

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale
Filière Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biologie et Génomique Végétales

Thème

Comparaison de quatre milieux pour la culture de bactéries minéralisant le phytate

Présenté par

M^{elle} DJEGHAR Hadjer

M^{elle} DJEGHAR Ihsene

Soutenu le : 22 juin 2014

Devant le jury d'évaluation :

Président : Pr. DJEKOUN Abdelhamid

Pr. Université Constantine1

Encadreur : Mme. MAOUGAL Rym.T

MAA INATAA Université Constantine1

Membre : Mr. TEMAGOULT Mahmoud

MAA Université Constantine1

Année universitaire 2013-2014

Abréviation

Al	Aluminium
Ca	Calcium
Fe	Fer
g	Gramme
LB	Milieu Luria Bertani
N	Azote
Na-insP6	<i>myo</i> -inositol hexakisphosphate
NBRIP	National Botanical Research Institute's phosphate
P	Phosphore
Pi	Phosphore inorganique
Po	Phosphore organique
PSB	Phosphate solubilizing Bactéria
PSM	Phosphate solubilizing microorganisms
TCP	Calcium Triphosphate
YMA	Milieu Yeast Mannitol Agar

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié du cycle du phosphore montrant les sources disponibles pour la plante	5
Figure 2 : l'eutrophisation des eaux de surface	6
Figure 3 : Réaction catalysée par la phytase	8
Figure 4 : Imagerie microscopique de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i>	10
Figure 5 : Imagerie microscopique de la bactérie <i>Pseudomonas</i>	11
Figure 6 : Résultats de l'inoculation des bactéries dans les quatre milieux sélectifs après une période de croissance de 5 à 7 jours à 28°C	24

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition du milieu LB (Luria Bertani)	16
Tableau 2 : composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)	16
Tableau 3 : composition du milieu king B	16
Tableau 4 : composition du milieu PVK agar après modification	17
Tableau 5 : composition de la première couche du milieu Angle	18
Tableau 6 : composition de la deuxième couche du milieu Angle	18
Tableau 7 : composition du milieu NBRIP après modification	19
Tableau 8 : composition du milieu Hill	19
Tableau 9 : représentation de la croissance bactérienne et de l'activité de la minéralisation du phytate dans les quatre milieux sélectifs	22

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I. Le phosphore du sol	4
I.1. Le phosphore et son importance pour la plante	4
I.2. Le cycle du phosphore	4
I.3. Différentes forme du phosphore dans le sol	6
I.3.1. La forme inorganique (minérale)	6
I.3.2. La forme organique	6
I.4. Le phytate	7
I.5. Le phosphore dans le sol	7
I.5.1. Les phosphatases bactériennes	7
I.5.2. Les phosphatases fongiques	7
I.5.3. Les phosphatases racinaires	8
I.6. Les phytases	8
II. Les bactéries minéralisatrices du phosphore organique	9
II.1. La minéralisation du phosphore organique	9
II.2. Les bactéries minéralisatrices du phsphore organique (PSB)	9
II.2.1. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i>	9
II.2.2. Les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	10

III. Les milieux sélectifs des bactéries minéralisatrices du phosphore organique	12
Chapitre2 : Matériel et méthodes	
I. Lieux et durée de l'étude	15
II. Objectif	15
III. Les souches bactériennes	15
III.1. <i>Bacillus subtilis</i>	15
III.2. <i>Pseudomonas</i> sp	15
III.3. <i>Rhizobium TL19</i>	15
IV. Méthodes de travail	16
IV.1. Préparation des milieux	16
IV.1.1. Les milieux d'enrichissement	16
IV.1.2. Les milieux sélectifs	17
IV.2. Inoculation des bactéries dans les milieux d'enrichissement	19
IV.3. Repiquage sur les milieux sélectifs	20
Chapitre 3 : Résultats et discussion	
I. Résultats	22
II. Discussion	25
Conclusion et perspectives	28
Références bibliographiques	30

Remerciement

En premier lieu toute notre gratitude s'adresse à notre bon DIEU tout puissant, pour nous avoir donné la force pour en arriver là.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à Mme Mougala .R.T MAA INATAA Université Constantine 1 pour avoir encadré ce travail.

Nous remercions Mr Djekoune .A, Pr. Université Constantine 1 pour avoir accepté de présider notre jury.

Nous remercions également Mr Tamagoult .M MAA Université Constantine 1 pour avoir examiné notre travail.

Sans oublier de remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de recherche de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétales (GBBV), à Chaabet El Rssas. Université Constantine 1 pour nous avoir accueillis au sein du laboratoire et permis de réaliser ce travail. Et spécialement Mr Belbekri .N ingénieur du laboratoire et Melle Bouldjedj .R pour leur soutien moral et technique.

Je dédie se travail à

Mes très chers parents

Mes sœur Adla, Asma radhia et Nibel

Ma nièce Rym el fala

Ma cousine Hadjer

Et à tous ceux qui étaient présents pour moi

Ihsene

Je dédie se travail à

Mes très chers parents

Mes frères Mohamed zakaria et Alaa eddine

Ma sœur Sara

Ma cousine Ihsene

Et à tous ceux qui étaient présents pour moi

Hadjer

Introduction générale

Introduction générale :

La nutrition végétale est l'ensemble des processus qui permettent aux végétaux d'absorber dans le milieu ambiant et d'utiliser les éléments nutritifs nécessaires à leurs différentes fonctions physiologiques : croissance, développement, reproduction...

Le phosphore est un élément nécessaire à la croissance des plantes, il agit sur le développement des racines en activant leur démarrage, c'est un facteur de précocité et de fructification. La carence en phosphore se traduit par une réduction du développement des racines avec peu de ramification (Bennai et benabbas, 2007).

Le phosphore est généralement peu mobile dans les sols et peu disponible aux plantes. Ainsi, de grandes quantités d'engrais-P sont appliquées aux sols agricoles causant son accumulation sous formes minérales et organiques (Richardson, 1994).

Dans le sol, le phytate (myo-inositol-hexakisphosphate) est l'un des principaux composés organiques du phosphore. Sa minéralisation est susceptible de fournir une source de phosphore disponible pour les plantes et les micro-organismes. L'hydrolyse du phytate dans le sol est effectuée à l'aide des phytases principalement d'origine microbienne. Certains genres bactériens, tels que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Burkholderia* sont déjà connus pour être d'efficaces producteurs de phytase (Jossi, 2008).

Les bactéries sont les organismes vivant dans le sol les plus diversifiés et les plus abondants (Killham, 1994). Les activités métaboliques accomplies dans le sol par les bactéries sont impliquées dans de nombreux cycles biogéochimiques (grands processus de transformation de la matière) des principaux éléments nutritifs des plantes et des matières organiques (Attiwill et Adams, 1993 ; Falkowski *et al.*, 2008 ; Matsumoto *et al.*, 2005).

Les bactéries jouent donc un rôle écologique essentiel dans la fertilité, la formation et la régénération des sols, la santé et la productivité des plantes (Dey *et al.* 2004 ; Bashan *et al.*, 2004). Grâce à leur présence dans la rhizosphère des plantes, elles sont capables de réduire ou d'augmenter la libération, le transfert et l'absorption de nutriments et de métaux, jouant ainsi un rôle-clef dans la protection et la croissance de certains végétaux (Vessey, 2003). Elles participent également aux cycles du phosphore dans les sols et à la minéralisation de nombreuses molécules organiques (Kalbitz *et al.*, 2000).

Pour mieux comprendre la relation entre les microorganismes et la disponibilité du phosphore pour la plante, les chercheurs ont établie plusieurs milieux sélectifs; mais l'utilisation de ces milieux dans de différentes études ne facilite pas la généralisation des résultats de recherche.

L'objectif de notre travail a été de réaliser une étude comparative entre les milieux sélectifs, spécifiques aux bactéries minéralisatrices du phytate, les plus utilisés, et de définir le milieu le plus convaincant. Pour cela nous avons effectué une mise en culture de bactéries dans ces milieux, nous avons choisi les bactéries du genre *bacillus* et *pseudomonas* pour leur capacité à minéraliser le phytate et la bactérie du genre *rhizobium* comme témoin négatif par ce qu'elle est dépourvue de cette spécificité de minéralisation.

La réalisation de nos expérimentations a été au sein du laboratoire de biotechnologie et Amélioration des plantes du laboratoire de recherche de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétales (GBBV), à Chaabet El Rssas. Université Constantine 1.

Notre mémoire est présenté en trois chapitres

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique sur le phosphore dans le sol et son importance pour la plante, le phytate, les phytases, les bactéries contribuant à la solubilisation du phosphore et les milieux sélectifs spécifiques à celle-ci.

Dans le deuxième chapitre nous verrons les souches bactériennes et les milieux sélectifs utilisés ainsi que les méthodes suivies pour la réalisation de notre étude.

Le troisième chapitre représente les résultats de nos expérimentations et leur discussion.

Nous terminons notre rédaction par une conclusion et perspectives, suivies de la liste des références bibliographiques.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Revues bibliographiques

I. Le phosphore du sol

I.1. Le phosphore et son importance pour la plante

Le phosphore est un élément qui est largement distribué dans la nature (FAO, 2004). Il est considéré, avec l'azote et le potassium, comme un constituant fondamental de la vie des plantes, mais il reste le moins disponible pour la plante du fait de sa réactivité élevée avec de nombreux constituants du sol (Lagrange, 2009). Dans les sols acides, le phosphore est susceptible de réagir avec les hydroxydes de fer ou d'aluminium pour former des composés relativement insolubles (Dalton *et al.*, 1952).

Le phosphore entre dans une série de fonctions du métabolisme végétal de la plante. Il a des fonctions à caractère structural dans des macromolécules telles que les acides nucléiques et des fonctions de transfert d'énergie dans des voies métaboliques de biosynthèse et de dégradation, et il agit sur le développement des racines en activant son démarrage, c'est également un facteur de précocité et de fructification (Bennai et Benabbas, 2007).

Dans les sols agricoles, il est essentiellement présent sous forme d'anions orthophosphates (Bertrand et Gigou, 2000). Les symptômes de carences du phosphate apparaissent d'abord sur les feuilles âgées (Etchebest, 2000 ; Plenet *et al.*, 2000), soit du nombre de ramifications chez les plantes comme les graminées (Rodriguez *et al.*, 1998)

I.2. Cycle du phosphore

Dans la nature, le phosphore existe sous forme de phosphate plutôt que sous sa forme élémentaire. Dans la solution du sol, les deux principales formes d'ions phosphatés sont le H_2PO_4^- (conditions acides) et le HPO_4^{2-} (conditions alcalines) (Busman *et al.*, 2002).

Ces ions subissent des transformations comme l'adsorption, la minéralisation, la précipitation, l'altération et la réorganisation microbienne. Ainsi, le cycle du P comprend le processus de prélèvement du P par la plante, les transformations des formes organiques du P et les réactions chimiques de fixation et d'immobilisation dans le sol. Le P est un élément peu mobile dans le sol (Barber, 1995., Holford, 1997). Certaines formes de P dans le sol sont insolubles ou ont une solubilité modérée.

L'approvisionnement du phosphore en solution est sous l'influence de deux sous-cycles (figure 1) : un cycle biologique dans lequel les groupements de P sont des formes organiques dont les transferts sont assistés par des réactions biologiques et un cycle géochimique dans lequel les groupements de P sont des composés chimiques et minéralogiques dont les

transferts sont dirigés par des mécanismes abiotiques. Le P du cycle géochimique provient majoritairement de l'altération des roches mères (Larsen, 1967).

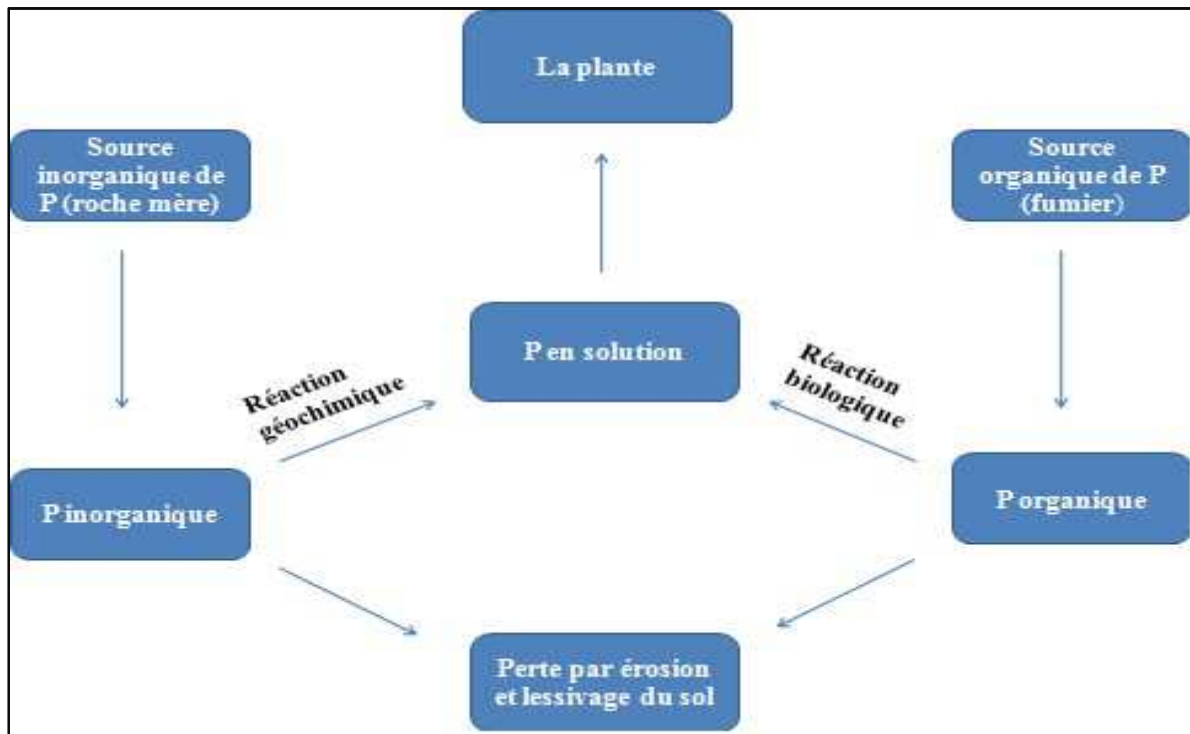


Figure 1 : Schéma simplifié du cycle du phosphore montrant les sources disponibles pour la plante (adapté de Stewart, 1980)

Le P n'a pas d'effets toxiques directs sur les humains ou les animaux (Pierzynski *et al.*, 2000), mais il peut causer l'eutrophisation des eaux de surface (figure 2). L'eutrophisation se définit par une croissance accélérée des algues ou des plantes aquatiques. Les effets négatifs associés à ce phénomène sont importants d'un point de vue écologique, économique et sanitaire : dégradation de l'habitat (réduction de la teneur en oxygène dissous), réduction de la biodiversité, diminution de la valeur économique et des usages récréatifs (Pierzynski *et al.*, 2000).



Figure 2 : Eutrophisation des eaux de surface (Johann, 2004)

I.3. Différentes forme du phosphore dans le sol

Seule une petite partie du P du sol est directement ou rapidement disponible pour les plantes. Elle est constituée par du P soluble, du Po facilement minéralisable et du P inorganique faiblement adsorbé sur les colloïdes argileux (Stevenson, 1986).

I.3.1. La forme inorganique (minérale)

Le phosphore inorganique (Pi) est présent surtout à l'état oxydé, principalement sous forme de complexes avec Ca, Fe, Al et avec les minéraux silicatés. En sol organique, il est essentiellement fixé sur Al et Fe (Kaila, 1959). Les formes de l'ion phosphate varient avec le pH. Pour des pH de 5 à 8, les formes H_3PO_4 et PO_4 sont négligeables et laissent place à l'équilibre chimique entre H_2PO_4 et HPO_4 . A pH 6, 90% des phosphates sont sous forme H_2PO_4 , contre 60% à pH 7 (Stevenson, 1986). Seule une petite partie du P du sol est directement ou rapidement disponible pour les plantes.

I.3.2. La forme organique

Le phosphore organique (Po) est défini par l'ensemble des composés qui englobent un ou plusieurs groupement phosphate et qui sont produits par le métabolisme des êtres vivants, il est essentiellement présent sous forme de phosphate d'inositol (phytate), et secondairement sous forme de sucres, acides nucléiques, et phospholipides (Mengel et Kirby, 1987), ils constituent des réserves phosphorées (Frossard *et al.*, 1995) provenant en majorité des plantes et stockées dans les graines.

Les formes de Po les plus courantes dans les conditions naturelles sont les esters d'acide orthophosphorique (mono- et diesters-P). Les monoesters P sont essentiellement constitués

d'inositol-P (Anderson, 1980) qui peuvent provenir de la végétation de surface ou être inclus dans la biomasse microbienne et leurs produits métaboliques.

Les quantités des différentes formes de Po dépendent généralement du mode d'extraction choisi, du type de sol, et de sa mise en valeur. Environ la moitié du Po du sol existe sous une forme qui n'a pas encore été déterminée. La plupart de ces composés non déterminés pourrait être constituée d'orthophosphates faiblement adsorbés sur les substances humiques ou liés à celles-ci par des ponts métalliques (Stevenson, 1994).

I.4. Le phytate

Le phytate ou sel de l'acide phytique est également appelé le myo-inositol hexakisphosphate. C'est le phosphate d'inositol le plus important dans les sols (Dalal, 1977) à cause de sa stabilité chimique (Turner *et al.*, 2002). L'acide phytique (IP6) sert à stocker le phosphore dans les graines des plantes (maïs, orge, blé, avoine et les légumineuses) (Maenz, 2001). Il s'adsorbe fortement à la surface des oxydes de fer (De Groot et Golterman, 1993) et des argiles, ce qui le rend indisponible pour les plantes (Greaves et Webley, 1969). Les complexes qu'il forme avec Fe, Al, Ca et les argiles ont une solubilité dépendant du pH, avec une plus grande stabilité aux pH inférieur à 5 et supérieur à 7,5 (Turner *et al.*, 2002), et qui est régulée par le type de cation dans le sol (Celi *et al.*, 2001).

I.5. Les phosphatases dans le sol

Parmi les phosphatases, on peut différencier les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases, les phytases et les nucléases qui vont respectivement libérer du Pi à partir des monoesters, des diesters, du phytate (acide phytique ou phytine) et des acides nucléiques (Quiquampoix et Mousain, 2005).

I.5.1. Les phosphatases bactériennes

Les phosphatases dans le sol peuvent être produites par un certain nombre d'espèces de bactéries, surtout celles qui sont associées aux plantes dans la rhizosphère (Rodríguez et Fraga, 1999). Ces bactéries ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes comme la production d'enzymes pour la minéralisation du Po. Elles sont aussi utilisées comme des biofertilisants et agents de contrôle pour l'amélioration des cultures (Glick, 1995., Lemanceau, 1992). Parmi ces bactéries, on trouve *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Rodríguez et Fraga, 1999).

I.5.2. Les phosphatases fongiques

Beaucoup de champignons du sol ont un effet bénéfique sur la nutrition phosphatée des plantes hôtes, Ils stimulent la croissance par divers mécanismes dont la sécrétion de

phosphatases qui dégradent les phosphates organiques en Pi (Joner *et al.*, 2000., Matumoto-Pintro, 1996., Quiquampoix et Mousain, 2005).

I.5.3. Les phosphatases racinaires

Suite à la faible disponibilité du Pi dans les sols, certaines plantes sécrètent par les racines des phosphatases acides pour hydrolyser le Po autour de ces racines (Duff *et al.*, 1994). Des études biochimiques et moléculaires suggèrent fortement que la sécrétion des phosphatases acides constitue une partie intégrante des mécanismes de réponse des plantes à la faible disponibilité en P des sols (Tran *et al.*, 2010).

I.6. Les phytases

Les phytases sont naturellement présents chez les plantes et les micro-organismes, en particulier les champignons. Ils sont une sous classe de phosphatases, qui clivent efficacement le phytate (myo-inositol-hexakis phosphate) en inositol et en phosphate inorganique (Figure 3)(Yadav et Verma, 2012).

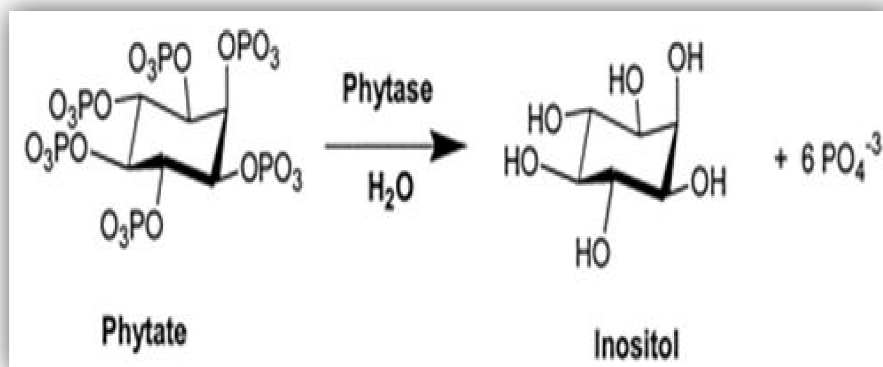


Figure 3: Réaction catalysée par la phytase (Yadav et Verma, 2012)

II. Les bactéries minéralisatrices du phosphore organique

II.1. La minéralisation du phosphore organique

En agriculture, le sol joue un rôle essentiel dans la nutrition des cultures car : il retient la solution du sol, il fixe certains éléments nutritifs et il abrite les micro-organismes qui produisent des composées organiques qui permettent le développement du système racinaire des plantes, et qui solubilisent des éléments minéraux (azote, phosphore, calcium) non assimilables en éléments directement assimilables par les plantes (Martineau *et al.*, 2008).

Parmi ces micro-organismes, il existe de nombreuses bactéries (rhizobactéries promotrices de la croissance) de genres différents qui sont capables de minéraliser le phosphore insoluble (P) à une forme accessible ou soluble. Tel que : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, et *Erwinia*.*etc.* Ces bactéries ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB). (Igual *et al.*, 2001).

L'augmentation de la disponibilité du P dans le sol par les micro-organismes se fait par deux méthodes:

- la dissolution des phosphates inorganiques par l'action des acides organiques (Abd-Allah 1994., Halder et Chakrabartty, 1993; Richardson, 1994), tels que les acides lactique, glycolique, oxalique et l'acide citrique (Louw et Webly., 1959). Ces acides organiques vont se complexer avec le calcium, le fer ou l'aluminium, libérant ainsi du Pi dans la solution du sol (Jones, 1998).
- La minéralisation des phosphates organiques par l'action des phosphatases (Abd-Allah, 1994; Halder et Chakrabartty, 1993), qui ont la propriété de catalyser l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides d'acides en libérant du Pi. Une fois que le P est minéralisé, il peut être absorbé par les plantes, immobilisé par la biomasse microbienne, précipité dans les complexes inorganiques ou absorbé sur les surfaces minérales (Paul et Clark, 2007).

II.2. Les bactéries minéralisatrices du phosphore organique (PSB):

II.2.1. Les bactéries du genre *Bacillus*

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (Bacillales), la classe des bacilles (Bacilli). Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables.

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

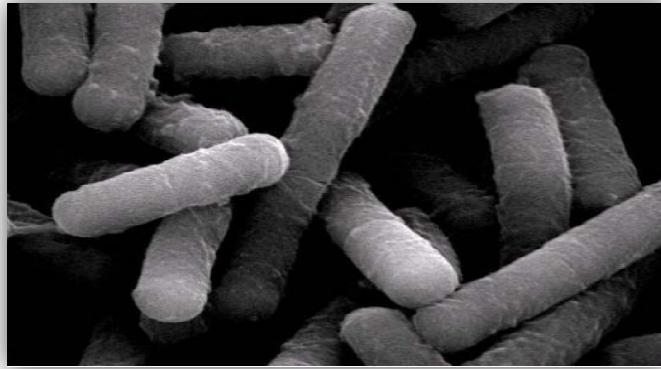


Figure 4 : Imagerie microscopique de la bactérie *Bacillus subtilis* (Carballido-López ;2007)

II.2.2. Les bactéries du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonales. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 μm (Palleroni, 1984).

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

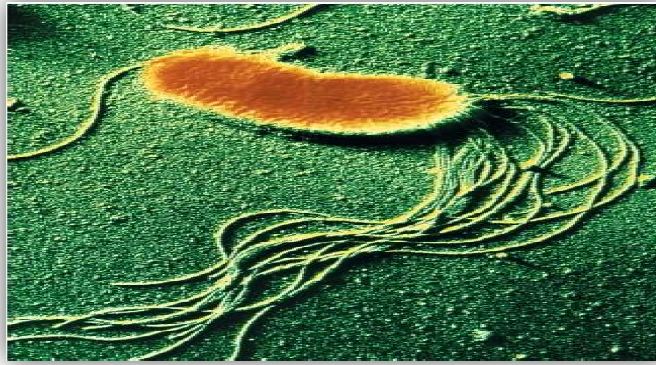


Figure 5 : Imagerie microscopique de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* (Saharan et Nehra., 2011)

III. Les milieux sélectifs des bactéries minéralisatrices du phytate

Comparées aux champignons et aux actinomycètes, les bactéries sont les micro-organismes prédominants qui peuvent solubiliser le phosphate dans le sol (Yin, 1988). Il ya quelques espèces de bactéries qui ont un potentiel élevé pour la minéralisation et la solubilisation du phosphore organique et inorganique (Khiari et Parent, 2005). On trouve les souches des genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* qui sont les agents de solubilisation des phosphates les plus puissants (Rodriguez et Fraga, 1999)

Plusieurs chercheurs ont utilisés différents milieux de culture pour l'isolement des bactéries minéralisatrice de phytate, et pour l'étude du mécanisme de la solubilisation des phosphates inorganiques.

L'activité de la solubilisation a été évaluée qualitativement par la formation de halos (zones claires) autour des colonies en croissance sur un milieu solide contenant du phosphate de calcium comme seule source de phosphore (Vazquez *et al.*, 2000).

Afin de mieux étudier ce phénomène, les chercheurs ont établi plusieurs milieux de cultures, liquides ou solides, ces milieux ont la capacité d'isoler les bactéries minéralisatrice de phytate.

Dans la catégorie des milieux solides on trouve :

- Le milieu PVK agar (Pikovskaya., 1948), ce milieu agit en tant que milieu sélectif pour l'isolement spécifique de PSM (phosphore izolation microorganisms) en raison de la présence de calcium triphosphate (TCP) qui est connu pour la formation de halo zone (Sharma, 2005). Sur la gélose de Pikovskaya, de nombreuses bactéries et champignons présentent un très grand nombre de colonies entourés de zones claires et transparentes. En raison de leur efficacité de solubilisation toutes les souches solubilisent le calcium triphosphate (TCP) dans le milieu. L'efficacité peut être différente pour chaque souche (Hemalatha *et al*, 2013).
- Howson et Davis (1983) ont travaillé sur le milieu PSM (Phytase screening medium) pour détecter les bactéries productrices de phytase, avec Ca-phytate comme seule source de P.
- Hill et ces collaborateurs (2007) ont utilisé deux milieux pour isoler les bactéries minéralisatrices du phytate, le milieu M1 qui est un milieu d'enrichissement il contient l'orthophosphate comme source de P, le thiosulfate et le glucose comme source de C, et le milieu M2 qui contient de l'agar-sodium phytate, utilisé par Richardson et Hadobas

- (1997) pour identifier les micro-organismes ayant le potentiel de dégrader les phytate. Les faux positifs peuvent résulter de traces du phosphore et non du phytate par l'apparition de fausses zones autour des colonies (Richardson et Hadobas, 1997).
- Jossi (2008) a travaillé sur le milieu Angle modifié (Angle *et al.*, 1991) avec Na - InsP₆ comme seule source de P, ce milieu a été utilisé pour la détection de l'activité phytase (Richardson et Hadobas, 1997). Bae *et al.* (1999) ont remarqués qu'on peut observer des colonies se développer dans le milieu Angle entourées des zones claires, et qui sont semblables aux colonies minéralisatrices de phytate, mais des tests ont révélés que ces colonies sont des faux positifs car elles sont dues à la dissolution du phytate par l'acidification et non par l'hydrolyse des groupes de P.
 - Le milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) pour isoler les PSB, en présence de calcium triphosphate (TCP) comme seule source de P (Nautiyala, 1999). Les souches PSB les plus efficaces pour la solubilisation de P ont été identifiées à l'aide des extractions d'ADN brut suivie d'une analyse par PCR (Bell *et al.*, 1998).

Matériel et méthodes

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Lieux et durée de l'étude

La présente étude a été réalisée au sein du laboratoire de biotechnologie et Amélioration des plantes du laboratoire de recherche de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétales (GBBV), à Chaabet El Rssas. Université Constantine 1

Pour une durée de quatre semaines, qui s'étend entre le 16 Mars et le 5 Mai 2014.

II. Objectif

L'objectif de notre travail vise à tester quatre milieux sélectifs spécifiques aux bactéries minéralisatrices du phytate les plus utilisés dans la bibliographie, et faire une comparaison qualitative entre ces derniers pour mettre en évidence les différences et les similarités entre les résultats de culture sur ces différents milieux sélectifs.

III. Les souches bactériennes

Au cours de notre travail nous avons utilisé des bactéries issues de la collection de culture microbienne du laboratoire cité ci-dessus.

Les bactéries utilisées ont été conservées à -80°C dans du glycérol. Parmi ces bactéries nous avons choisie les souches suivantes

III.1. *Bacillus subtilis*

Les *bacillus* sont les PSB les plus abondants dans la rhizosphère, et les plus efficaces pour la solubilisation du phosphate. (Maheswar *et al.*, 2012). La bactérie *Bacillus subtilis* pousse sur le milieu LB (Luria Bertani) comme milieu d'enrichissement où elle est incubée à 28°C pendant 24h à 48h.

III.2. *Pseudomonas sp*

Les bactéries de ce genre ont été considérées comme étant promotrices de la croissance des plantes pour plusieurs mécanismes tels que la fixation d'azote et la solubilisation du phytate (Lemanceau., 1992).

Leur milieu sélectif est le milieu King B où elles sont incubées pendant 24h à 28°C (King, 1954)

III.3. *Rhizobium TL19*

Ces bactéries sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses, Elles fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Downie, 2005). N'ayant pas la spécificité de solubiliser le phytate, elles sont utilisées dans notre travail comme témoin négatif.

Le milieu le plus utilisé pour leur culture est le milieu YMA (yeast Mannitol Agar) pendant 24h à 28°C (Vincent, 1970).

IV.Méthodes de travail

Pour la réalisation de ce travail nous avons effectués nos essais en trois répétitions pour chaque bactérie.

IV.1. Préparation des milieux

IV.1.1. Les milieux d'enrichissement

Les milieux utilisés sont préparés selon les compositions indiquées dans les tableaux suivants :

Tableau 1 : composition du milieu LB (Luria Bertani).

Composant milieu	Quantité
Bactotryptone	10 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7

Tableau 2 : composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar).

Composant milieu	Quantité
Bactotryptone	10 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ H ₂ O	0,2 g/l
Extrait de levure	0,5 g/l
NaCl	0,1 g/l
Agar	15 g/l
pH	6,8

Tableau 3 : composition du milieu king B.

Composant milieu	Quantité
Peptone	20 g/l
Glycerol	10 ml
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,5 g/l

Tableau 3 : composition du milieu king B (suite et fin).

Agar	15g/l
pH	7,2

Après autoclavage 20 min à 120°C les milieux sont répartis dans des boîtes pétris pour se solidifier.

IV.1.2. Les milieux sélectifs

a. Milieu PVK agar

Mis au point par Pikovskaya en 1948, il est utilisé pour l'isolement des bactéries phytasiques en présence de calcium triphosphate (TCP), dont la composition est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : composition du milieu PVK agar (Pikovskaya, 1948) après modification.

Composant milieu	Quantité g/500ml
Glucose	5
Yeast Extract	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,005
Na-InsP6	2,5
NaCl	0,1
KCl	0,1
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,001
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
Agar	7,5
pH	7

b. Milieu Angle

Etabli par Angle *et al* en 1991 et modifié par Jossi en 2008, ce milieu en double couches contient comme seule source de phosphore le phytate de sodium Na-insP6, il est utilisé pour tester la capacité des bactéries à dégrader le phytate (Richardson et Hadobas, 1997).

Tableau 5 : composition de la première couche du milieu Angle (sans phytate)

composant milieu	Quantité g/500ml
Tris-HCl 0.5 M	20 ml
Fe/EDTA solution :	55 µl
oligo-elements	500 µl
KOH 1 M	250 µl
NH ₄ NO ₃	0.1 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0.203 g
KCl	1.75 g
Agar	7.5 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0.34 g
Glucose	0.25g
pH	7

Tableau 6: composition de la deuxième couche du milieu Angle (avec phytate)

composant milieu	Quantité g/500 ml
Tris-HCl 0.5 M	20 ml
Fe/EDTA solution :	55 µl
oligo-elements	500 µl
KOH 1 M	250 µl
NH ₄ NO ₃	0.1 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.203 g
KCl	1.75 g
Agar	7.5 g
Glucose	0.5 g
Na-InsP6 (Dodeca sodium salt of inositol hexaphosphoric acid)	5 g
pH	7

c. Milieu NBRIP

Mis au point par Nautiyal en 1999, pour sélectionner les bactéries phytasique avec le calcium triphosphate (TCP) comme source de phosphore.

Tableau 7: composition du milieu NBRIP (Nautiyal,1999) après modification.

Composant milieu	Quantité g/500ml
Glucose	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,125 g
Na-InsP6	2.5 g
NaCl	0,1 g
KCl	0,1 g
Agar	7.5 g
pH	7

d. Milieu Hill

Utilisé par Hill et ces collaborateurs en 2007,

Tableau 8: composition du milieu Hill (Hill et *al* ; 2007)

Composant milieu	Quantité g/500ml
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	5 g
Glucose	4 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 g
NH ₄ Cl	0.15 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.02 g
solution d' oligo-élément	0.5 ml
phytate de sodium	1.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.5 g
Biotine	0.005 g
Agar	10 g
pH	7

Toutes les préparations des milieux ont été stérilisées à 120°C pendant 20min. Le glucose et le phytate dilué en solution sont filtrés à 2µm et ajoutés aux milieux. Les mélanges sont répartis dans des boîtes de pétris à raison de 3mm d'épaisseur.

IV.2. Inoculation des bactéries dans les milieux d'enrichissement

Les bactéries préalablement conservées dans le glycérol à -80°C sont inoculées dans les milieux de culture adéquats à leur régénération pendant 24h à 48h à 28°C.

IV.3. Repiquage sur les milieux sélectifs

Sous une hotte, Après 24h d'incubation des souches bactériennes dans les milieux de culture, une colonie de chaque bactérie est prélevée à l'aide d'une anse, puis striée le plus régulièrement possible sur tous les milieux sélectifs (3 répétitions) pour y déposer les bactéries. Les boîtes inoculées sont en suite incubées à 28°C et la croissance bactérienne est surveillée pendant 5 jours.

IV.4. teste de lecture

Après incubation à 28°C pendant 5 à 7 jours, nous avons procédé a une observation en se basant sur les critères permettant l'isolement et l'identification des bactéries minéralisant le phytate tels que l'aspect des colonies et le critère sélectif du milieu.

Résultats et discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Résultats

Les résultats de l'inoculation des bactéries dans les milieux sélectifs sont mentionnés dans le tableau 9:

Tableau 9 : Représentation de la croissance bactérienne et de l'activité de la minéralisation du phytate dans les quatre milieux sélectifs après 5 à 7 jours de croissance.

	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas sp</i>		<i>Rhizobium TL19</i>	
	Croissance bactérienne	Minéralisation du phytate	Croissance bactérienne	Minéralisation du phytate	Croissance bactérienne	Minéralisation du phytate
Milieu Angle	++	+++	++	+++	-	-
Milieu NBRIP	++	++	++	++	++	-
Milieu PVK	+++	+++	+++	+++	+++	-
Milieu Hill	-	-	-	-	-	-

Croissance: +++ Bonne croissance, ++ croissance moyenne, - aucune croissance.

Minéralisation : +++ Minéralisation bien visible, ++ minéralisation moyenne, - aucune minéralisation.

Selon le tableau des résultats, des différences entre les milieux en pu être notées :

- Le milieu Angle a donné une croissance moyenne pour les bactéries *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas sp*, et on ne trouve aucune croissance pour la souche *Rhizobium TL19*. Nous remarquons aussi une bonne minéralisation du phytate par la présence de zones claires au tour des colonies des bactéries *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas sp*, et aucune pour *Rhizobium TL19*.
- Le milieu NBRIP permet une croissance moyenne pour les trois souches utilisées. La minéralisation du phytate, c'est aussi jugé moyenne sauf pour la souche *Rhizobium TL19* où elle est absente.
- Le milieu PVK nous laisse observer une forte croissance des souches bactérienne présenté par des colonies bien développées et bien claires. Pour la minéralisation du phytate on a constaté un éclaircissement de tout le milieu à la périphérie des

colonies des bactéries *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas* sp, pour la bactérie *Rhizobium TL19* la minéralisation est absente.

- Le milieu Hill n'a donné aucun résultat positif pour les trois souches utilisées

Par ailleurs, aucune différence de temps de croissance n'a été notée entre les quatre milieux

Les photographies de des résultats de l'inoculation sont représentées dans la figure 6.

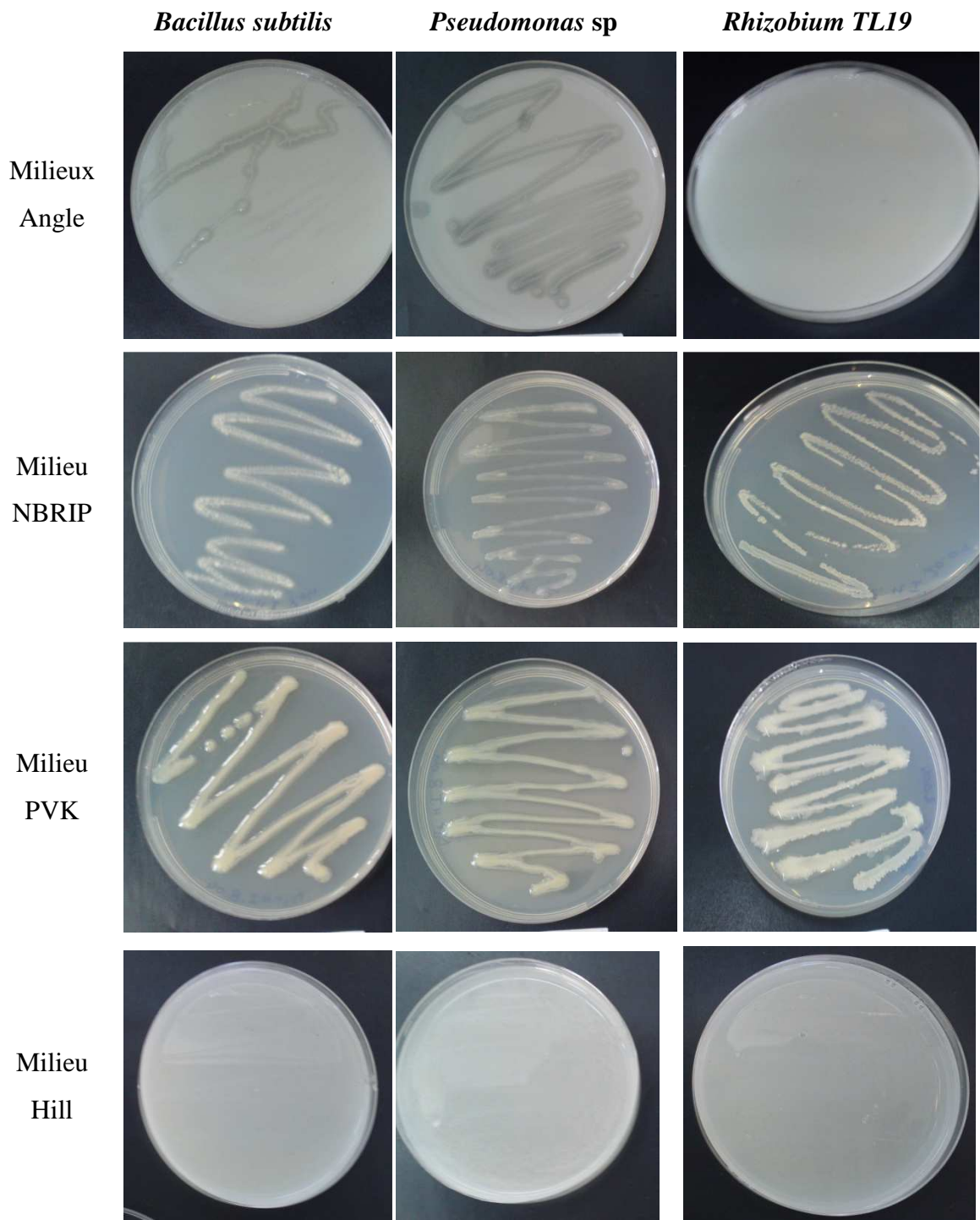


Figure 6 : Résultats de l'inoculation des bactéries dans les quatre milieux sélectifs après une période de 5 à 7 jours de croissance à 28°C

II. Discussion

Les microorganismes de la rhizosphère sont régulièrement isolés par épuisement sur gélose. La revue de littérature sur la recherche des bactéries minéralisant le phytate par culture sur milieu sélectif rapporte un grand nombre de milieux utilisés (le milieu Angle (Angle *et al.*, 1991), Le milieu NBRIP (Nautiyala, 1999), le milieu Hill (Hill *et al.*, 2007), milieu PSM (Howson et Davis, 1983) et le milieu PVK (Pikovskaya., 1948).

Dans notre étude pour la détection de bactéries minéralisant le phytate, nous avons comparé les quatre milieux de cultures sélectifs contenant le Na-InsP6 comme seule source de P les plus utilisés dans la bibliographie.

Les milieux de culture sont classiquement composés d'une source de carbone, une source d'azote, des micronutriments nécessaires au développement des cellules, d'oligo-éléments nécessaires ou souhaitables au développement des cellules, et plusieurs sources de phosphore ont été utilisées. Ainsi, le test d'efficacité relative des isolats permet de sélectionner les microorganismes capables de produire des zones claires autour des colonies. Ces zones claires sont dues à la production d'acide organiques dans le milieu entourant les colonies en question (Halvorson *et al.*, 1990). Ainsi, plusieurs bactéries et champignons isolés, ont montré la capacité à solubiliser les phytates, parmi ces genres, les plus souvent isolés ont trouvé *Pseudomonas* (Chabot *et al.*, 1993) et *Bacillus* (Arora et Gaur, 1978) d'où notre choix de ces bactéries en plus de leur séquençage complet ayant permis l'identification du gène phytase dans leur genome.

Nos résultats montrent que trois des milieux utilisés (les milieux Angle, NBRIP, PVK) ont présenté des zones claires transparentes autour des bactéries, due à l'absorption du P organique par la bactérie pour libérer le P inorganique.

Le degré de la minéralisation du phytate est différent entre les souches bactériennes et les milieux utilisés.

Les résultats obtenus peuvent être traduits de plusieurs manières, on se basant sur les études réalisées auparavant sur les bactéries minéralisatrices du phytate et leurs milieux sélectifs.

Selon Bae *et al.* (1999), toutes les souches qui se développent sur le milieu Angle doivent être considérées comme des bactéries productrices du phytase même celles qui n'ont pas produit de zones claires autour d'elles.

Nos résultats ont montré que parmi les trois bactéries utilisées, deux d'entre elles (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp) ont pu croître sur ce milieu en produisant des zones

claires et que la troisième (*Rhizobium TL19*) utilisée comme témoin négatif n'a donné aucune croissance, ce qui confirme l'étude ci-dessus.

L'étude comparative menée par Shekhar Nautiyal (1999), a démontré que les deux milieux PVK et NBRIP donne des résultats similaires pour l'activité de minéralisation du phytate ce qui confirme nos résultats.

Par ailleurs Deepika Divya Kadiri *et al.* (2013) qui ont utilisé les mêmes milieux PVK et NBRIP ont montré que les bactéries de solubilisation du phytate sont des bactéries aérobies dont certaines sont des bactéries sporulantes. L'identification de ce groupe a montré que les bactéries du genre *Bacillus* étaient les PSB prédominantes dans tous les sols testés, suivies par le genre *Pseudomonas* ce qui confirme nos résultats.

Nos résultats montrent que le milieu Hill ne paraît pas être un bon milieu en raison de l'absence de croissance. D'après l'étude de Hill *et al.* (2007), leur milieu sélectif (Hill) doit être précédé par la mise en culture des bactéries minéralisatrices du phytate dans un milieu d'enrichissement contenant l'orthophosphate, le thiosulfate et le glucose, afin de maintenir l'activité phytase de ces bactéries, des études plus récentes (Irshad *et al.*, 2012, Maougal *et al.* , 2014) montrent que la pré-culture sur milieu riche en P donné de faux positifs dans la mesure ou la croissance sur le milieu sélectif serait du aux réserves en P de la bactérie et non a la minéralisation du phytate présent sur le milieu. En moyenne, 70% des bactéries isolées sur ce milieu (Hill) étaient capables de se développer et de produire une zone acide de compensation sur des plaques contenant du phytate de calcium comme seule source de phosphore (Richardson et Hadobas, 1997; Hill et Richardson, 2006).

Pour notre cas l'absence de résultats positifs pour le milieu Hill, peut être expliquée par la non utilisation du milieu d'enrichissement spécifique.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Le Phosphore est l'un des nutriments essentiels pour la croissance et le développement des plantes, et sa déficience est fréquemment un facteur qui limite la production des cultures dans plusieurs écosystèmes. Malgré la biodisponibilité du phosphore dans le sol la plante ne peut utiliser qu'une petite partie libérée par la minéralisation, les microorganismes du sol jouent un rôle important dans ce processus ils absorbent le phytate comme forme organique de P et libèrent le P inorganique par la réaction des phytases.

Le présent travail avait pour but de réaliser une étude comparative entre les milieux sélectifs, spécifiques aux bactéries minéralisatrices du phytate, les plus utilisés, et de définir un milieu de référence à utiliser dorénavant.

Nos résultats nous ont permis de constater une différence de croissance d'un milieu à un autre et même entre différentes bactéries inoculées dans le même milieu sélectif. La différence est aussi présente pour la minéralisation du phytate observé par la présence de zones claires autour des colonies.

Ainsi les différences entre les cultures bactériennes nous laissent dire que parmi les quatre milieux testés (Angle, PVK, Hill, et NBRIP), le milieu PVK est le milieu le plus convaincant par ces résultats de croissance des trois souches bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp et *Rhizobium TL19*) et aussi par sa spécificité pour les bactéries minéralisatrices du phytate.

Afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat il serait maintenant intéressant d'approfondir les recherches en

- Quantifiant, dénombrant ces isolats sur ces différents milieux.
- Testant ces milieux directement avec des isolats de la rhizosphère.

Et ceci afin de généraliser les résultats obtenus.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Abd-Alla M.H. (1994).** Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae phosphatases. *Biot. Fertil. Soils* 8:2 16-21 8.
- **Angle J.S., McGrath S.P., Chaney R.L. (1991).** New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 57: 3674–3676.
- **Arora, D., Gaur, A.C. (1978).** Periodic microbial solubilization of ³²P labelled hydroxyapatite. *Indian J. Microbiol.* 18: 193 - 194.
- **Attiwill. PM., Adams. MA, (1993).** Nutrient cycling in forests. *New Phytologist* 124:561-582.
- **Bashan. Y., Holguin. G., Bashan. LE, (2004).** *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.
- **Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.J., Selinger L.B. (1999).** A novel staining method for detecting phytase activity *journal of microbiological methods* 39 (1): 17-22.
- **Barber S.A. (1995).** Soil nutrient bio availability: a Mechanistic Approach. John Wiley & Son N.Y. 398p.
- **Bell J.M., Paton J. C., Turnidge J. (1998).** Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: Phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2187-2190.
- **Bennai M., benabbas B. (2007).** L'amélioration des rendements des céréales par une fertilisation adaptée aux conditions pédoclimatiques Algériennes. Constantine. Septembre 2007.
- **Bertrand R., Gigou J. (2000).** La fertilité des sols Tropicaux. éd *Maisonneuse & Larose*. Paris, 397 p.
- **Busman L., Lamb J., G.Randall., Rehm G., Schmitt M.(2002).**"The nature of Phosphorus in soils." Retrieved 2005-01-27,2005
- **Carballido-Lopez R.A. (2007).** Formstone, Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.*,10 (6): p. 611-6.
- **Celi L., Presta M., Ajmore-Marsan F., Barberis E. (2001).** Effects of pH and electrolytes on inositol hexaphosphate interaction with goethite. *Soil Science Society of America Journal* 65, 753-760.

- **Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. P. (1993).** Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39: 941 - 947.
- **Charest M.H., Beauchamp C.J., Antoun H. (2005).** Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(Suppl 2): 219–227.
- **Dalal R.C. (1977).** Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy* 29, 83-117.
- **Dalton. J.D., Russell, G. C., Sieling. D. H. (1952).** Effect of organic matter on phosphate availability. *Soil Sci.* 73:173-181.
- **De Groot C.J., Golterman H.L. (1993).** On the presence of organic phosphate in some Camargue sediments: evidence for the importance of phytate. *Hydrobiologia* 252, 117-126.
- **Deepika Divya Kadiri ., Naresh Gorle, Krishnakanth Varada Raju Peetala., Sujatha Peela. (2013).** isolation, screening and identification of phosphate solubilizing bacteria from different regions of visakhapatnam and araku valley. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, Vol 4, Issue 4, 2013, pp 518-526.
- **Dey. R., Pal. KK., Bhatt. DM., Chauhan. SM, (2004).** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Aracis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159:371-394.
- **Dipak H.D., Mukherjee K.D. (1986).** Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. *J. Agric. Food Chem.*, (34): 775780.
- **Downie. J. A. (2005).** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules *Curr. Biol.* 15: R196-R198.
- **Duff S.M.G., Sarath G., Plaxton W.C. (1994).** The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90, 791-800.
- **Etchebest S. (2000).** Croissance foliaire du maïs (*Zea mays* L.), sous déficience en phosphore. Analyse à l'échelle de plante et à l'échelle de la feuille. Thèse INRA-Pg. 99 p
- **Falkowski. PG., Fenchel. T., Delong. EF, (2008).** The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320:1034-1039.
- **FAO (Food and agriculture Organization). (2004).** Utilisation des phosphates naturels pour une agriculture durable. *Bulletin FAO engrais et Nutrition végétale* N°13, Rome, Italie.

- **Frossard E., Brossard M., Hedley MJ., Metherell A. (1995).** Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessen H Eds, Phosphorus in global environment, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 108-137.
- **Glick B.R. (1995).** The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- **Halvorson, H.O., Keynan, A., Komberg, H.L. (1990).** Utilisation of calcium phosphate for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol. Biochem.* 22: 887 - 890.
- **Hemalatha N., Raja N., Jayachitra A., Rajalakshmi A., Valarmathi N. (2013).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and analysing their effect in capsicum annum l. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research.* 4(3): 159-167.
- **Hill. J. E., Richardson. A.E. (2006).** Isolation and assessment of microorganisms that utilize phytate. In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*. Turner, B., Mullaney, E., and Richardson, A. (eds).
- **Hill R.F., Richardson A.E. (2007).** Isolation and Assessment of Microorganisms That Utilize Phytate. CAB International 2007. *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment* (eds B.L. Turner, A.E. Richardson and E.J. Mullaney).
- **Höfte M., de Vos P., (2006).** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans "Plant-associated bacteria", part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 507-533.
- **Holford, I.C.R.,(1997).** Soil phosphorus: Its measurement and its up take by plants. *Aust.J.SoilRes.*35:227-39.
- **Howson. S. J., Davis. R. P. (1983).** Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 377–382.
- **Igual J.M., Valverde A., Cerevantes E., Válezquez E. (2001).** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21, 561–568.
- **Irshad et al., (2012).** Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant Soil* (2012) 358:155–168
- **Joner E.J., Van Aarle I.M., Vosatka M. (2000).** Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226, 199-210
- **Jones D.L. (1998).** Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.

- **Jossi M. (2008).** Rhizosphere bacterial communities associated with *lolium perenne* structuration and plante-mediated influences. These d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse.
- **Kaila A. (1959).** Retention of phosphates by peat samples. J. Sci. Agric. Soc. Finland 31: 215-225.
- **Kalbitz. K., Solinger. S., Park. JH., Michalzik. B., Matzner. E, (2000).** Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. Soil Science 165:277-304.
- **Killham. K, (1994).** Soil Ecology. Cambridge University Press, ambridge 242 p.
- **Khiari L., Parent L.E. (2005).** Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry swine manure. Canadian Journal of Soil Science 85 75-87.
- **King. E.O., Ward M.K., and Raney D.E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301.
- **Lagrange A. (2009).** études écologique et microbiologique des espèces du genre *costularia* (cyperaceae), pionnières des sols ultramafiques en Nouvelle-Calédonie : perspectives d'application à la restauration écologique. thèse de doctorat en Ecologie végétale et microbiologie. Université de la Nouvelle-Calédonie.
- **Lemanceau P. (1992).** Effects benefiques de rhizobacteries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescent. Agronomie 12:413–37.
- **Louw H.A., Webly D.M. (1959).** A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. J. Appl. Bacteriol. 22, 227-233.
- **Maenz D.D. (2001).** Enzymatic Characteristics of Phytases as they Relate to Their Use in Animal Feeds (In: Enzymes in Farm Animal Nutrition eds. M.R. Bedford and G.G. Partridge.) CAB International. Chapter 3. 61. pp.
- **Maheswar N et al., (2012).** Solubilization of phosphate by Bacillus Sps, from groundnut rhizosphere (Arachishypogaea L). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 4(8):4007-4011
- **Maougal R.T et al., (2014).** Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. European Journal of Soil Biology
- **Martineau C., Mongeaux B., Rochefort S. (2008) :** Guide d'implantation et entretien d'une pelouse durable, fédération internationale de l'horticulture ornementale du québec (FIHOQ).

- **Matsumoto. LS., Martines. AM., Avanzi. MA., Albino. UB., Brasil. CB., Saridakis. DP., Rampazo. LGL., Zangaro. W., Andrade. G, (2005).** Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology* 28:57-65.
- **Mengel K., Kirkby. (1987).** Principles of plant nutrition. 4th Eds, International Potash Institute, Bern, Switzerland, 687 p
- **Nagórska K., Bikowski M., Obuchowski M. (2007).** Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54 (Suppl 3): 495–508.
- **Nautiyala C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170:265-270.
- **Palleroni N.J. (1984).** Family 1. Pseudomonaceae. In : Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1. postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.
- **Paul E.A., Clark F.E. (2007).** Soil Microbiology and Biochemistry. Ttoisième édition. Academic Press, New York. 340p.
- **Pierzynski G.M., Sims J.T., Vance G.F. (2000).** Soils and environmental quality. CRC Press.
- **Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17, 362-370.
- **Plenet D., Mollier A., Pellerin S. (2000).** Growth analysis of maize yield field crops under phosphorus deficiency: II. Radiation use efficiency, biomass accumulation and yield components. *Plant and Soil* 224: 259-272
- **Quiquampoix H., Mousain D. (2005).** Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 89-112.
- **Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. Paull R.E., (2004).** Microbial antagonists control
- **Richardson. A. E., Hadobas. P. A. (1997).** Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 509–516.
- **Richardson A.E. (1994).** Soil microorganisms and phosphorus availability. Dans: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupts, V. V. S. R., et Grace, P.R. Éd., *Soil Biota, management in sustainable farming systems*. CSIRO Australia, Melbourne, p. 50-62.

- **Rodriguez D., Pomar M.C., Goudriaan J., (1998).** Leaf primordia initiation, leaf emergence and tillering in wheat (*Triticum aestivum*, L.) grown under low-phosphorus conditions. *Plant and Soil*, 202: 149-157.
- **Rodríguez H., Fraga R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- **Saharan B.S., Nehra V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review, *Life Science and Medicine Research*, Volum 21.
- **Sharma. K. (2005).** In: *Manual of Microbiology. Isolation, Purification and Identification of Bacteria.* Ane Books Pub. New Delhi, p. 41.
- **Stevenson F.J. (1986).** Cycles of soils. C, N, P, S, micronutrients. J. Wiley and Sons, New York, 380 p.
- **Stewart. J. W. B. (1980).** The importance of P cycling and organic P in soils. *Better Crops Plant Food.* Winter issue. 16-19.
- **Tran H.T., Hurley B.A., Plaxton W.C. (2010).** Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* 179, 14-27.
- **Turner B.L., Paphazy M.J., Haygarth P.M., McKelvie I.D. (2002).** Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 449-469.
- **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 Fertil Soils.* 30: 460-468.
- **Vessey. J. K, (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- **Vincent J.M. (1970).** A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP. Handbook n°15 – Blackwell scientific publishers, Oxford.
- **Yadav B.K., Verma A. (2012).** Phosphate Solubilization and Mobilization in soil Through Microorganism Under Arid Ecosystems, *The Functioning of ecosystems*, Prof. Mahamane Ali (Ed): 93-108.
- **Yin R. (1988).** Phosphate-solubilizing microbes in non-irrigated soils in China. *Soils* 20 243-246.

Résumé

Après l'Azote le Phosphore est l'élément nutritif le plus important pour les plantes, Toute fois les réserves du phosphore dans le sol ne peuvent pas être totalement disponibles pour la plante. Le phytate est la forme organique du phosphore qui est une fois minéralisé sous l'action de phytase d'origine microbienne libère le phosphore inorganique assimilable par les plantes. Pour mieux étudier les mécanismes de minéralisation du phosphate organique par les microorganismes, une mise en culture de ces dernières est indispensable. Mais l'utilisation de plusieurs milieux différents ne facilite pas la comparaison des résultats de recherche. Dans cette étude une mise en culture des souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp et *Rhizobium TL19* dans les milieux sélectifs : Angle, NBRIP, PVK et Hill a été réalisé à fin d'effectuer une analyse comparative des résultats de la croissance et de la minéralisation du phytate. Notre étude a révélé que le milieu PVK est le milieu sélectif le plus convaincant comparé aux milieux testé, car il nous a permis d'avoir une très bonne croissance des bactéries utilisées, ainsi qu'une forte minéralisation observée par des zones claire autour des colonies.

Mots clés : Milieux sélectifs, bactéries phytasiques, phytate, minéralisation, phytase.

Abstract

After Nitrogen Phosphorus is the most important nutrient for plants, but the reserves of phosphorus in the soil can not be fully available to the plant. Phytate is the form of organic phosphorus is mineralized once under the action of microbial phytase liberates inorganic phosphorus assimilated by plants. For better study the mechanisms of mineralization the organic phosphate by microorganisms, culturing of these is essential. But the use of several different media does not facilitate comparison of research results. In this study the culture of bacterial strains *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp and *Rhizobium* TL19 in selective media: Angle, NBRIP, PVK and Hill were realized for the comparative analysis of the results of growth and mineralization Phytate. Our study revealed that the PVK medium is the most convincing selective medium compared to the medium tested, because it allowed us to have a very good growth of bacteria used, and a high mineralization observed by clear zones around colonies.

Keywords: Selective media, phytasiques bacteria, phytate, mineralization, phytase.

ملخص

بعد النتروجين يعتبر الفسفور (P) العنصر الغذائي الأكثر أهمية بالنسبة للنباتات، و لكن احتياطات الفسفور المتواجدة في التربة ليست متوفرة كليا للنباتة. الفيتات ينتمي إلى مجموعة الفسفور العضوي الذي إذا تمت معدنته تحت نشاط الفيتاز ذو الأصل الميكروبي يحرر الفسفور غير العضوي المتاح امتصاصه من طرف النباتات. من أجل دراسة آليات تمعدن الفسفور العضوي بواسطة الكائنات الحية الدقيقة، زراعة هذه الأخيرة أمر ضروري لكن استخدام العديد من الأوساط الانتقائية المختلفة لا يسهل مقارنة النتائج المحصل عليها، في هذه الدراسة تمت زراعة الفصائل البكتيرية *TL19 Rhizobium* و *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* في الأوساط Angle, NBRIP, PVK و Hill من اجل القيم بمقارنة لنتائج النمو و تمعدن الفيتات. كشفت دراستنا أن الوسط PVK هو الوسط الانتقائي الأكثر إقناع مقارنة بالأوساط المختبرة، وذلك لأنه يسمح لنا بالحصول على نمو ممتاز للبكتيريا المستعملة و كذلك تمعدن قوي نلاحظه من خلال وجود مناطق فاتحة حول المستعمرات البكتيرية.

الكلمات المفتاحية : الأوساط الانتقائية ، البكتيريا فيتاز ، الفيتات، تمعدن، فيتاز.

M^{elle} DJEGHAR Hadjer

Date de soutenance : 22/06/2014

M^{elle} DJEGHAR Ihsene

Titre: Comparaison de quatre milieux pour la culture de bactéries minéralisant le phytate

Nature du diplôme: Master en Biologie et Génomique Végétales

Résumé :

Après l'Azote le Phosphore est l'élément nutritif le plus important pour les plantes, Toute fois les réserves du phosphore dans le sol ne peuvent pas être totalement disponibles pour la plante. Le phytate est la forme organique du phosphore qui est une fois minéralisé sous l'action de phytase d'origine microbienne libère le phosphore inorganique assimilable par les plantes.

Pour mieux étudier les mécanismes de minéralisation du phosphate organique par les microorganismes, une mise en culture de ces dernières est indispensable. Mais l'utilisation de plusieurs milieux différents ne facilite pas la comparaison des résultats de recherche.

Dans cette étude une mise en culture des souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp et *Rhizobium TL19* dans les milieux sélectifs : Angle, NBRIP, PVK et Hill a été réalisé à fin d'effectuer une analyse comparative des résultats de la croissance et de la minéralisation du phytate.

Notre étude a révélé que le milieu PVK est le milieu sélectif le plus convaincant comparé aux milieux testé, car il nous a permis d'avoir une très bonne croissance des bactéries utilisées, ainsi qu'une forte minéralisation observée par des zones claires autour des colonies.

Mots clés : Milieux sélectifs, bactéries phytasiques, phytate, minéralisation, phytase.

Laboratoire de recherche: Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales.

Membres de jury :

Président (e): Pr. DJEKOUN Abdelhamid Pr. Université Constantine1

Encadreur : Mme. MAOUGAL Rym.T MAA INATAA Université Constantine1

Membre : Mr. TEMAGOULT Mahmoud MAA Université Constantine1