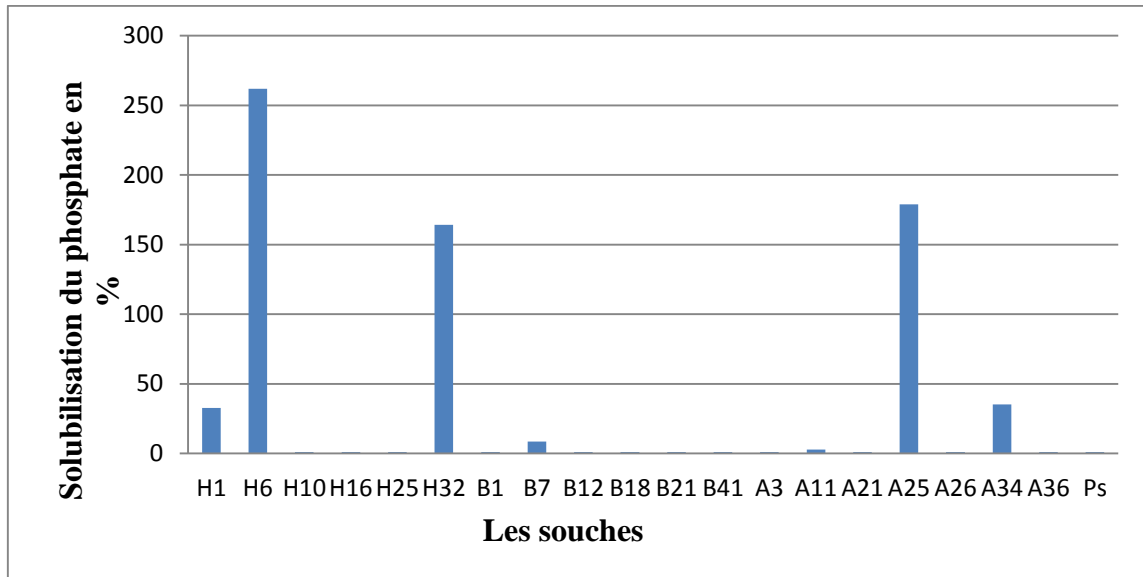
**III.2.1 Mesure de la zone de la solubilisation:**

➤ **Image J:**

Les résultats obtenus à partir logiciel Image J sont les suivantes :

**Tableau04.** Mesure de la surface des halos et des colonies bactériennes étudiées sur milieu PKV solide.

Les isolats	La surface de la colonie (mm)	La surface du halo (mm)
<b>A3</b>	5,979	5,979
<b>A11</b>	9,965	0,292
<b>A16</b>	1,993	1,993
<b>A21</b>	3,986	3,986
<b>A25</b>	3,986	3,522
<b>A26</b>	1,993	1,993
<b>A34</b>	1,993	1,993
<b>A36</b>	1,923	1,923
<b>B1</b>	1,993	1,993
<b>B7</b>	1,993	0,173
<b>B12</b>	4,982	4,982
<b>B18</b>	2,989	2,989
<b>B21</b>	3,189	3,189
<b>B41</b>	1,395	1,395
<b>H1</b>	1,993	0,650
<b>H6</b>	5,975	4,186
<b>H10</b>	1,993	1,993
<b>H16</b>	9,965	9,965
<b>H25</b>	1,993	1,933
<b>H32</b>	1,993	2,969
<b>PS « R »</b>	1,923	1,923



**Figure09.** L’efficacité de solubilisation du phosphate sur milieu PKV solide

Un test qualitatif s’est sur un ensemble de 20 souches bactériennes qui ont été capable à solubiliser la roche phosphate sur milieu PKV solide.

L’estimation de l’efficacité de la solubilisation du phosphate par les bactéries est basée sur la mesure de la surface du halo de solubilisation (**Meek et al, 2001**).

La solubilisation du phosphate minérale par les bactéries en culture solide provoque une acidification du milieu, qui se traduit par la formation d’une zone claire autour de la colonie. Ces zones claires appelées des halos qui sont due à la production des acides organiques dans le milieu (**Figure09**) (**Asea et al, 1988 ; Halvorson et al, 1990**).

Les résultats obtenus montrent que la capacité de solubiliser le phosphate minérale chez les souches étudiées varie entre 1% et 261,80%. La meilleure performance est observée chez la souche H6 (261,81%). Les résultats montrent aussi que les souches A25 et H32 ont une bonne capacité à solubiliser le phosphate 178,85 % et 164,11% respectivement.

D’autre part, on a observées une faible efficacité de 1% chez les souches A3, A21, A26, A36, B1, B12, B18, B41, H10, H16, H25, Ps « R ».

### III.3 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide :

#### A. Acidification du milieu :

Les résultats détaillés obtenus pour les différentes souches étudiées sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 05.**Taux de pH initiales et de pH après la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide.

Les isolats	pH initiale	Ph après la solubilisation
<b>A3</b>	7,2	7,2
<b>A11</b>	7,2	4,60
<b>A21</b>	7,2	4,53
<b>A25</b>	7,2	6,10
<b>A26</b>	7,2	8,61
<b>A34</b>	7,2	4,81
<b>A36</b>	7,2	7,42
<b>B1</b>	7,2	7,00
<b>B7</b>	7,2	5,76
<b>B12</b>	7,2	5,10
<b>B18</b>	7,2	7,2
<b>B21</b>	7,2	6,86
<b>B41</b>	7,2	8,71
<b>H1</b>	7,2	6,74
<b>H6</b>	7,2	6,84
<b>H10</b>	7,2	9,10
<b>H16</b>	7,2	4,77
<b>H25</b>	7,2	7,17
<b>H32</b>	7,2	6,45
<b>PsR</b>	7,2	6,17
<b>T1</b>	7,2	7,2
<b>T2</b>	7,2	7,2

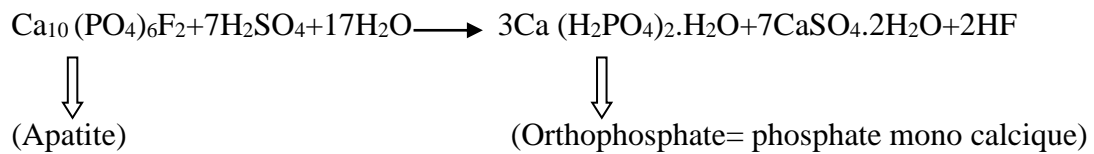
L'acidification du milieu est un phénomène qui accompagne la dégradation du phosphate par les bactéries.

La variation du pH dans la rhizosphère à une relation avec la disponibilité des formes inorganiques du phosphate qui est présenté sous forme des apatites.

L'acidification est un indicateur sur la capacité à solubiliser le phosphate minérale, car si il ya une acidification la solubilisation augmente et l'apatite se transforme en orthophosphate (**Hinsinger, 2001**).

En effet, les microorganismes au niveau des racines des plantes produisent des acides organiques et relâchent des protons quia ont à leurs tour convertir le phosphate insoluble en soluble sous forme orthophosphate Pi ( $H_2PO_4$ ou  $HPO_4$ ) qui sont les formes absorbant par les plantes (**Mackey et paytan, 2009**).

Phosphate résultant de l'acidification de la roche phosphatée (réaction)(**Pereira.,2003**).



Après 14 jours d'incubation, la mesure de pH dans les différentes cultures bactériennes étudiée à montré que ce paramètre varie d'une souche à l'autre, ainsi que les valeurs enregistrées varient entre 9,10 et 4,53.

L'acidification la plus importante a été observée chez A11, A21, A34 et H16.

Les souches B12, B7, A25, Ps, H32, H1, H6, B21 ont présentées des valeurs de 5,10 ; 5,76 ; 6,10 ; 6,17 ; 6,45 ; 6,76 ; 6,84 ; 6,86. respectivement.

Chez les souches A36, H25, A3, B18 le taux de pH reste neutre c'est-à-dire il n'y a aucune acidification.

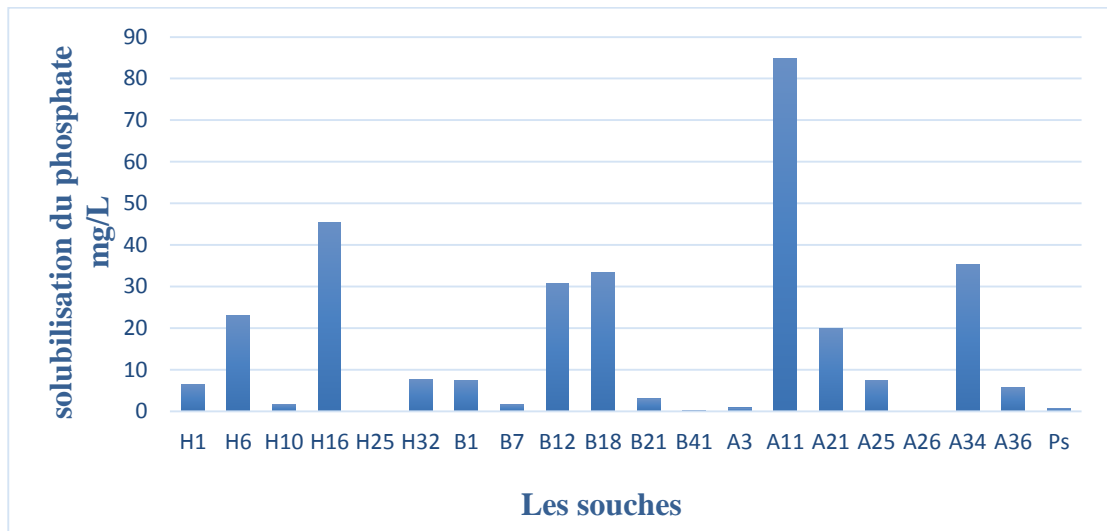
Les souches A26, B41, H10 présente une acidification nulle.

Ces résultats montrent que les souches A11, A21, A34 et H16 semblent avoir un bon pouvoir de solubilisation du phosphate.

Cette supposition sera vérifiée par le test suivant qui est le dosage du phosphate soluble dans le milieu.

**B. Solubilisation du phosphate:**

Les résultats obtenus sont les suivantes :



**Figure10.** Solubilisation de la roche phosphate par les souches étudiées sur milieu PKV liquide

Le test quantitatif permet de tester le pouvoir de différents isolats bactériens étudiés à solubiliser le phosphore soluble dans le milieu pikovskaya liquide.

Les résultats présentés dans l’histogramme (**Figure 10**) ci-dessus, montrent que la solubilisation du phosphate est très variable d’une souche à une autre. La quantité du phosphore à solubiliser varie entre 0,006mg/L et 48,9mg/L.

Les souches A11 et H16 présentent un bon pouvoir de solubilisation de la roche phosphate 48,9 mg/L et 45,3mg/L.

Les souches H25, B41, A26, H10, A3, Ps présentent la plus faible solubilisation avec les valeurs suivantes 0,006, 0,31, 0,042, 1,76, 0,82 et 0,76 respectivement.

Selon (**Nahas.,1996**) la solubilisation du phosphate insoluble dépend de plusieurs Facteurs nécessaires, y compris le pH comme un facteur essentiel dans la solubilisation du phosphate c'est-à-dire une diminution du pH sera accompagnées par l’augmentation du taux de solubilisation. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de **Whitelaw, (2000) ; Jeon et al , (2003) ; Maliha et al, (2004) et Chen et al, (2005) ; Joseph et Jisha, (2008) ; Illmer et al,(1992) .**



# *Conclusion et perspectives*

---

## **Conclusion et perspectives:**

La présente étude a porté sur le rôle des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), qui sont phytobénifiques ; en utilisant les exsudats racinaires comme des substrats nutritifs pour agir sur l'amélioration et la stimulation de la croissance et le développement des plantes.

Durant ce travail, nous avons testé la capacité de vingt souches bactériennes déjà isolées à partir de la rhizosphère du blé dur, à solubiliser le phosphate inorganique contenu dans la roche phosphate. Qui montrent que le pouvoir de solubilisation varie d'une souche à un autre.

L'étude morphologique des souches utilisées montrent que elles appartiennent toutes au groupe taxonomique des Gracilicutes (bactérie à Gram négative -), et qui présentée une morphologie qui varient entre le bâtonnet court à long.

Le premier test réalisé est un test qualitatif qui nous a permis d'avoir une estimation globale sur ce caractère chez les différentes souches étudiées.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué un test quantitative sur milieu PKV liquide.

Les résultats obtenus montrent que les souches A11, A25, A34, H6, H16, H32, ont un bon pouvoir de solubilisation du phosphate inorganique. Alors que ces souches sont très intéressantes et peuvent être utilisées en agricultures et en biotechnologie surtout dans les processus d'amélioration des plantes. Et que cette étude pourra être complétée par :

- Identification plus performantes de ces souches (16 s)bactériens
- Réaliser des testes sur le blé dur.

*Références*  
*Bibliographiques*

---

**Références bibliographiques:**

- **Alexander DB. Zuberer D a., (1991).** Us of chrome azurol S reagents to evaluate siderophoreproduction by rhizosphere bacteria.Biology and Fertility of Soils 12: 39-45.
- **Anonyme., (2000).**Etude de l'apparition variétale des céréales cultivées en Algérie.Céréaliculture n° 31.pp 17-22.
- **Asea, P.E.A., Kucey, R.M.N., et Stewart, J.W.B. (1988).**Inorganic phosphate solubilization by two Penicillium species in solution culture and soil. Soil Biol. Biochem, 20:459-464.
- **Bais,H.P.,T.L.Weir,L.G.Perry,S.Gilroy,etJ.M.Vivanco., (2006).**The role of roo exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms .Ann.Rev.Plant Biol.,57:233-266.
- **Baldent., (1997).** Coloration usuelles en Bactériologie. Revue de Développement et Santé. Février(1997). [www.ledamed.org](http://www.ledamed.org).
- **Balergue, C.,(2012).** Régulation de la symbiose endomycorhizienne parle phosphate. Biologie végétale. Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2012.Plant Signaling&Behavior6(6) :838p.
- **Beaudoin S., (2021).**blé dur huit variétés. Références Agro Innovations.
- **Bonjean A., Picard E.,(1990).** Les céréales à paille origine, historique, économie et sélection. Eds Nathan, 235p.
- **Burdman, S., E. Jurkevitchet Y. Okon (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.
- **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
- **Cheikh-Rouhou, M. (2006).** Evaluation des classifications phylogénétiques des bacillaceae basées sur les gènes de l'opéron RRN et de gènes de ménage, Mémoire de la maîtrise en biologie université du Québec à Montréal. 114p
- **Chikhi A .C.,(1992).** Situation de la céréaliculture et perspectives de l'irrigation de complément du blé au niveau de la Matidja. Thèse Ing. INA. EL Harrach.317p.

- **Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A., 2005.** Endophytic colonization of *Vitisvinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderiasp.* Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*.
- **Denis F., M-C Poly., C Martin., E Bingen., Roquentin., (2007).** *Bactériologie médicale, techniques usuelles.* MASSON, Cedex. P333-335.
- **Elhaissofi W., Ghulam C., Barakat A. Zeroual Y. Bargaz A., (2021).** Phosphate bacterial solubilization : A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity, *Journal of Advanced Research*.
- **Erroux J., (1961).** Introduction au catalogue de blé dur cultivé en Algérie. 35p.
- **Franken Berger, W.T., Jr. M. Arshad., (1991).** Microbial production of plant growth regulating substances in soil. Pages 162-171 in C. Keel, B. Kolleret G. Défago (réds.), *Plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects.* IOBC/WPRS Bull. XIV/8.
- **Glick.B.R, D.M. Penrose et L. Jiping., (1998).** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68.
- **Glick BR., (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*; 41:109–17.
- **Gracia Lucas J.A, Schloter, M, Durkaya, T, Hartmann A Gutierrez Maero F.J., (2003).** Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol Fertil Soils* 37(6):381-385.
- **Greenway E et Munnus R. 1980.** Mechanism of salt tolerance in non-halophytes *Annu. Rev. Plant Physiol* 31:149-190.
- **Halvorson H.O., Keynan, A., Kornberg, H.L., (1990).** Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol. Biochem*, 22:887-890.
- **Hiltner L., (1904).** Über neuere Erfahrungen und problem auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arb DLG* 98, 59–78.
- **Hinsinger L., (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 272, 173-195.
- **Illmer, P., Schinner, F., (1992).** Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem*, 24:389–395.

- **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..
- **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: 110–112.
- **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). 48–58.
- **Kirdi, B., Zermane, N., (2010).** Rôle des PGPR dans la stimulation de la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites: *Orobanchecrenata* Forsk. et *Cuscutacampestris* Yuncker / “Role of PGPR in plant growth promotion and control of the parasitic weeds: *Orobanchecrenata* Forsk. and *Cuscutacampestris* Yuncker”. *Fusarium wilt of cucumbers. N. Biol. Fertil. Soils*, 47:239–248.
- **Kloepper J.W and M.N Schrot., (1978).** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71: 642-644.
- **Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth, M.N., (1980).** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- **Kloepper JW, A. Gutierrez-Estrada et A. McInroy., (2007).** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.*53:159–167.
- **Kloepper, J.W., (1992).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pages 255-274 in B. Metting (éd.), *Soil microbial technologies*. Marcel Dekker, New York.
- **Kloepper, J.W., R. Rodríguez-Kàbana, J.A. McInroy et R.W. Young., (1992).** Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant Soil* 139: 75-84.
- **Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S.A., (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1266.
- **Mackey R M, Payten A., (2009).** Phosphorus cycle. *Elsevier INC*, 232.
- **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: 187–196.

- **Malek F .,(2015).**interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualité et du développement microbien. Université de Tlemcen.
- **Meek,B.D., Graham, L.E., Donova, T.J., Mayberry, K.S., (2001).** Phosphorus availability in calcareous soil after high loading rates of animal manure. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 43: 741-744.
- **Mitter, N., AC. Srivastava, AS.Renu, AK. Sarbhoyet DK. Agarwal., (2002).** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187–193.
- **Moulin L.,MuniveA.,Dreyfus B., Boivin-Masson.C., (2001).** Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Proteobacteria.*Nature*, 411(6840),948-950.
- **Nahas, E. (1996).** Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. *World J. Microb. Biotechnol*,12:18-23.
- **Narula, N., A. Deubel, W. Gans, RK.Behlet W. Merbach., (2006).** Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ.*, 52: 119–129.
- **Oldroyd, GE., EM. Engstrom, SR. Long., (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell*.13:1835–1849.
- **Pereira F.,(2003).**Production d'acide phosphorique par attaque chlorhydrique de mineraux phosphatés avec réduction des nuisances environnementales et récupération des terres rares en tant que sous-produits . thèse de doctorat, écoles Nationale Supérieure des mines de Saint-Etienne.
- **Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17: 362-370.
- **Riley R.,Chapman V.,(1958).**Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature*, 182, 713-715.
- **Ryu R et C.L.Patten., (2008).**Aromatic amino acid –dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5.*Am.Soc Microbiol.*,19:1-35.

- **Sawada, H., Kuykendall, L. D.; Young, J. M., (2003).** Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen –fixing legume symbionts. *The journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.
- **Spaepen S et Vander Leyden J (2011).** Auxin and plant microbe interactions Cold Spring Harbor perspectives in biology, vol.3,no.4.
- **Stengel, P., Gelin, S., (1998).** Sol : interface fragile, Inra. ed.
- **Sturz A.V ., Christie .B .R., (2003).** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research*, 72(2),107-123.
- **Suslow, T.V., (1982).** Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Pages 187-222 in M.S. Mount et G.H. Lacy. (réds.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Vol. 1. Académie Press, New York.
- **Tien, T.M, M.S. Gaskin, D.H. Hubbel., (1979).** Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Micro.*, 37(5): 1016-1024.
- **-Van Loon, LC., PBJ. Greatest HJM. Linthorst (2006).** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11:184–190
- **Whitelaw, M.A., (2000).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate Solubilizing fungi. *Adv. Agron*, 69:99-151.
- **Weller, D.M(1988).** Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
- **Williams, PM., M. Sicardi de Mallorca., (1982).** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max.* *Plant Soil* 65: 19-26.
- **Yang, X., Chen, L., Yong, X., Shen, Q. (2011).** Formulations can affect rhizosphere Colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against.
- **Yu, L.-Y., Huang, H.-B., Wang, X.-H., Li, S., Feng, N.-X., Zhao, H.-M., Mo, C.-H. 2019.** Novel phosphate-solubilizing bacteria isolated from sewage sludge and the mechanism of phosphate solubilisation. *Science of the Total Environment*, 658, 474–484.
- **Yves, H et Buyer J.,(2000),** l'origines des blés. *Pour les sciences hors-série* n°26,60-62p.
- **Zinnouhi O., El mderssa M ,ct Ibijbijen J et Nassiri L .,** Caractérisation génotypique de bactéries solubilisant le phosphate isolées de nodules racinaires



d'Adenocarpusboudyi(Maire), endémique du Moyen Atlas central Marocain .Journal of Applied Biosciences. Février (2018). [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org)

# *Annexes*

---

**Annexe A .Milieu Gélose King B (King et al., 1954)****Avec pH  $7.2 \pm 0.2$  à 25°C**

L'élément	Quantité
Peptone	20g
Glycérol	10,0 ml
Phosphate dipotassique $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5g
Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4$	1,5g
Agar	12g
Eau distillée	1000ml

**Annexe B. Milieu Pikovskaya Agar (compositions par litre) (Yu et al., 2019)**Avec pH  $7.2 \pm 0.2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ 

L'élément	Quantité
Extrait de levure	0,50g
Glucose	10g
La roche phosphate	5g
Sulfate d'ammonium	0,20g
Chloride de potassium	0,10g
Sulfate de magnésium ou manganèse	0,002g
Sulfate de fer	0,002g
Agar	15g

**Annexe C. Coloration du Gram (Baldent., 1997).**

- ✓ Coloration par violet de Gentiane par recouvrir totalement la lame.
- ✓ Laisser agir pendant 1minute.
- ✓ Le mordantage par l'ajout de la solution de Lugol sur lame pendant 1 minute après l'élimination du violet de Gentiane.
- ✓ Décoloration à l'alcool tenu verticalement sur le frottis jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté.
- ✓ Rincer aussi tôt à l'eau.
- ✓ Recoloration par la fuchsine : verser quelques gouttes de fuchsine à chaque extrémité du frottis pour éviter les risques de dépôts de coloration trop intense.
- ✓ Laisser agir pendant 1min.
- ✓ Rinçage avec l'eau et puis séchage avec deux feuilles ou à la chaleur de bec bensen.

Les bactéries à Gram négatif perdent leur coloration après le rinçage avec l'éthanol et prennent la couleur rose après la coloration avec la fuchsine à cause de leur couche mince de peptidoglycane. Tandis que les bactéries à Gram positif restent violettes même après la coloration avec la fuchsine à cause de leur peptidoglycane épais qui empêche la pénétration de l'alcool.

**Année universitaire : 2021-2022**

**Présenté par : BORNI Thamina**

**HADJOUR Maroua**

**Intitulé : Etude de la solubilisation du phosphate par des bactéries isolé de la rhizosphère du blé dur**

Les bactéries promotrice de la croissance des plantes PGPR (Plant GrowthPromotingRhizobacteria), jouent un rôle très important pour la nutrition des plantes. Parmi ces rôles la solubilisation des minéraux présents dans les sols.

Dans le présent travail nous avons faire une étude sur 20 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé dur pour leurs capacité à solubiliser le phosphate minérale, dont la seule source est la roche phosphate.

Les résultats montrent que les souches étudiées ont la capacité de solubiliser le phosphate et que cette efficacité est plus élevée chez l'isolat A11, A25, A34, H6, H16, H32, et que elle est faible chez les souches A3, A26, B41, H10, H25, Ps « R ».

**Mots clefs :** PGPR, Blé dur, solubilisation du phosphate

**Mots –clefs :** PGPR, Rhizobactéries, PKV, roche phosphate

**Laboratoires de recherche :**

**Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) à ChaabatErsass, (Université Frères Mentouri Constantine 1)**

**Encadreur : TEMAGOULT Mahmoud (MAA Université frères mentouri.Constantine1)**

**Examineur 1 : LOUALI Y (MCBUniversité frères mentouri.Constantine1)**

**Examineur 2 : BOUCHEMAL K (MCBUniversité frères mentouri.Constantine1)**