REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ETPOPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par :

MEKKATI ABDEL AZIZ *MOGHRANI BILAL*

Thème :

Rôle écologique des micro-organismes solubilisant le phosphate inorganique.

Soutenue publiquement le : 22/06/2024 ., Devant le jury composé de :

Mr Licir Mourad MAA FS/UYFM Président

Mr Kaaboub El-aid MAB FS/UYFM Examinateur

Mr Chami Bouazza MAA FS/UYFM Promoteur

Année universitaire : 2023/2024



Remerciements

Nous voulons remercier Dieu qui nous a permis d'atteindre ce moment, et nous à donne la patience, le courage et la volonté pour accomplir ce travail.

Nous voulons remercier notre superviseur M CHAMI Bouazza, pour son temps, ses efforts et sa patience avec nous.

Nous tenons à remercier Mr Licir Mourad et Mr Kaaboub El-aid tous les professeurs du département des sciences de la nature et de la vie.

Et enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de

loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

A mes chers parents qui m'ont accompagné à chaque étape de mon parcours académique,

à mes chers frères, mon soutien dans la vie,

à mes sœurs

, qui sont ici pour partager ma joie.

Merci d'être toujours là pour moi.



Dédicace

{وَقَضَى رَبُّكَ أَلاَّ تَعْبُدُواْ إِلاَّ إِيَّاهُ وَبِالْوَالِدَيْنِ إِحْسَاناً إِمَّا يَبْلُغَنَّ عِندَكَ الْكِبَرَ أَحَدُهُمَا أَوْكِلاَهُمَا فَلاَ تَقُل لَّهُمَآ أُفٍّ وَلاَ تَنْهَرْهُمَا وَقُل لَّهُمَا قَوْلاً كَرِيماً* وَاخْفِضْ لَهُمَا جَنَاحَ الذُّلِّ مِنَ الرَّحْمَةِ وَقُل رَّبِّ ارْحَمْهُمَا كَمَا رَبَّيَانِى صَغِيراً* رَّبُّكُمْ أَعْلَمُ بِمَا فِي نُفُوسِكُمْ إِن تَكُونُواْ صَالِحِينَ فَإِنَّهُ كَانَ لِلأَوَّابِينَ غَفُوراً} (23-25).

In memory of my loving dad.

In honor of my precious mom.

To my dear sister for their constant encouragement and moral support.

With love and brotherhood to my brother


Sommaire

Sommaire :

I. Introduction **22**

II. Généralités..... **24**

1. Le phosphore **24**

1.1. Le phosphore dans le sol **25**

1.2. Cycle biogéochimique du phosphore.....**26**

1-3.Types des phosphores présents dans le sol a.phosphore organique (po) b.phosphore inorganique (pi) **28**

1.4. Solubilisation du phosphore inorganique

a.Par les acides organiques **28**

b. Par les acides inorganiques.....**30**

1.5.Minéralisation du phosphore organique **30**

1.6. Intérêts du phosphore dans les plantes.....**32**

2. Les micro-organismes et le phosphore **33**

2. Micro-organismes solubilisant le phosphore **33**

2.1. Bactéries solubilisant les phosphates.... .....**34**

2.2. Champignons solubilisant les phosphates.....**35**

2.3. Les actinomycètes.....**36**

2.4. La culture complexe (Bactérie – Mycète) **37**

2.5. Mécanismes de la solubilisation du phosphore par les micro-organismes

03 . Rôles écologiques des micro-organismes solubilisant le phosphate.**38**

3.1. Micro-organismes biofertilisant.....**39.**

3.2. Les mycorhizes.....**39.**

3.3.Impact de l'interaction plantes microorganismes

3.3.1. Interaction non symbiotique. .....**40.**

3.3.2. Interactions symbiotiques. .....**41.**

a. Symbioses mycorhiziennes.....**41.**

b. Symbioses fixatrices d'azote.....**42.**

3.4. La rhizosphère.. .....**43.**

04. Rosacées / Rosaceae..... .....**44.**

4.1. Définition.....**44.**

4.2. Distribution geographique.....**44.**

4.3. Appareil végétatif..... .....**45**

4.4. Rosier (Rosa).....**45**

4.5. Classification et critères de culture.....**46**

05 . Biotechnologie des micro-organismes solubilisant le phosphat.....**46.**

5. Place des micro-organismes du sol en biotechnologi..... **46**

5.1. Biotechnologie des biofertilisants.....**47**

5.2. Solubilisateurs de phosphore.....**48.**.

5.3. Consortia microbiens.....**49**

5.4.Utilisation pour la restauration.....**49**

5.5. Domaines d'application.....**50**

5.6. Formulations pour biofertilisant.....**50**

5.6.1. Formulations solide.....**52**

5.6.2. Formulations liquides.....**52**

III. Matériel et méthodes.. 54

1. Matériel

1.1. Cadre d'étude et présentation de site.....**55**

1.2. Echantillonnage.....**55**

1.3. Prélèvement de la zone rhizosphérique **56**

1.4. Pré-conservation **57**

1.5. Réactifs chimiques, milieux de cultures..... .....**57**

2 .Méthodes

2.1. Préparation du sol **59**

2.2 Préparation des cultures bactériennes **59**

2.2.1 Préparation des cultures bactériennes sur milieu solide **59**

Repiquage et confirmation des souches apportés **59**

a. Purification des souches.....**59**
b. Tests de confirmation **60**

b1.Examen à l'état frais **60**

b2.Coloration de Gram .....**60**.

b3.Aspect morphologique des souches d'Actinomycètes isolées **60**

2.2.2. Préparation des cultures bactériennes sur milieu liquide .....**60**.

2.3 Test de solubilisation du phosphate **60**

2.4 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV Solide.....**61**

2.4.1. Application des disques **61**

2.4.2. Incubation **62**

2.4.3. Lecture **62**

2.5 Mesure de la solubilisation du phosphate sur milieu PKV liquide.....**62**

2.6. Traitement statistique des données **63**

IV. Résultats et discussion 64

1. Dénombrement de la microflore totale **65**

2. Caractéristiques morphologique et culturales des souches étudiées **65**

2.1.Croissance sur le milieu ISP2 .....**65**

2.2. Caractères micro-morphologiques **68**

3. Tests d'identification des isolats de la rhizosphère.....**69**

3.1. Caractéristiques chimiques **69**

4. Étude de la solubilisation du phosphate **70**

4.1.Evaluation de l'efficacité des isolats a solubiliser le phosphate inorganique.....**70**

4.2. Acidification du milieu par les isolats **71**

5. Etude de la biodiversité des souches de la rhizosphère de Rosa..... **72**

5.1. Diversité en fonction de la variabilité métabolique **72**

a. Variable pH **73**

b.Variable diamètre de l'halo de solubilisation.....**73**

5.2. Classification phylogénétique (classification ascendante hiérarchique CAH).....**74**

V. Conclusion 76

Résumé

Résumé :

Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente (70 à 90%) des actinomycètes. l'importance de leur présence dans le sol est en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables tels que le phosphate insoluble afin de le rendre disponible pour la croissance des plantes dans le cadre du développement de l'agriculture. Cinq isolats d'actinomycètes du genre *Streptomyces* de la rhizosphère de Rosa ont été criblés pour leur aptitude à solubiliser le phosphate sur quatre milieux de culture différents. L'étude des caractères morphologiques après observation macroscopique a montré que la majorité des colonies sont petites, régulière ou non, aplaties ou bombées, pigmentées, sporulées et poudreuses avec une odeur terreuse. Après coloration simple et coloration de Gram l'observation microscopique a montré que ces souches sont formées de filaments, ramifiés et de coloration Gram positive. Les souches S1, S2 sont capables de solubiliser le phosphate mais à des degrés différents. La souche S1 a montré le pouvoir de solubilisation (3.5 cm de diamètre de solubilisation) le plus important elle a été sélectionné. L'analyse phylogénétique des deux variables quantitatives a révélé leur appartenance au genre *Streptomyces* avec de degrés de similitude de 99% pour les cinq souches. Sur l'arbre phylogénétique construit les souches S1 avec S2 et S3, S4 et S5 occupent deux lignes phylogénétiques indépendantes ce qui nous permet de dire qu'il s'agit probablement de deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces*. Cette confirmation est d'ailleurs consolidée par les valeurs importantes des distances séparant de ces souches des autres espèces du genre.

Mots clés : Streptomyces, Solubilisation du phosphate, PGPR, Rhizosphère.

Abstract :

The Streptomyces genus is very widespread in the soil where it represents (70 to 90%) actinomycetes. The importance of their presence in the soil is because of their ability to degrade non-biodegradable organic substances such as insoluble phosphate in order to make it available for plant growth as part of agricultural development. Five isolates of actinomycetes of the genus Streptomyces from the rhizosphere of Rosa were screened for their ability to solubilize phosphate on four different culture media. The study of morphological characters after macroscopic observation showed that the majority of colonies are small, regular or not, flattened or rounded, pigmented, sporulated and powdery with an earthy odor.

After simple staining and Gram staining, microscopic observation showed that these strains are formed of filaments, branched and Gram positive staining. Strains S1, S2 are capable of solubilizing phosphate but to different degrees. The S1 strain showed the greatest solubilization power (3.5 cm of solubilization diameter) and was selected. The phylogenetic analysis of the two quantitative variables revealed their belonging to the genus Streptomyces with degrees of similarity of 99% for the five strains. On the phylogenetic tree constructed strains S1 with S2 and S3, S4 and S5 occupy two independent phylogenetic lines which allows us to say that these are probably two new species of the genus Streptomyces. This confirmation is also consolidated by the significant values of the distances separating these strains from other species of the genus.

Keywords: Streptomyces, Phosphate solubilization, PGPR, Rhizosphere.

ملخص:
ينتشر جنس Streptomyces بشكل كبير في التربة حيث يمثل (70 إلى 90%) شعيات. وترجع أهمية وجودها في التربة إلى قدرتها على تحليل المواد الغير عضوية الغير القابلة للتحلل مثل الفوسفات غير القابل للذوبان، وذلك لإتاحتها لنمو النباتات كجزء من التنمية الزراعية. اذ تم فحص خمس عزلات من الفطريات الشعوية من جنس Streptomyces من منطقة الجذور في نبات الوردة لمعرفة قدرتها على إذابة الفوسفات في أربعة أوساط زرع مختلفة. أظهرت دراسة الصفات المورفولوجية بعد المشاهدة العيانية أن غالبية المستعمرات صغيرة، منتظمة أو غير منتظمة، مسطحة أو مدورة، مصبوغة، متبوّعة وبودرة ذات رائحة ترابية. بعد الصبغ البسيط وصبغ الجرام، أظهرت الملاحظة المجهرية أن هذه السلالات تتكون من خيوط متفرعة وصبغة إيجابية الجرام. السلالات S1، S2 قادرة على إذابة الفوسفات ولكن بدرجات مختلفة.
اذ ظهرت سلالة S1 أنها أكبر قوة ذوبان (3.5 سم من قطر الذوبان) وتم اختيارها. وكشف التحليل الوراثي للمتغيرين الكميين انتمائهما إلى جنس Streptomyces بدرجات تشابه 99% للسلالات الخمس على شجرة النشوء والتطور، تم إنشاء سلالات S1 مع S2 وS3 وS4 وS5 تحتل خطين نشوئيين مستقلين مما يسمح لنا بالقول أن هذين النوعين على الأرجح نوعان جديدان من جنس Streptomyce. يتم تعزيز هذا التأكيد أيضًا من خلال القيم المهمة للمسافات التي تفصل هذه السلالات عن الأنواع الأخرى من الجنس.
الكلمات المفتاحية: الستربتوميسيس، إذابة الفوسفات، PGPR، الريزوسفير

.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01: Cycle de phosphore dans le système sol-plante-eau.....27

Figure 02: Réaction catalysée par la phosphatase sur le p-nitrophényl phosphat.....31

Figure 03: *Agrobacterium* colonisant les racines de *Carya illinoensis*.....35

Figure 04: CMA de *Rhizopus* colonisant des racines de maïs avec des hyphes, des arbuscules et des vésicules.....35

Figure 05: *Frankia* colinisant les racines de Sorgho.....36

Figure 06: Mécanismes de solubilisation des phosphates inorganiques par les micro-organismes.....37

Figure 07: Coupe de mycorhize schématisant la pénétration du champignon dans la racine.....39

Figure 08: Interaction non symbiotique plante-microorganisme.....40

Figure 09: Morphologie de la symbiose mycorhizienne.....41

Figure 10: Processus de nodulation.....42

Figure 11 :Rhizosphère du maïs *Zea mais*.....43

Figure 12 :Arbuste a fleurs de Rosa.....45

Figure 13: Diverses formulations de biofertilisants: liquide, poudre lyophilisée et à base de support.....50

Figure 14 :Sélection de la plante hôte *Rosa canina* L 56

Figure 15 : Prélèvement des différentes fractions de la rhizosphère de l'hôte....57

Figure 16: Application des disques.....62

Figure 17: Aspect macroscopique des souches isolées (a) :S1 ; (b) :S2 ; (c) :S3 ; (d) :S4 ; (e) :S5.....67

Figure 18: Aspect micromorphologique des souches isolées après vingt et un jours d'incubation.....68

Figure 19: Efficacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique (hydroxy-apatite) dans un milieu PVK.....70

Figure 20: Evolution de l'acidité (pH) du milieu en fonction de l'inoculum étudié. **72**

Figure 21: Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des isolats de la rhizosphère de Rosa.....75

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : phosphore commun (P) des minéraux trouvés dans les sols acides, neutres et calcaires (**Yadav et Verma, 2012**) 25

Tableau 2 : Quelques acides organiques produits par les PSB (**Kumar et al. 2016**.....29

Tableau 3: Avantages et inconvénients des différentes formulations de biofertilisant.....52.

Tableau 4: Réactifs chimiques, milieux de cultures utilisées durant l'expérimentation.....57

Tableau 5: Dénombrement de la microflore totale de la rhizosphère de la plante hôte.....65

Tableau 6: Caractères morphologique des isolats étudiés.....66

Tableau 7 : Aspect macroscopique des souches S1, S2, S3, S4, S5.....67

Tableau 8 : Caractères culturaux des isolats sur différents milieux de cultures.69

Tableau 9 : Caractères physiologique set biochimiques des souches testées.....70

Tableau *10* : Evolution de l'acidité (pH) du milieu en fonction de l'inoculum étudié.....72

Tableau 11 : Valeurs des indices de la variabilité du pH des isolats.....73

Tableau 12 : Valeurs des indices de la variabilité du pH des isolats... .....73.

Tableau 13 : Résultats des données des deux variables quantitatives ***Y (pH) = f [X (Φ)]...***.....74.

Tableau14 : Matrice de la distance euclidienne D^2 de ***Y (pH) = f [X (Φ)]:...***74

Table statistique de t 89

Liste d'abréviation

Abréviation et nomenclature

P : phosphore

Ca : Symbole chimique du calcium

AL : Symbole chimique du l'aluminium

Fe : Symbole chimique du fer

Po : Le phosphore organique

Pi : Le phosphore inorganique

ADP : Adénosine di phosphate

PSB : les bactéries solubilisant les phosphates

PSF : Les Champignons solubilisant les phosphates

PSM : Les Micro-organismes solubilisant les phosphates

MA : Mycorhizes arbusculaires

TCP : Le Tri calcium phosphore

H3PO4 : acide phosphorique

FePO 4 : ortho phosphate de fer

Al PO4 : phosphate d'aluminium

Ca3(PO4)2 : Phosphate de calcium

PGPR:bactéries promotrices de la croissance des bactéries

PVK :pikovskaya

ISP: International Streptomyces Project

Introduction

I. Introduction :

Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente souvent 70 à 90 % des **actinomycètes.** Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroit dans les sols submergés (**Goodfellow et williams, 1983**). Leur présence dans les sols est très importante en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries (Crawford, 1993), et à produire des substances prébiotiques et antibiotiques (**Kieser et *al*., 2000**). Le contenu de phosphore dans le sol vari de 0,02 à 0,5% cependant seule une très faible proportion des phosphates est disponible aux plantes, la majeure partie est complexée par l'aluminium, le calcium et le magnésium (**Kumar et *al*., 1999**). Il n'est pas requis en grandes quantités mais peut être un important facteur limitant de la croissance. Ce substrat est susceptible d'être solubilisé par l'action de microorganismes (**Arcand et Schneider, 2006**).

Les plantes absorbent le phosphore sous forme d'ions phosphate solubles $\mathbf{PO4^{-3}}$ ou $\mathbf{P_2O_5^{-2}}$. Ces ions proviennent du très lent lessivage des roches contenant du phosphate de calcium Ca3+ (PO4)2.

La présente étude a été réalisée, avec des objectifs de mettre en évidence la solubilisation du phosphate par les actinomycètes du genre Streptomyces et la sélection des souches les plus performantes.

Ce travail se divise en trois parties :

- **Une première partie** présente une revue bibliographique, dans laquelle nous allons décrire les bactéries telluriques, leur rôle dans le sol et leur interaction avec les plantes, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), leurs rôles écologique et les mécanismes d'interactions bénéfiques, le sol et ses différentes couches ainsi que la solubilisation du phosphate dans ce dernier.
- **Une deuxième partie** porte une description des techniques expérimentales utilisées dans ce travail.

- **Une troisième partie** traite les résultats obtenus au cours de cette expérimentation et leur interprétation. Enfin, une conclusion.

Généralités

II. Généralités

1. Le phosphore :

1.1. Le phosphore dans le sol :

Le phosphore, avec le l'azote et le potassium, fait partie des trois éléments nutritifs majeurs pour la croissance des végétaux .il est impliqué dans le premier stade de développement de la plante, joue un rôleprimordial de la croissance racinaire, dans la rigidité des tissus, ou encore dans la formation des inflorescences et des fruits .il est aussi essentiel dans la synthèse de matièrevivantevégétale qui permet aux plantes de se nourrir, et la résistance au froid et aux maladies.Malgré sa teneur relativement importante dans le sol, tout le phosphore n'est pas présent sous une forme biodisponible pour la racine (*).

Les composés minéraux de phosphore contiennent habituellement de l'aluminium (Al), du fer (Fe), du manganèse (Mn) et du calcium (Ca) en fonction de la nature du sol.Par exemple, le phosphore forme un complexe avec Al, Fe et Mn dans les sols acides, tandis que dans les sols alcalins, il réagit très fortement avec le Ca. Cependant, sous toutes les conditions, les différents types de complexes de phosphore dans le sol sont déterminés principalement par le pH du sol et par la nature et la concentration des minéraux contenus dans le sol **(Richardson, 1994).** Les minéraux de phosphore les plus connus sont représentés dans le tableau I.

Tableau 1 : phosphore commun (P) des minéraux trouvés dans les sols acides, neutres et calcaires (**Yadav et Verma, 2012**).

Type du sol	**Minéraux**	**Formule chimique**
Les sols acides	Strengite	Fe PO4.H2O
	Variscite	Al PO4.H2O

Les sols neutres et calcaires	Phosphate tricalcique	Ca3 (PO4)2
	Dicalcium phosphate	Ca H PO4
	Dicalcium phosphate dihydrate	Ca HPO4.2H2O
	Fluorapatite	Ca5 (PO4)3F
	Hydroxyapatite	Ca5 (PO4)3OH
	Phosphate octacalcique	Ca5 H(PO4)3 2-5 H2O

1.2. Cycle biogéochimique du phosphore :

Le phosphore (P), est un élément clé de la vie sur terre, est une ressource non renouvelable qui sera complètement épuisée d'ici 50 à 100 ans selon l'United States Geological Survey (USGS) (**Cordell et *al.* 2009**). Diffère des autres cycles biogéochimiques (azote, carbone, oxygène et eau) en ce qu'il n'inclut pas de composants gazeux importants et que le principal réservoir qui permet la reconstitution du phosphore est la croûte. En effet, la majeure partie du phosphore dans les solutionsdu sol provient de la décomposition des roches et des minéraux au fil du temps. (**Ricklefs et *al.*, 2005**). Les propriétés physicochimiques du phosphore dans la plupart des sols sont assez complexes, principalement en raison d'une série de réactions physiques, chimiques et biologiques telles que la dissolution, la précipitation, la rétention et l'oxydation/réduction (**Figure 01**).

Dans le sol, un cycle actif du phosphore peut être distingué. Ce cycle est très semblable à celui de l'azote et les micro-organismes jouent également un rôle important dans le processus de minéralisation et d'immobilisation. Généralement le phosphore retrouve dans le sol associé à des cations, à des oxydes hydroxydes métalliques. Certains se retrouveront rapidement en solution, d'autres migreront

plus lentement de la phase solide vers la solution et d'autres encore ne se solubiliseront qu'avec l'activité d'organismes vivants **(Beaudin, 2008**).

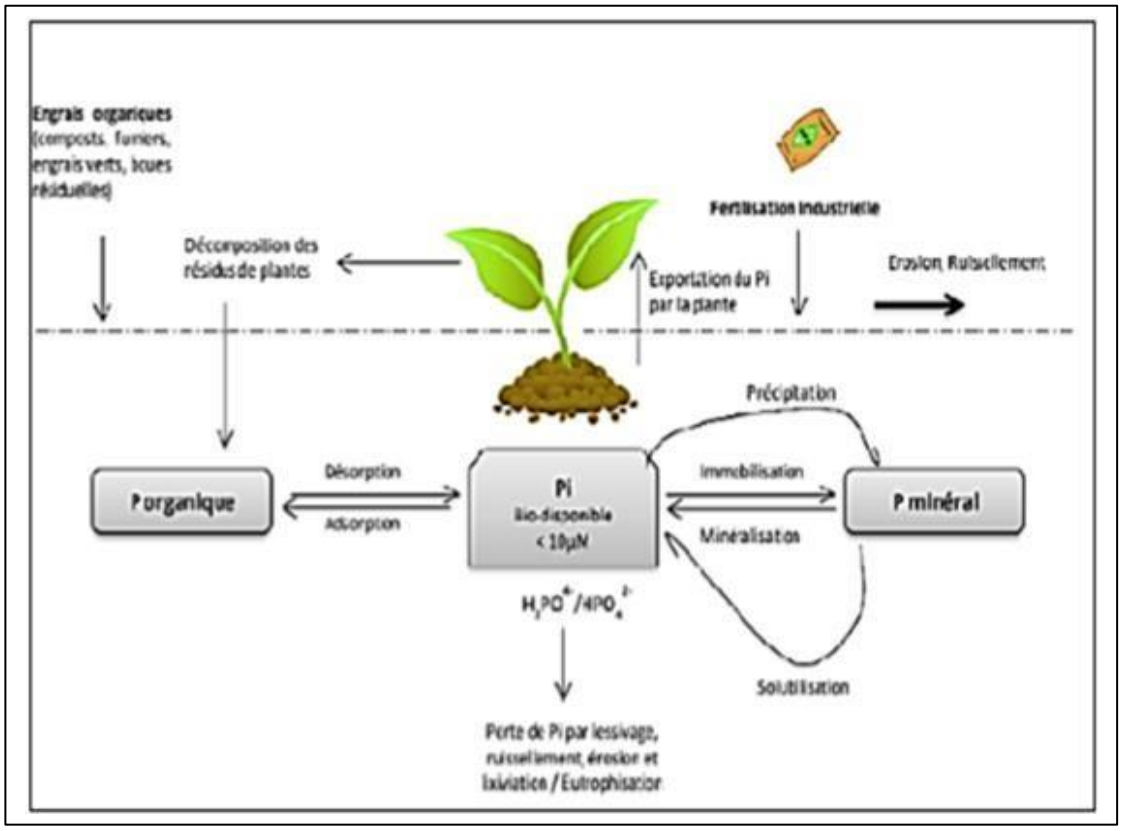


Fig 01 : Cycle de phosphore dans le système sol-plante-eau

1-3.Types des phosphores présents dans le sol :

Dans notre environnement, le phosphore se retrouve sous deux formes majeures :

a. phosphore organique (po) :

Il est en grande partie immobilise dans la matièreorganique, lesrésidus de décomposition, sous forme de mono esters ortho phosphates (jusqu'à 90% du phosphore organique) ou de (16 à 38% du phosphore organique)(*).

La forme organique (PO) du phosphore représenté de 30 à 60% du phosphore total du sol (**Harrison, 1987**).

b. phosphore inorganique (pi) :

Il est majoritairement complexe avec d'autres meneaux dans le sol : avec le fer (Fe) et aluminium (Al) en sol acide,avec le calcium (Ca)et le magnésium (Mg) en sol basique (*).

Le phosphore inorganique(PI) représenté généralement 35 à 70% du(P) total du sol (**Harrison ,1987).**

1.4. Solubilisation du phosphore inorganique :

a. Par les acides organiques :

Il est généralement connu que la libération d'acides organiques par les PSM (micro-organismes solubilisant le phosphate) a été rapportée comme mécanisme principal de solubilisation du phosphate inorganique. La quantité du P soluble libéré dépend de la force et du type d'acide organique produit (**Rodriguez et al, 1999**). Les acides organiques sont les produits des métabolismes microbiens, principalement par respiration oxydative ou par fermentation de sources comme le glucose (**Tableau II**). (**Kumar et *al.* 2016 ; Goswami et *al.* 2019)**.

- L'acide gluconique semble être l'agent le plus fréquent de la solubilisation du Pi. Il est considéré comme le principal acide organique produit par les PSB telles que *Pseudomonas sp*. *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* et *Burkholderia cepacia* (**Behera et *al.* 2014; Satyaprakash et *al.* 2017).**
- L'acide 2-cétogluconique est également produit par des souches PGPR telles que *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* et *Bacillus firmus* (**Kim et *al.* 2003**). Des souches de *Bacillus licheniformis* et *B. amylolichefaciens* produisent des mélanges d'acides lactiques, iso butyrique et acétique.

- D'autres acides organiques, tels que l'acide glycolique, oxalique, malonique, fumarique, tartrique, propionique et succinique, ont également été identifiés (**Kumar et *al.* 2016**).

Tableau 2: Quelques acides organiques produits par les PSB (**Kumar et al. 2016)**

Acide organique	**Bactérie productrice**	**Références**
Acide gluconique	*Pseudomonas fluoescens* *Pseudomonas cepacia* *Erwinia herbicola* *Berkholderia cepacia* *Enterobacter intermedium* *Bacillus spp.*	Oteino et *al.*, 2015 Babu-et *al.*, 1995 Liu et *al.*, 1992 Zhao et *al.*, 2014 Kim et *al.*, 2002 Saeid et *al.*, 2018
Acide 2-cétogluconique	*Rhizobium leguminosarum* *Rhizobium meliloti,* *Bacillus sp.* *Enterobacter intermedium*	Srishty et *al.*, 2019 Barman et *al.* 2019 Gull et *al.*, 2004 KIM et *al.,* 2003
Acide acétique	*Pseudomonas sp.* *Enterobactersp.*	Rfaki et *al.*, 2020
Acide citrique	*Pseudomonas sp.* *Serratia marcescens*	Rfaki et *al.*, 2020 Mohamed et *al.*, 2018
Acide lactique	*Bacillus sp.* *Bacillus amylolichefaciens*	Saeid et *al.*, 2018 Kim et *al.*, 2017
Acide propionique	*Bacillus megaterium*	Gull et *al.*, 2004 Chen et *al.*, 2006
Acide iso valérique	*Bacillus amylolichefaciens*	Kim et al., 2017
Acide iso butyrique	*Bacillus licheniformis,* *Bacillus amylolichefaciens*	Behera et *al.*, 2014

Une fois ces acides organiques produits, ils peuvent solubiliser le P par plusieurs actions possibles : chélation, acidification, concurrence pour les sites d'adsorption etc.

- **Acidification :**La production d'acides organiques diminue le pH et aide à la transformation des formes divalentes et trivalentes non assimilables du phosphate aux formes monovalentes assimilables (**Rodríguez et al, 1999 ; Khan et *al*. 2009 ; Kalayu, 2019).**
- **Chélation :** La chélation par définition est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate : « chélateur-cation (ou atome) ». Il est à noter que les acides organiques (acide humique, acide fulvique etc.) fonctionnent comme des chélateurs à travers leurs groupements hydroxyle (-OH) et carboxyle (-COOH). Ces groupements détachent les cations (Al+, Fe++, Ca++) qui sont liés au P, conduisant à la libération de formes assimilables du phosphate (**Kalayu, 2019 ; Prabhu et *al*. 2019**).

b. Par les acides inorganiques :

Les acides inorganiques tels que sulfurique, nitrique et carbonique peuvent également abaisser le pH et donc solubiliser le phosphate dans le sol. Certaines espèces bactériennes sont capables de le produire, mais leur efficacité et leur contribution à la libération de P assimilable dans les sols semblent faibles et moins efficaces (**Kumar et *al*.2016).**

1.5. Minéralisation du phosphore organique :

Le phosphore organique peut constituer de 4 à 90 % du phosphore total du sol et son effet de solubilisation est aussi appelé : minéralisation. La dégradabilité des composés organique du (P) dépend principalement du potentiel physico-chimique et biochimique du sol. A titre d'exemple, les acides nucléiques, les phospholipides, et les phosphates de sucre se décomposent facilement Cependant, l'acide physique, les polyphosphates et les phosphonates se décomposent plus lentement (**Rodríguez et *al*, 1999 ; Maharajan et *al*. 2018**). Selon **Behera et *al*. (2014)**, le (P) peut être libéré des composés organiques du sol par trois groupes d'enzymes :

- **Les Phosphatases (phosphohydrolases)** : qui effectuent la déphosphorylation des liaisons phosphoester ou phosphoanhydride liés aux matières organiques. D'après **Khan et al ,2009** de nombreux PSB tels que *Emericella rugulosa, Serratia marcenscens, Chaetomium globosum, Pseudomonas fluorescens, Proteus mirabilis, Burkholderia cepacia, Enterobacter aerogenes et Citrobacter freundi* ont développé une enzyme libératrice du Pi à partir des complexes organophosphorés, cette enzyme est appelée phosphatase. En fonction de leurs pH optimaux d'activité, ces enzymes sont classées en phosphatases alcalines (pH> 7) ou acides (pH <6). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du phosphate à partir de nombreuses macromolécules (alcools primaires, secondaires et cycliques, phénols et amines). (**Figure 02**).
- **Les phytases :** qui provoquent spécifiquement la libération de P de l'acide phytique. Les phytases des PSB permettent la libération du(P) assimilable à partir des phytates, principales formes organiques du (P) dans le sol (**Behera et *al.* 2014 ; Satyaprakash et *al.* 2017;Billah et *al.* 2019**)(**Figure 02**).
- **Les phosphonatases et le C–P lyases** : enzymes qui effectuent le clivage de la liaison C–P dans les organophosphonates.

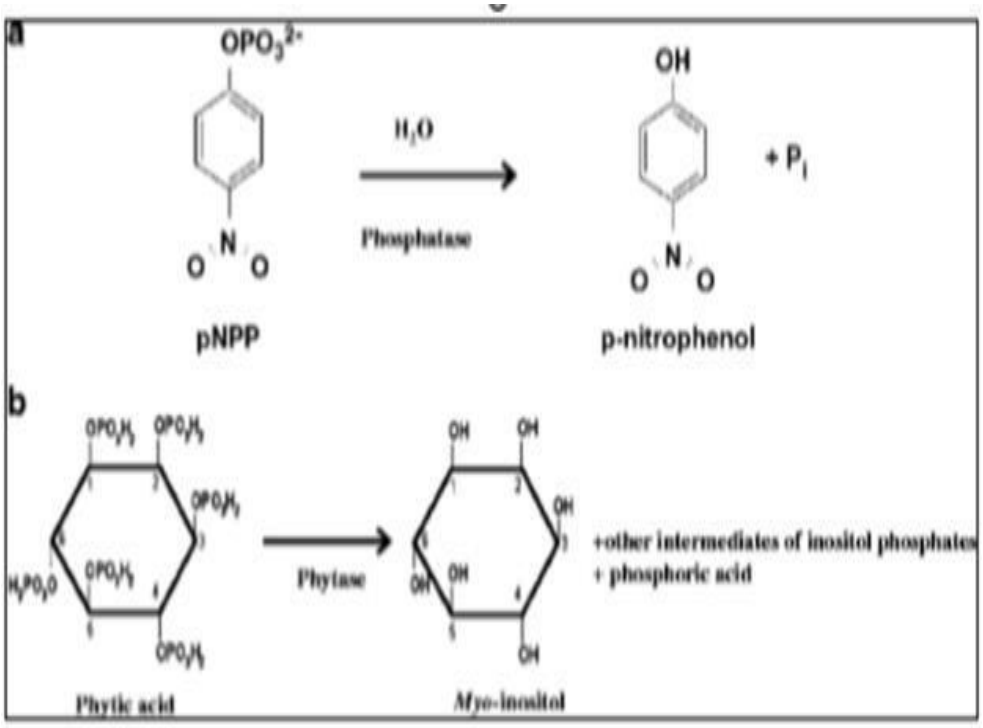


Fig 02 : Réaction catalysée par la phosphatase sur le p-nitrophényl phosphat

1.6. Intérêts du phosphore pour les plantes :

Le phosphore est considéré comme un élément essentiel de la vie végétale et animale. C'est un élément largement répandu dans la nature avec l'azote et le potassium (**Qureshi et *al.* 2012**). Des concentrations plus ou moins élevées de phosphore se retrouvent dans tous les tissus des végétaux selon l'organe végétatif considéré. Il rentre dans la composition des nucléotides (ADP) et participe à l'échange d'énergie cellulaire principalement par des réactions de phosphorylation. (**Dutil, 1976**).

Le phosphore affecte particulièrement la croissance des racines. Il augmente la surface racinaire, ainsi l'absorption des nutriments du sol. Par rapport à la disponibilité des engrais azotés et potassiques, les engrais phosphatés favorisent la résistance des plantes au froid en augmentant la concentration des engrais phosphatés (**Gervy, 1970**). Le phosphore a aussi une importance dans les étapes de prolifération cellulaire et de formation des sucres comme lors du développement des tissus cellulosiques des céréales, les rend plus résistantes à la verse physiologique (**Gervy, 1970**).

Le phosphore est le deuxième facteur le plus important limitant la croissance végétative des plantes après l'azote (**khan et *al.* 2009**). Il a un rôle important dans deux étapes de la photosynthèse, étape photochimique et métabolique (**Plaxton et *al*, 2011**). Au-delà de son rôle dans des processus de transfert, le phosphate est un composant structural des phospholipides, acides nucléiques, nucléotides, coenzymes, et phosphoprotéines (**Barker et *al*, 2007**).

Le phosphore est un macroélément essentiel qui joue un rôle capital dans le transfert d'énergie, la régulation métabolique et l'activation des protéines. (**Priya et *al*, 2009**).

2. Les micro-organismes et le phosphore :

2. 1.Micro-organismes solubilisant le phosphore :

Un grand nombre de microorganismes autotrophes et hétérotrophes du sol ont la capacité de solubiliser les phosphates. Les PSM sont présents dans presque tous les

sols, bien que leur nombre varie en fonction du sol et des conditions climatiques (**Kucey et *al.* 1989**).

Pour la première fois en 1903, la solubilisation du phosphate tricalcique (TCP) a été démontrée par des bactéries du sol en milieu liquide et en milieu solide (Singh, 2011). Cependant, l'étendue de la solubilisation varie selon la source de phosphore inorganique et les micro-organismes impliqués (**Singh, 2011**).

Les champignons et les bactéries solubilisant le phosphate (PSM) sont connus comme des organismes efficaces pour la solubilisation du phosphate (**Reyes et *al* ,1999)**. Ainsi, les PSM provoquent la libération de nutriments dans le sol dans des proportions naturellement équilibrées et exercent des effets bénéfiques sur le développement des plantes (**Glick, 1995**).

Les micro-organismes solubilisant le phosphate (MSP) ont été considérés comme les meilleurs moyens écologiques pour la nutrition des cultures par le phosphate. Bien que, plusieurs bactéries (*Pseudomonas* et *Bacillus*) et des souches fongiques (*Aspergillus* et *Penicillium*) ont été identifiés comme des MSP mais leurs performances dans des conditions in situ n'est pas fiable et doit être améliorées soit en utilisant des souches génétiquement modifiées ou des techniques de Co inoculation (Sharma et al. 2013). Les bactéries solubilisant les phosphates (PSB) constituent (1 à 50 %) et les champignons (0,5 à 0,1 %) de la population totale respective (**Singh, 2011).**

En général, les isolats fongiques présentent une plus grande capacité de (P) solubilisation par rapport aux bactéries dans les milieux liquides et solides (**Singh, 2011**).Les champignons sont capables de pénétrer profondément dans le sol plus facilement que les bactéries et peuvent donc jouer un rôle plus important dans la solubilisation du phosphore dans les sols (**Kucey, 1983**).De plus, il a également été rapporté que les actinomycètes *Micromonospora*, *Nocardia* et *Streptomyces* solubilisent les phosphates. Des levures telles que Torula sp qui n'est généralement pas présent dans les sols a également été isolé du compost et caractérisé pour la solubilisation du TCP. (**Singh et *al.* 1980**).

2.1. 1.Bactéries solubilisant les phosphates :

Une vaste gamme de bactéries du sol, y compris les actinomycètes aérobies et anaérobies, sont capables de solubiliser diverses formes de composés de phosphate inorganique insolubles, tels que le TCP, le phosphate dicalcique, l'hydroxyapatite et le phosphore de roche (**Sulbaran et *al.* 2009 ; Singh, 2011).**

Les principaux genres impliqués dans la solubilisation des phosphates minéraux sont : *Pseudomonas , Bacillus , Rhizobium , Burkholderia , Achromobacter , Agrobacterium, Erwia, Micrococus aerobacter , Flavobacterium alcaligenes , Escherichia , Serratia* et *Xanthosomas sp.* . (**Farhat et *al.* 2009, Singh, 2011**).

La plupart des PSB ont été isolés de la rhizosphère de diverses plantes et sont connus pour être métaboliquement plus actifs que ceux isolés de sources autres que la rhizosphère (**Vazquez et *al.* 2000 ; Singh, 2011**). La capacité de solubilisation du phosphore chez les bactéries est généralement réduite ou perdue lors de sous-cultures répétées, mais aucune perte de ce type n'a été observée dans le cas de la PSF (**Kucey, 1983**). Tandis que lacapacité de solubilisation de Phosphore du PSB est affectée par de nombreux facteurs physiologiques, dont la source de C et N dans le milieu, la source minérale, le pH, la température d'incubation, l'aération et la période d'incubation.(**Taiwo et *al.* 2008,Singh, 2011**).

La population de PSB dépend principalement de différentes propriétés du sol telles que les propriétés physiques et chimiques, la matière organique et la teneur en P (**Kim et *al.* 1998**).Les Souches de *Pseudomonas* sp. sont capables de libérer 162 µg/ml de phosphate inorganique dans le milieu contenant du TCP. (**Santhi, 1998**). Les souches de *Bacillus sp*. connus pour leurs capacités de solubilisation des phosphates minéraux sont : *B. polymyxa , B. subtilis , B. brevis , B. circulans , B. megaterium , B. mesentricus , B. mycoides , B. pulvifaciens* (**Swain et *al.* 2009 ; Singh, 2011).**



Fig 03 : *Agrobacterium* colonisant les racines de *Carya illinoensis*.

2.1.2. Champignons solubilisant les phosphates :

On a également signalé qu'un grand nombre de champignons solubilisent les formes insolubles de phosphore. Ceux-ci incluent *Aspergillus, Candida, Penicillium Cladosporium* et *Paecilomyces, Rhizopus,* (**Sheshadari et *al.* 2000**). Ces PSF sont bien connus pour leur capacité à solubiliser les phosphates minéraux en raison de leur capacité à produire des acides organiques (**Khan et *al.* 2010**), et notamment certaines espèces d' Aspergillus et Penicillium ont été testées par inoculation directe dans le sol afin de solubiliser la phosphore de roche (**Vassilev et *al.* 1997 ; Singh, 2011**). L'inoculation de PSF et de champignons mycorhiziens améliore également les propriétés physico-chimiques, biochimiques et biologiques du sol amendé en phosphore de roche. (**Caravaca et *al.* 2004 ; Singh, 2011**).



Fig 04: CMA de *Rhizopus* colonisant des racines de maïs avec des hyphes, des arbuscules et des vésicules.

2.1.3. Les actinomycètes :

Comme PSM présentent un intérêt particulier car ces bactéries sporulantes filamenteuses à Gram positif peuvent prospérer dans des environnements extrêmes (**Pathom-Aree et *al.* 2006**) et produisent également diverses substances favorisant la croissance des plantes (**Jain et *al.* 2007**). De nombreux chercheurs ont isolé des souches d'actinomycètes capables de solubiliser les phosphates. (**Hamdali et *al.* 2008 ; Singh, 2011**).



Fig 05 : *Frankia* colinisant les racines de Sorgho.

2.1.4. La culture complexe (Bactérie – Mycète) :

Beaucoup de chercheurs ont utilisés des cultures complexes de bactéries et de champignons pour améliorer la solubilité du phosphore, mais l'efficacité de tels inoculant mixtes dépend de la compatibilité entre les micro-organismes. Ils ont trouvé que l'inoculation de *P. striata* et d'*Aspergillus awamori* solubilisait ensemble plus de phosphates que la double inoculation de *B. polymyxa* et d'*A awamori* (**Kundu et *al.* 1981**).

2.1.5. Mécanismes de la solubilisation du phosphore par les micro-organismes :

Les PSB sont capables de dissoudre le phosphore organique ou inorganique en utilisant plusieurs mécanismes : abaisser le pH du sol en produisant des acides organiques, en libérant des protons et en produisant une minéralisation phosphatase acide (**figure 06**) (**Prabhu et al. 2019**).

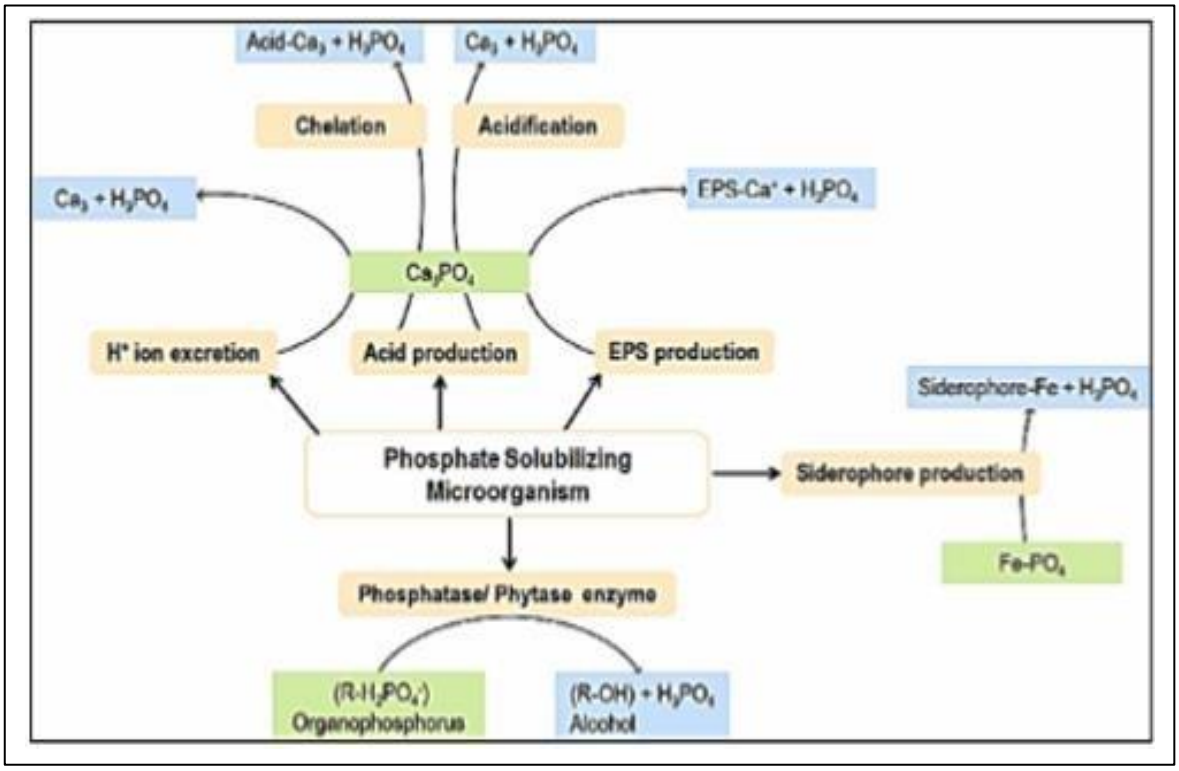


Fig 06 : Mécanismes de solubilisation des phosphates inorganiques par les micro-organismes.

3 . Rôles écologiques des micro-organismes solubilisant le phosphate

3.1. Micro-organismes biofertilisant :

Les biofertilisants peuvent être définis comme des produits qui contiennent des micro-organismes vivants lorsqu'elles sont appliquées aux semences ou à la surface des plantes ou le sol, ils colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante capable de promouvoir la croissance des plantes en augmentant l'offre ou la disponibilité des éléments nutritifs primaires à la plante hôte (**Vessey, 2003**).

Selon **Mishra et *al* (2013)**, un biofertilisant est un mélange de cellules latentes favorisant la fixation d'azote, la solubilisation de phosphate et la solubilisation de

silicate, des études antérieures montrent qu'un biofertilisant préparé en combinant PGPR avec composts pourrait accroître les effets favorisant la croissance et la biocontrôle des plantes (**Chen et *al.*, 2011**). Des espèces comme le *Pseudomonas* (**Leonardo et *al.*, 2006**) et *Bacillus* (**Gong et *al.*, 2006**), élaborent des substances qui ne sont pas encore bien définies soit comme des phytohormones soit comme des régulateurs de croissance permettant aux cultures d'avoir plus de racines fines augmentant ainsi la surface d'absorption chez les plantes. Ces PGPR sont désignés comme des biostimulants et les phytohormones qu'ils produisent comprennent : AIA, les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène (**Agritech, 2014**).

Ces bactéries sont actuellement commercialisées sous forme d'inoculum. Elles semblent promouvoir la croissance des cultures par plusieurs mécanismes qui sont comme suit : suppression des maladies des plantes (par des bio-protecteurs), l'amélioration de l'acquisition des éléments nutritifs (biofertilisants), ou la production de phytohormones (appelées biostimulants) (**Agritech, 2014**).

Les biofertilisants à base de PGPR fournissent un rôle bénéfique dans la création d'une bonne rhizosphère pour la croissance des plantes et la conversion des éléments importants sur le plan nutritionnel grâce à des procédés biologiques, par exemple en augmentant la disponibilité de N, P, K (**Francis et *al.*, 2010 ; Waddington., 1998**).La haute disponibilité de N, P et K pourrait améliorer la fertilité des sols, améliorer antagoniste et l'effet biocontrôle, et d'étendre les micro-organismes de taux de survie dans le sol (**Yang et *al.*, 2011**).

3.2. Les mycorhizes :

Les champignons mycorhizes arbusculaires (MA) sont connus pour améliorer la nutrition en (P) des plantes, en particulier dans les sols déficients en P, en piégeant le P disponible en raison de la grande surface de leurs hyphes et de leurs mécanismes d'absorption de P à haute affinité (**Moose, 1980 ; Singh, 2011**).

Une mycorhize, c'est une association symbiotique entre une plante (arbre ,arbuste, plante herbacée, vivace ou annuelle, à fleurs ou non ,sauvage ou cultivée ,en pot ou en plein terre) et un champignon ,susceptible de persister durant plusieurs années-là mot 'symbiotique 'a toute son importance :grabeaux mycorhizes ,la plante hôte et le champignon mycorhizien se rendent mutuellement service .la symbiose ;est en effet

relation de type ‘gagnant -gagnant’,contrairement au parasitisme (**Clémentine, 2014**).

Il existe différents types de mycorhizes en fonction de la pénétration du mycélium dans le système racinaire ; endomycorhizes lorsque le mycélium pénètre entre les cellule du cortex racinaire et endomycorhizes lorsque celui-ci pénètre a l’intérieure des cellules racinaires (**figure 07).**

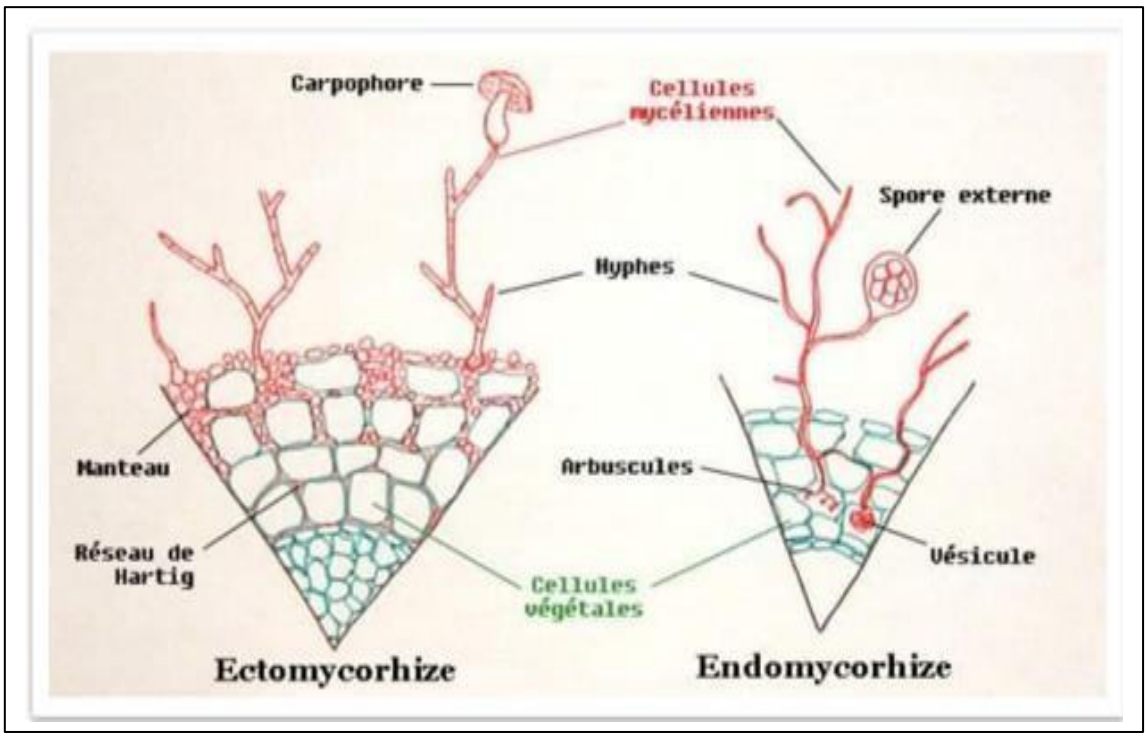


Fig 07 : Coupe de mycorhize schématisant la pénétration du champignon dans la racine.

3.3. Impact de l'interaction plantes microorganismes :

3.3.1. Interaction non symbiotique :

L'interface entre le sol et les racines est un habitat très dynamique. Dans le sol environnant, la croissance et la prolifération microbienne sont limitées par les déficits en carbone et en énergie. D'autre part, les nutriments organiques sont continuellement libérés dans la rhizosphère, stimulant l'activité et la reproduction des micro-organismes. Le développement des communautés de la rhizosphère a de multiples effets directs et indirects sur la production de biomasse végétale. De nombreuses bactéries qui colonisent la rhizosphère produisent des composés organiques qui favorisent le développement des racines des plantes. Ils sont responsables de la récupération et de la solubilisation des éléments minéraux (azote, phosphore, calcium), la synthèse des vitamines, des acides aminés, des auxines ou d'autres substances qui inhibent les agents pathogènes des plantes qui stimulent la croissance des plantes. Les effets indirects sont les effets de la communauté microbienne de la rhizosphère sur la structure du sol. En effet, les micro-organismes produisent des polysaccharides qui lient les particules minérales du sol en agrégats. Améliorer la structure du sol en augmentant l'agrégation, améliorant ainsi l'aération du sol, l'infiltration de l'eau et pénétration des racines (**Figure 08**). (**Djigal, 2003**).

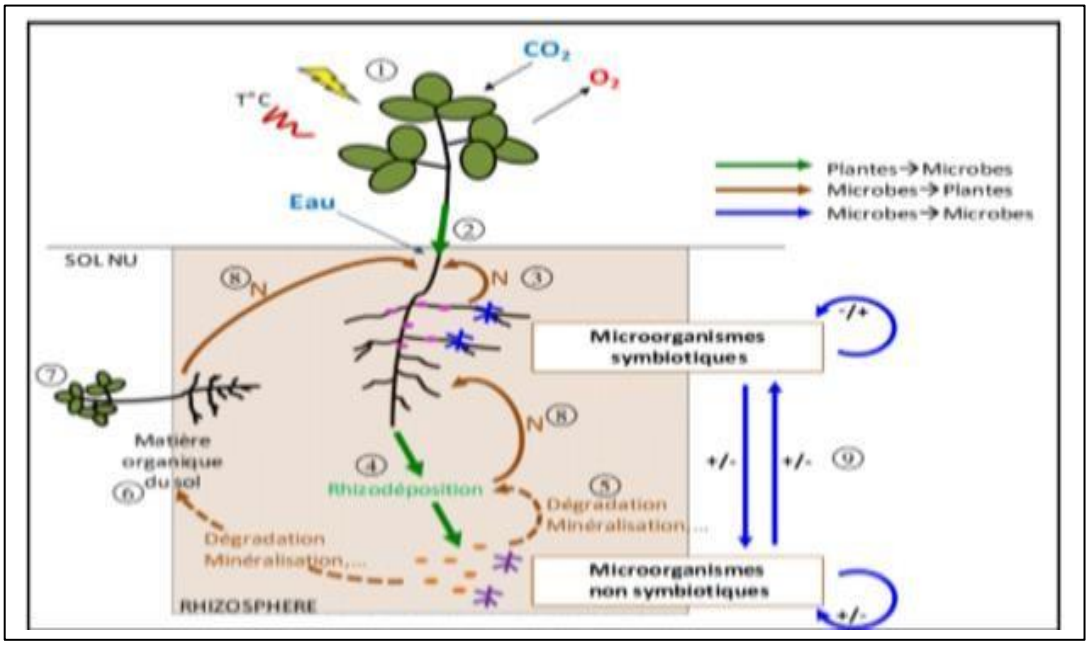


Fig 08 : Interaction non symbiotique plante-microorganisme.

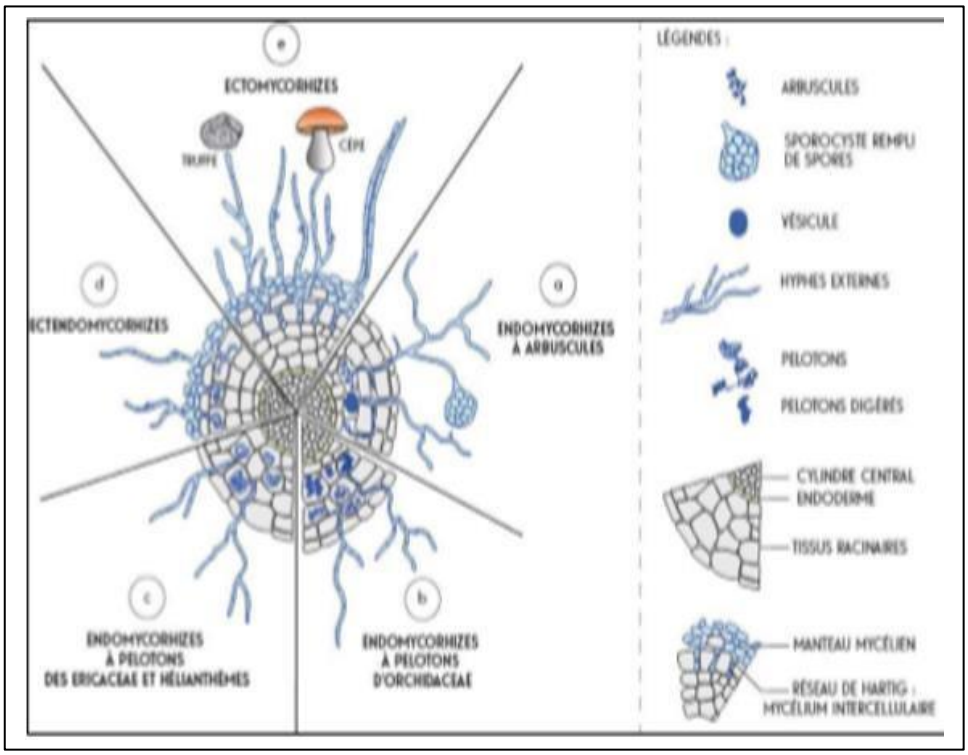
3.3.2. Interactions symbiotiques :

En plus des interactions avec les micro-organismes de la rhizosphère, les racines des plantes établissent également des relations symbiotiques spécifiques avec certains microbes du sol. Les deux principaux types d'associations qui peuvent exister sont les associations mycorhiziennes et la symbiose fixatrice d'azote (**Djigal, 2003**).

a. Symbioses mycorhiziennes :

Les mycorhizes sont des associations bénéfiques entre les racines des végétaux et les filaments mycéliens des champignons supérieurs (**figure 09**) (**Djigal, 2003**). Les fonctions mycorhiziennes sont essentielles dans tout ou partie du cycle de la plante hôte, notamment mais pas exclusivement la nutrition. Ils favorisent l'absorption des éléments minéraux mycorhiziens par les racines, améliorant ainsi la nutrition de la plupart des espèces végétales. En retour, les plantes fournissent le carbone nécessaire ; elles ne peuvent pas absorber la lumière du soleil (sous forme de sucres produits par la photosynthèse) à leurs partenaires fongiques hétérotrophes et grâce à cette relation symbiotique, chaque partenaire peut optimiser son développement (**Fortin et *al.* 2016**).

Fig



09 : Morphologie de la symbiose mycorhizienne.

b. Symbioses fixatrices d'azote :

Deux groupes de bactéries ont été identifiés comme fixateurs d'azote associés aux plantes supérieures. Ce sont des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* et *Frankie* (**Djigal, 2003**). Ce sont des associations spécifiques, puisqu'elles impliquent un système de reconnaissance mutuelle entre les deux partenaires. La plante exsude dans le milieu des flavonoïdes qui activent les gènes de la nodulation des bactéries provoquant la synthèse d'une molécule signale, cette dernière déclenche chez la plante des processus qui permettent la pénétration des bactéries dans la racine et la formation de nodules (**figure 10**). Les symbioses fixatrices de l'azote sont extrêmement importantes dans le maintien de la fertilité de sol, elles sont utilisées dans les pratiques agricoles pour augmenter les rendements des cultures (**Djigal, 2003**).

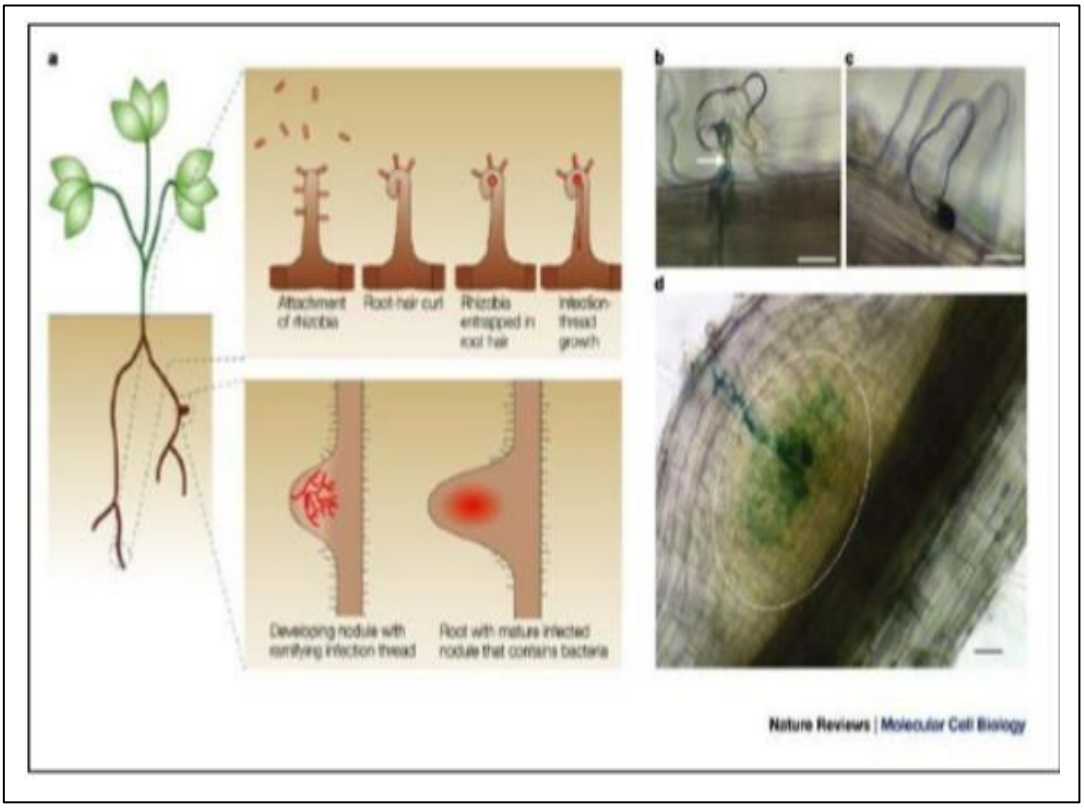


Fig 10 : Processus de nodulation.

3.4. La rhizosphère :

La rhizosphère est la zone du sol située près des racines et caractérisée par une activité microbiologique intense. C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantité limitée (**Gholami et *al.*, 2012**).

C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population microbienne (**Miransari, 2011**). Cette population originaire des grains et du sol environnant (**Miethling et *al.*, 2000**) est habituellement distribuée à une distance de 0,5 a l m des racines de la plante, dont une concentration de plus de 109 à 1012 microorganismes par gramme de (**Miransari, 2011**).

Plus précisément, la rhizosphère est divisée en trois grandes composantes qui interagissent ensemble : la rhizosphère sol, la rhizoplane et les racines (**Barea et *al.*, 2005**). La rhizosphère sol est la zone du sol influencée par les racines due à la libération de substrats qui influence l'activité microbiologique (**Barea et *al.*, 2005**). Ainsi, durant leur croissance, les racines libèrent activement ou passivement une gamme de composés organiques, surtout des hydrates de carbone (**Chaboud, 1983**).

La microflore du sol est composée de différents types des microorganismes tels plusieurs genres bactériens fixateurs d'azote et des mycorhizes. Ceux-ci peuvent jouer un rôle de stimulation de croissance par l'apport d'éléments nutritifs et de protection des pathogènes environnants (**Amarger, 2002**).



Fig 11 : Rhizosphère du maïs *Zea mais*.

4. Rosacées / Rosaceae

4.1. Définition:

Les Rosaceae sont une famille importante tant par le nombre d'espèces que par la diversité végétative et florale de ses représentants. Les fruits sont aussi très variés. C'est une famille que l'on peut définir comme le type moyen des Magnoliidae, et qui fournit un autre exemple de famille par enchaînement. C'est aussi une famille très importante pour l'homme, elle fournit notamment un très grande nombre de fruits consommés dans l'hémisphère nord **(Guellier, 2021).**

4.2. Distribution geographique:

Les Rosaceae sont une famille quasi-cosmopolite , mais, contrairement à ce que l'on observe dans presque toutes les grandes familles, elles sont mieux représentées dans l'hémisphère boréal que dans la zone intertropicale ou dans l'hémisphère austral. C'est de diverses régions de l'hémisphère boréal et, surtout, de l'Eurasie que sont originaires les Rosaceae les plus utiles à l'homme.

4.3. Appareil végétatif:

Les formes végétatives des membres de la famille sont extrêmement variées : on observe des arbres persistants ou caducs (*Pyrus*, *Prunus*, *Malus*, *Sorbus*, etc.), des arbustes (*Spiraea*), parfois sarmenteux (*Rosa*, *Rubus*), des herbes vivaces (*Geum*), parfois stolonifères (*Fragaria*), plus rarement des annuelles (quelques *Alchemilla*) : soit la série complète des types biologiques, depuis les arbres de première grandeur jusqu'aux petites herbes éphémères.
Les membres ligneux de la famille ont fréquemment une reproduction asexuée : elle se fait grâce à des drageons, comme chez *Rubus*, ou grâce à des stolons (*Fragaria*). Souvent, des poils épidermiques, massifs et lignifiés, sont transformés en aiguillons crochus et piquants (*Rosa*, *Rubus*). Cette nature épidermique est facilement vérifiable : les aiguillons se détachent facilement de la tige, en entraînant avec eux des lambeaux de l'épiderme.

Les feuilles sont toujours alternes, très exceptionnellement opposées (*Rhodotypos*), et stipulées. Primitivement, elles sont composées, imparipennées avec des folioles

dentées, parfois alternativement grandes et petites (*Agrimonia*…). Puis, deux évolutions sont possibles : confluence des folioles entre elles, ce qui s'observe bien chez les sorbiers (*Sorbus*), où l'on assiste à cette transformation d'espèce en espèce, parfois même au sein d'une même espèce ; ou réduction à trois folioles (*Fragaria*) ou même à une seule (*Prunus*…). Par sur-évolution, des folioles de troisième et quatrième ordre peuvent naître sur les deux folioles latérales, conduisant à une disposition digitée (*Potentilla*) qui peut d'ailleurs devenir ultérieurement gamofoliée (*Alchemilla*) **(Guellier, 2021)**.

4.4. Rosier (Rosa):

Le rosier (*Rosa*) regroupe des arbustes vivaces buissonnants ou sarmenteux, généralement aux feuillages caducs, souvent aux tiges épineuses, avec des fleurs, les roses, communément parfumées, parfois remontantes. Il bénéficie d'une très bonne rusticité, de façon générale (-20 à -30°C). Le rosier a été importé de l'Orient mais pousse aujourd'hui en Europe, Asie, Afrique du Nord, Amérique du Nord, et il fait l'objet d'une multitude de croisements, pour la création de cultivars par milliers. Les Français sont parmi les plus grands créateurs de nouvelles variétés de rose.



Fig 12 : Arbuste a fleurs de Rosa.

4.5. Classification et critères de culture (Guellier, 2021) :

- **Regne** : Plantae
- **Classe** : Angiospermes
- **Sous classe** : Rosids
- **Ordre** : Rosales
- **Famille :** Rosaceae
- **Genre :** *Rosa*
- **Espèce :** *Rosa damascena*
- **Type :** arbuste à fleurs
- **Origine :** Asie
- **Couleur de la fleur :** rouge, rose, blanc, orange, saumon, jaune…
- **Semis :** non
- **Bouture :** oui
- **Plantation :** octobre à avril
- **Floraison :** printemps jusqu'à l'automne
- **Hauteur :** de 0,25m (rosier miniature) jusqu'à 10 mètres (rosier liane)

5. Biotechnologie des micro-organismes solubilisant le phosphate :

5. 1. Place des micro-organismes du sol en biotechnologie :

Ces dernières années, l'utilisation d'additifs organiques, de métabolites naturels actifs ou de micro-organismes utiles fait l'objet de discussions en tant que stratégie écologique pour une production végétale plus durable. On observe dans le monde entier un intérêt croissant pour les inoculants microbiens et l'utilisation ciblée de leurs interactions avec les plantes. Les micro-organismes utiles peuvent en effet favoriser la croissance des végétaux en augmentant leur tolérance aux conditions défavorables du sol et de l'environnement ou en améliorant leur capacité de stockage de nutriments. Toutefois, le développement d'inoculants microbiens spécifiques, appelés biofertilisants, dotés d'effets bénéfiques s'avère très difficile. L'un des défis en particulier est l'adéquation entre applications agricoles et diverses conditions environnementales. Certains biofertilisants commercialisés actuellement sont de mauvaise qualité ou leur application est compliquée. Autant d'inconvénients qui entraînent une perte de confiance des agriculteurs et des agricultrices. Néanmoins, l'amélioration de la qualité des formulations microbiennes et les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes biologiques ont contribué à accroître progressivement la rentabilité des applications au champ.

5.1.1. Biotechnologie des biofertilisant:

La révolution verte du XXe siècle a permis une forte hausse de la production alimentaire mondiale. Celle-ci a été principalement marquée par deux évolutions: l'utilisation de produits chimiques (par exemple pesticides, engrais chimiques) et l'amélioration des cultures à l'aide de la sélection ciblée et de la modification génétique. Cependant, les résultats obtenus avec les produits phytosanitaires chimiques sont associés à des coûts environnementaux élevés. Depuis plusieurs années, les appels se font de plusen plus pressants en faveur de la diminution de l'utilisation de produits chimiques dans l'agriculture et du développement de systèmes agro-alimentaires plus durables, tant du point de vue environnemental que de la santé humaine. L'utilisation d'intrants microbiens et la promotion des communautés microbiennes en tant que méthode naturelle à faible impact environnemental constituent une approche prometteuse pour atteindre ces objectifs (**Backer et *al.*, 2018**)

Les micro-organismes du sol sont les organismes les plus nombreux sur Terre: il y a plus de microbes dans une cuillère à café de sol que d'habitants dans le monde. Selon le type d'écosystème, le sol peut renfermer jusqu'à 500 g de bactéries, 500 g d'actinomycètes et 1,5 kg de champignons par mètre carré jusqu'à une profondeur de 15 cm. Certains d'entre eux sont essentiels à la décomposition des matières organiques et au recyclage des nutriments, tandis que d'autres interagissent avec les racines des plantes et leur apportent des nutriments importants. Ce potentiel a été reconnu, débouchant sur leur exploitation à des fins commerciales. L'agriculture intensive réduit la densité et l'activité microbiologique du sol. L'utilisation de substances contenant des micro-organismes peut potentiellement contribuer à restaurer les populations microbiennes. Le recours à des micro-organismes vivants ne date pas d'hier, puisqu'il a été pratiqué dès le début de XXe siècle avec l'inoculation à grande échelle de rhizobia de légumineuses qui sont des fixateurs d'azote. Récemment, *Bacillus, Pseudomonas, Glomus, Azotobacter, Trichoderma* et d'autres souches ont été commercialisées et largement étudiées et décrites en raison de leur capacité à accroître la production végétale. Au cours de la dernière décennie, le marché mondial des biofertilisants a connu une croissance constante. En 2019, il était estimé à 1 milliard de dollars et devrait atteindre un taux de croissance annuel moyen de 12,8 % entre 2020 et 2027 (**Desbrosses et *al.*, 2011**) .

5.1.2. Solubilisateurs de phosphore:

Les engrais phosphatés sont les produits agrochimiques les plus utilisés après les engrais azotés (**Smil , 2000**). Dans le sol, la solubilisation du phosphore est principalement assurée par les bactéries solubilisatrices de phosphore (BSP) et, dans une moindre mesure, par des champignons solubilisateurs de phosphore (CSP) (**Khan et *al.*, 2009**). On estime que 20 à 25 % des besoins en phosphore des plantes sont satisfaits par des bactéries et des champignons. Les bactéries du sol *Pseudomonas putida* et *Bacillus megaterium* ont été particulièrement bien étudiées. Les types de champignons les plus connus sont *Aspergillus, Penicillium* et *Trichoderma*. Certains actinomycètes sont également connus pour leur activité de solubilisation du phosphore et sont de plus en plus prisés du fait de leur capacité à survivre dans des environnements extremes (**Kumar et *al.*, 2018**).

Les CMA ont une efficacité optimale lorsque le sol a une faible teneur en carbone organique et en phosphore assimilable par les plantes (10 à 25 kg de P/ha).

Les micro-organismes solubilisateurs de phosphore sont particulièrement efficaces en cas de faibles teneurs en carbone organique, mais de teneurs en phosphore assimilable par les plantes légèrement plus élevées dans le sol (25 à 35 kg P/ha).

5.1.3. Consortia microbiens:

Les associations de souches microbiennes telles que les rhizobactéries avec des champignons, appelées consortia microbiens, représentent une approche très prometteuse dans le cadre du développement de biofertilisants pour une agriculture durable (**Woo et *al.*, 2018**). En raison de leurs propriétés complémentaires, les consortia microbiens sont potentiellement multifonctionnels. On estime également que les produits contenant des consortia microbiens pourraient mieux survivre dans des environnements différents que les produits contenant une seule souche. Cet effet est dû au fait que les micro-organismes se stimulent mutuellement par la communication et la différenciation (**Brenner et *al.*, 2008**). Des études ont montré qu'ils améliorent efficacement la croissance et la performance des plantes soumises aux stress abiotiques (température extrême, pH, salinité, sécheresse, métaux lourds et pollution par des pesticides). Les produits connus dans cette catégorie sont les

micro-organismes efficaces (ME) qui jouissent d'une large part de marché. Cependant, plusieurs études ont montré que les effets observés des EM ne sont pas dus aux micro-organismes vivants eux-mêmes. Ce sont en réalité les nutriments dans le substrat contenant les micro-organismes qui favorisent la croissance des plantes (**Schenck et *al.*, 2009**).

5.1.4. Utilisation pour la restauration:

Un autre domaine qui bénéficie dans une large mesure de l'utilisation des biofertilisants, en particulier des CMA, est la restauration des écosystèmes. Les activités humaines comme la coupe rase, l`agriculture intensive et l'exploitation minière, mais aussi les facteurs naturels tels que les incendies ou les processus géomorphologiques, affectent la stabilité des écosystèmes naturels. Cela peut conduire à une détérioration de la fertilité du sol et limiter fortement le développement naturel de la végétation. Plusieurs études ont démontré l'utilisation réussie des CMA pour la restauration de la couverture végétale des sols désertifiés dans la région méditerranéenne et pour la restauration des sols dégradés par l'exploitation minière (**Wang, 2017**).

5.1.5. Domaines d'application:

Utilisation en horticulture Les biofertilisants sont fréquemment utilisés en horticulture pour les raisons suivantes(**Colla et Rouphael., 2019**):

• production de cultures de qualité supérieure et à haut rendement,
• utilisation de substrats de croissance exempts de micro-organismes appropriés,
• conditions environnementales contrôlables (par opposition à la culture en plein champ),

• possibilité d'application simplifiée grâce à l'irrigation,
• cultures hautement spécialisées et application de méthodes horticoles intensives, qui entraînent une perte de fertilité des sols.

5.1.6. Formulations pour biofertilisants :

Les premières étapes fondamentales pour le développement d'un nouvel inoculant microbien sont l'isolement en laboratoire et la sélection sur la base des caractéristiques favorisant la croissance végétale. Elles sont suivies d'essais in vitro, en serre et/ou en plein champ sur un certain nombre de cultures afin d'évaluer l'efficacité microbienne et la persistance des micro-organismes dans le sol. Ces étapes sont nécessaires, car même si des résultats intéressants sont obtenus en laboratoire, cela n'implique pas toujours une stimulation de la croissance des plantes en conditions réelles. Enfin vient l'étape de la multiplication des micro-organismes et de la formulation d'un produit répondant à diverses exigences, notamment une concentration élevée de cellules microbiennes viables et une durée de conservation d'au moins six mois. Pour ce faire, le choix d'une formulation appropriée qui assure la viabilité des micro-organismes, de la production à l'application des inoculants, est extrêmement important (**Backer et *al.*, 2018**).



Fig 13: Diverses formulations de biofertilisants: liquide, poudre lyophilisée et à base de support.

5.1.6.1. Formulations solides:

Les supports utilisés dans les formulations solides (ou à base de support) peuvent être fabriqués à partir de matériaux organiques, inorganiques ou synthétiques à faible coût et sont faciles à traiter et à stériliser. Ils doivent fournir aux micro-organismes du sol une niche protectrice à court terme, soit en assurant la protection physique, soit en assurant la survie par l'apport de nutriments spécifiques.

Il existe deux types de formulations solides: la tourbe et les granulés. La tourbe est un matériau non homogène et complexe qui a une influence variable sur la croissance et la survie des cellules microbiennes pendant la multiplication. Au cours de la stérilisation de la tourbe, des substances toxiques peuvent être libérées, réduisant la croissance et la survie des micro-organismes, ce qui limite encore davantage l'efficacité microbienne. Les formulations à base de granulés sont composées de tourbe, de calcium, de vermiculite ou de silice. Les granulés sont enrobés ou imprégnés des souches microbiennes souhaitées (**Backer et *al.*, 2018**).

Les procédures d'application des biofertilisants solides sont simples et faciles à contrôler. Les granulés peuvent être placés à proximité des semences pour garantir l'interaction des micro-organismes avec la rhizosphère. Cependant, leur utilisation présente un certain nombre d'inconvénients. D'une part, la taille volumineuse des biofertilisants solides entraîne des coûts élevés de transport et de stockage. D'autre part, les concentrations de micro-organismes dans les formulations solides diminuent rapidement en raison de l'absence de nutriments ou d'agents protecteurs des cellules microbiennes. Par conséquent, l'application doit être répétée plus souvent afin d'obtenir les résultats souhaités. Autre formulation solide, d'un type particulier et plus stable: les poudres lyophilisées. Elles sont produites par lyophilisation directe des micro-organismes cibles avec des substances telles que le glucose pur ou la poudre de lait, qui assurent la protection nécessaire des cellules microbiennes contre les dommages causés par le gel (**figure 12**).

5.1.6.2. Formulations liquides:

Outre les cellules microbiennes, les formulations liquides peuvent également contenir des nutriments, des protecteurs cellulaires spéciaux ou des substances chimiques qui favorisent la formation de spores ou de kystes. Ces additifs augmentent la durée de conservation des produits et la tolérance au stress des micro-organismes. Les formulations liquides offrent une solution à de nombreux problèmes associés aux formulations solides. En effet, elles ont une durée de conservation plus longue (deux ans contre six mois pour les formulations solides) et tolèrent mieux les températures élevées jusqu'à 55°C (**Tableau III**). Par ailleurs, les formulations liquides ont des densités de population supérieures allant jusqu'à 10^9 unités formant colonie (UFC) par ml-1, contre seulement 10^8 UFC par g-1 pour les formulations

solides. Elles peuvent également être appliquées plus facilement par le biais des systèmes d'irrigation (**figure 14**).

Tableau 3: Avantages et inconvénients des différentes formulations de biofertilisants.

		Avantages	**Inconvénients**
Biofertilisants solides	**Biofertilisants à base de support**	• Coût réduit • Production facile • Faible investissement	• Courte durée de conservation • Sensibilité thermique • Vulnérabilité à la pollution • Nombre de cellules faible
	Poudres lyophilisées	• Durée de conservation plus longue • Nombre élevé de cellules • Produits stériles	• Coût très élevé • Investissement élevés par unité de production
Biofertilisants liquides		• Durée de conservation plus longue • Tolérance thermique • Nombre élevé de cellules • Haute efficacité • Produits stériles	• Coût élevé • Investissement élevés par unité de production

Matériel et Méthodes

III. Matériel et méthodes :

1. Matériel :

1.1. Cadre d'étude et présentation de site :

Notre travail a été faite dans de laboratoire de biologie au niveau de la faculté des sciences, université Yahia Farés (Ouzera), qui située à la wilaya de Médéa, au nord de l'Algérie (36°15´nord ,2°51´est et 1005 m d'altitude). Nous avons ciblé ce site comme source naturelle pour l'isolement des actinomycètes, vu qu'il s'agit d'un site non exploité pour la recherche et l'isolement de microorganismes d'intérêt biotechnologique. La température relativement basse en été et très basse en hivers a été un paramètre motivant pour le choix de ce site pour l'isolement de nouvelles souches d'actinomycètes.

Le matériel est préparé à base des rosiers arbustifs « *Rosa canina* L » (APG III, 2009), originaire des régions tempérées et subtropicales.

Cette étude a porté sur l'estimation des critères PGPR des souches d'actinomycètes isolées des différentes fractions de la rhizosphère de la plante hôte.

1.2. Echantillonnage :

C'est la première étape dans l'expérimentation, elle doit être effectuée d'une façon à choisir un échantillon représentatif de la plante hôte en question.

La sélection de l'hôte a été faite au hasard, dans différents locaux de culture localisés au niveau de l'espace cultivée de la faculté (**figure).**



Fig 14 : Sélection de la plante hôte *Rosa canina* L .

1.3. Prélèvement de la zone rhizosphérique :

-choisir une plante qui ne soit ni trop « belle » ni au dernier stade de l'agonie
- retirer l'horizon de sol superficiel sur 10 cm de profondeur
- prélever la terre et/ou des racines dans la rhizosphère de la plante et verser le prélèvement dans un sac en plastique
A travers notre étude, nous avons ciblé 03 zones pour l'isolement de souches d'actinomycètes isolées à partir de la rhizosphère de la plante :

- **Le rhizoplant (RP)**
- **Le sol rhizosphérique (sol adhérent aux racines) (SR)**
- **Le sol non rhizosphérique (SNR**)

  - prélever au moins 50 g de terre par échantillon de chaque fraction de la rhizosphère .



Fig 15 : Prélèvement des différentes fractions de la rhizosphère de l'hôte.

1.4. Pré-conservation :

La pré-conservation des échantillons doit se faire dans de bonnes conditions au laboratoire d'analyse (température < 10°C) afin d'éviter toute détérioration et toute modification de la composition ainsi que toute contamination de la part du manipulateur ou de l'environnement.

1.5. Réactifs chimiques, milieux de cultures :

Les réactifs chimiques : eau de robinet, eau distillée stérile, eau physiologie, eau oxygéné, alcool 90%, violet de gentiane, lugol, fuchsine , huile d'immersion**.**

Les milieux de cultures sont répertoriés dans le **tableau IV.**

Appareillage _ : plaque chauffante, Balance de précision, Etuve, Agitateur magnétique chauffant, Réfrigérateur, Spectrophotomètre, Microscope optique **(Annexe 1).**

Tableau 4 : Réactifs chimiques, milieux de cultures utilisées durant l'expérimentation.

Composant du milieu (g/l)	ISP1	(Amidon _caséine et bonnette)	King B	PVK
Trypton	5	-	-	-

Extrait de leveurs	3	-	-	-
L'eaudistillée	1000ml	1000ml	-	500ml
Amidon	-	10	-	-
Caséine	-	1	-	-
Agar	20	20	-	7.5
Peptone	-	-	20	-
Glycérol	-	-	20	-
H(po)potassium)	-	-	1.5	-
Sulfate Mg H2O	-	-	1.5	-
PH	7.1	7.5	7.2	7
Gélose	-	-	-	5
Yeastextract	-	-	-	0.25
(nh4)so4	-	-	-	0.25
Mg so4 h2o	-	-	-	0.005
Na insp6	-	-	-	2.5
Nacl	-	-	-	0.1
Kcl	-	-	-	0.1
Mn so4 2h2o	-	-	-	0.001
Fe so4 7h2o	-	-	-	0.001

2. Méthodes:

2.1. Préparation du sol :

Nous avons réalisé un prélèvement d'une quantité d'1g dans chaque fraction (terre fine). La quantité du sol a été recueillie dans un flacon stérile hermétiquement fermé, le flacon a été mis dans une glacière.

2.2 Préparation des cultures bactériennes:

2.2.1 Préparation des cultures bactériennes sur milieu solide:

-Le sol a été séché de sa part, à l'air libre pendant 1 jours.

-Technique de l'isolement : A partir d'1g du sol sec solubilisé dans 10ml d'eau distillée stérille**,** 1 ml de chacune des dilutions 10^{-3} correspondant aux différents échantillons (RP, SR, SNR) est ensemencé sur chacune des géloses sélectives :

ISP1 (International Streptomyces Project 1), ISP2, Amidon-Caséines et Bennett (**Aly et *al.*, 2013**) additionnée d'acide Nalidixique (50µg/ml) pour inhiber la croissance des bactéries Gram- et de Nystatine (10µg/ml) permettant l'inhibition des champignons (**Abdallah et *al.*, 2012**). Les cultures sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours (**Sivasankar et *al.*, 2013**). Le meilleur développement des colonies typiques d'actinomycètes a été observé sur le milieu gélosé ISP2. Pour cela, ce dernier est retenu pour la suite de l'étude, comme milieu idéale de croissance et d'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches isolées. Les souches d'actinomycètes isolées sont conservées, après leur identification, dans le bouillon ISP2 en présence de glycérol à 30% et à une température de -8°C pour stopper toutes les réactions biochimiques internes et préserver l'intégralité cellulaire. D'autre part, les spores sont récoltées après maturation et conservées dans les mêmes conditions.

Repiquage et confirmation des souches apportés :

a. Purification des souches :

On va réensemencer chaque souches apporté en un boite de pétrie contenant la gélose sélectif convenable, puis les incuber pendant 24 heure, puis on va les repiquer une autre fois on des boites contenant les mêmes géloses utilisés (pendant 7 J):

b. Tests de confirmation :

Les examens a pour but de vérifier et conformer les souches sélectionnés :

b1.Examen à l'état frais :

On rajoute à une goutte de l'éosine aqueuse diluée (à la place de l'eau distillée) disposé sur lame une à deux colonies, bien mélangé, couvre par lamelle, puis observation au microscope optique à objectif x100 avec huile d'immersion.

b2.Coloration de Gram :

Une goutte d'eau distillée stérile va disposer sur lame et mélanger avec une colonie isolée, déplacer la lame sur la flamme jusqu'à devient sèche (blanchâtre), inonder avec le violet de gentiane (pendant 1 minute) puis rinçage par l'eau, l'ajoute de lugol (1 min) puis rinçage, décoloration par l'alcool (10 second) puis rinçage, coloration avec le fuchsine (1 min) puis rinçage, séchage du lame par papier buvard puis observation on microscope optique (objectif x 100 avec huile d'immersion).

b3.Aspect morphologique des souches d'Actinomycètes isolées :

Après l'isolement des colonies typiques d'actinomycètes en adoptant la méthode des stries par épuisement sur gélose sélective ISP2, ces dernières sont repérées suivant leurs caractères morphologiques. L'étude macromorphologique est réalisée en se basant sur l'aspect des mycéliums aérien et du substrat et la taille des colonies. L'étude micromorphologique est basée par contre, sur une observation microscopique de frottis l'aspect des hyphes (forme, taille et ramification) et la présence des spores sont observés (**Hasani et *al.*, 2014**).

2.2.2 Préparation des cultures bactériennes sur milieu Liquide:

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

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.

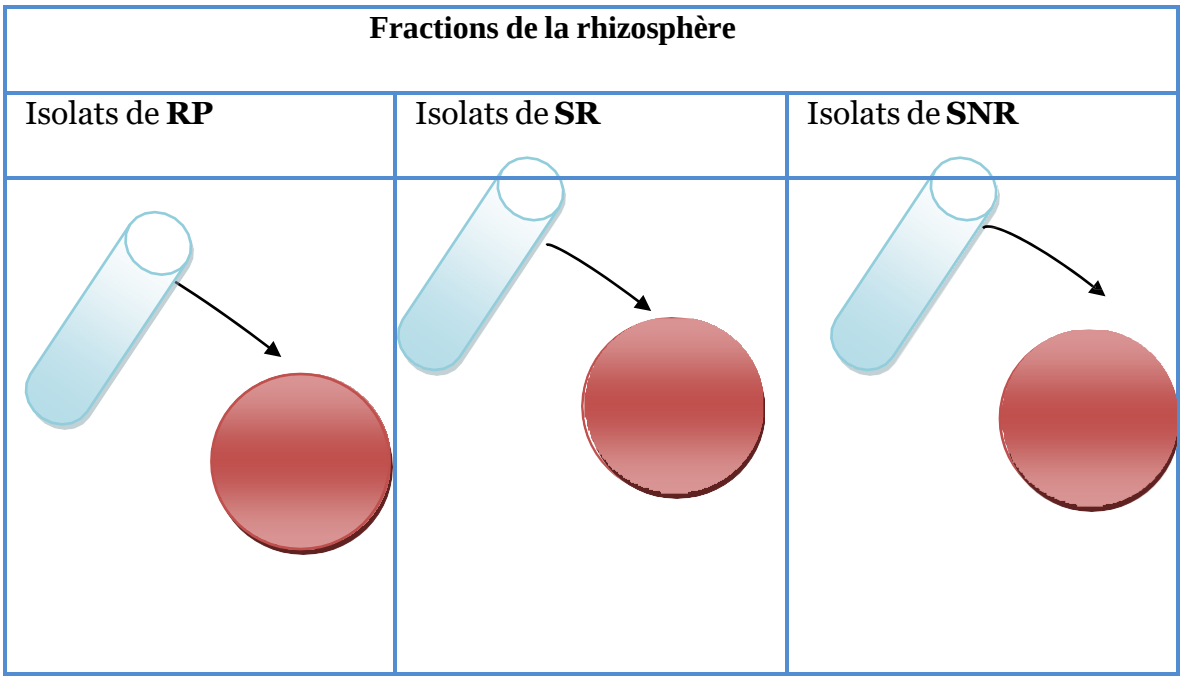
En effet Il y a des micro-organismes qui ne peuvent pas produire le halo de solubilisation du phosphate sur le milieu solide par contre peut solubiliser le phosphore en milieu liquide. Alors nous avons testées la solubilisation du phosphate minérale selon deux méthodes (milieu solide et liquide). La 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.

2.4. 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 (Pikovskaya, 1948 ou milieu TSA +Hydroxy apatite). Puis chaque bactérie est ensemencée en strie dans une boite 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 boite de Pétri. Les boites de Pétri ont été mise en culture à 28C° pendant 15jours.

2.4.1. Application des disques :

On place les disques préalablement inoculés dans les suspensions bactériennes (10^6UFC) des souches isolées dans chaque fraction sur les boites de pétri à l'aide d'une pince stérile. On refait l'opération trois fois pour chaque boite **(Fig 17).**



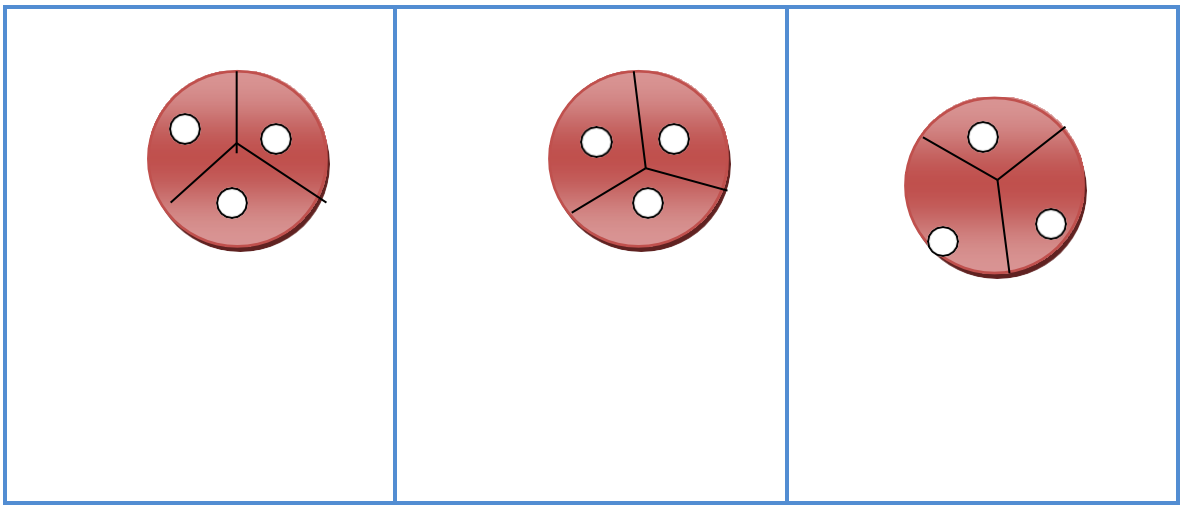


Fig 16 : Application des disques

2.4.2. Incubation :

Les boites de Pétri sont incubées dans l'étuve à 28°C pendant 1semaine pour les bactéries testées.

2.4.3. Lecture :

Elle consiste à mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée, la formation d'un halo clair autour des disques est considérée comme indicateur de l'activité de solubilisation. L'indice de solubilisation (Is) est déterminé en utilisant la formule suivante:

$$Is\% = \frac{Diamètre\ halo\ (mm) - Diamètre\ disque(mm)}{Diamètre\ disque\ (mm)} X100$$

2.5.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 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 .

2.6. Traitement statistique des données :

Pour chaque série d'analyses, sont calculés la moyenne $\bar{(x)}$ **,** l'erreur standard **(ε)**, l'intervalle de confiance (**IC**), la variance (**s²), et** le degré de liberté **d.d.l**. . La comparaison des moyennes s'applique par le "**test de Student"** test qui nous permet de comparer entre les valeurs en fonction de deux facteurs le temps de conservation et la température.

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion :

1. Dénombrement de la microflore totale

Les résultats obtenus (tableau V) montrent une densité microbienne maximum dans fraction de compost; on observe toutefois une microflore spécifique légèrement abondante dans chaque fraction de la rhizosphère de la plante hôte. Ces numérations confirment les résultats obtenus précédemment par Bruckert et Dommergue (1968).

Tableau 5 : Dénombrement de la microflore totale de la rhizosphère de la plante hôte.

Fractions de la rhizosphère	Observation 01	Observation 02	observation 03
RP	47,9 . 10^4 UFC	69,l . 10^4 UFC	31.7. 10^4 UFC
SR	52.1 . 10^9 UFC	54,7. 10^8 UFC	12.5. 10^8 UFC
SNR	60 10^9 UFC	50 10^9 UFC	12 10^8 UFC

6.2. Caractéristiques morphologique et culturales des souches étudiées

6.2.1.Croissance sur le milieu ISP2

La majorité des souches donnent une bonne croissance sur ce milieu. Les observations rassemblées dans **le tableau VI** montrent l'aspect macroscopique de ces souches après 15 jours d'incubation. Pour toutes les souches, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition d'un mycélium très ramifié et pâteux. Mais, après sept jours d'incubation l'observation des colonies permet de diviser les souches en deux groupes :

Le premier regroupe : les colonies pâteuses, alors que **le second** réunit les colonies duveteuses ou légèrement poudreuses, (**Figure 18**).

Tableau 6 : Caractères morphologique des isolats étudiés.

Souches	Fraction de la rhizosphère	Mycélium	Spores
S1	RP	fragmenté	Absence
S2	SR	fragmenté	Absence
S3	SR	fragmenté	Sac de spores (sporange)
S4	SNR	Non fragmenté	Absence
S5	SNR	Non fragmenté	Absence

Au 21ème jour, la majorité des souches donnent des colonies poudreuses de couleur blanchâtre ou mélangée avec d'autre couleurs (grise, beige) (**figure 18**), de taille petite régulières ou non, aplaties ou bombées avec une odeur terreuse. Cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien, quelques souches apparaissent pigmentées, c'est la maturation des cultures. Pour quelques souches la masse des spores est importante.

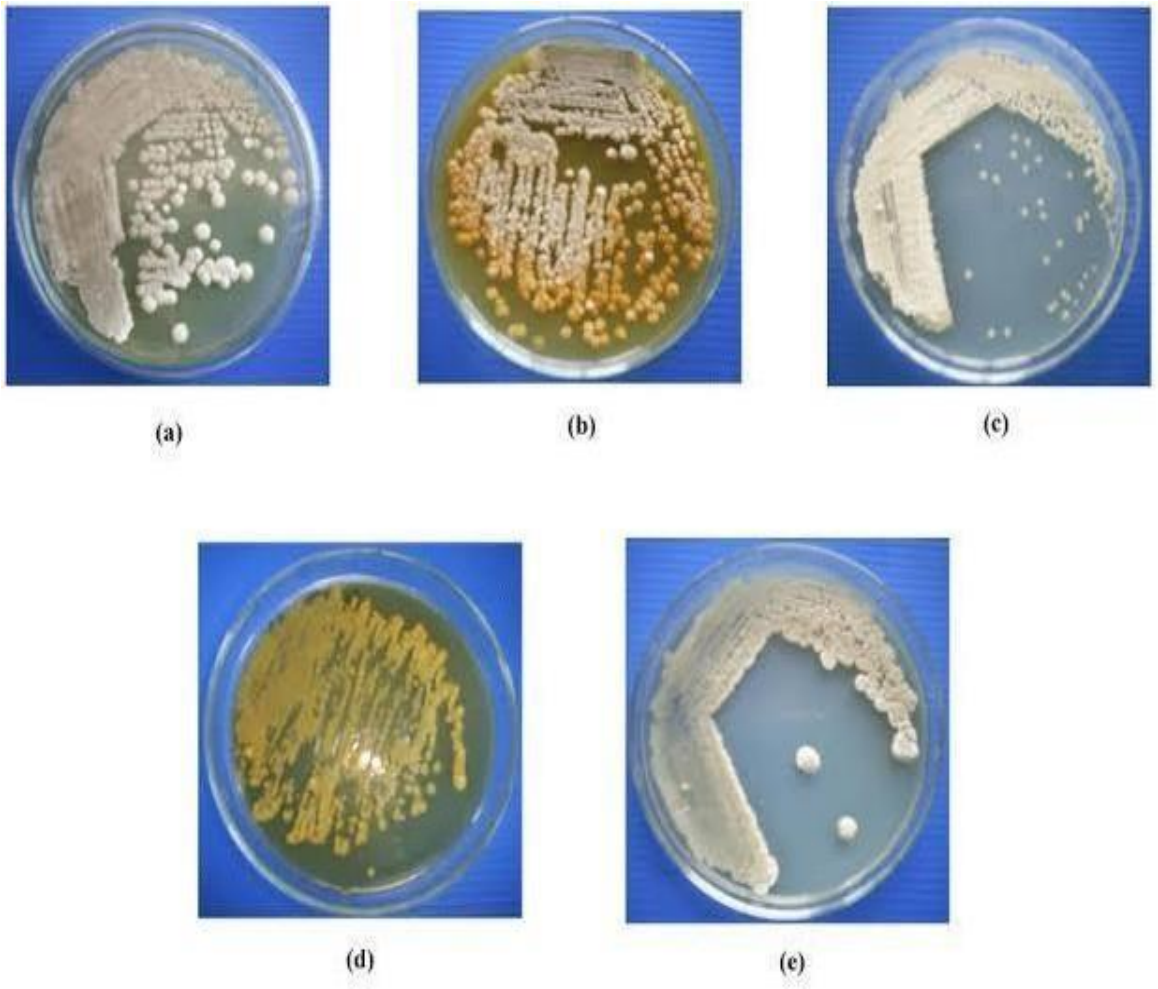


Fig 17: Aspect macroscopique des souches isolées (a) :S1 ; (b) :S2 ; (c) :S3 ; (d) :S4 ; (e) :S5

Tableau 7 : Aspect macroscopique des souches S1, S2, S3, S4, S5.

Critères	Taille	Contour	Surface	Aspect	Couleur et brillance	Opacité	Pigmenté (P) ou Sporulé (Sp)
S1	Moyenne	Régulier	Ramifier	Mousseuse	Blanche	opaque	P
S2	Moyenne	Régulier	Ramifier	Crémeuse	Beige	opaque	P
S3	Petite	Irrégulier	Ramifier	Poudreuse	Blanche	opaque	SP
S4	Petite	Irrégulier	Ramifier	Visqueuse	Beige	opaque	P
S5	Moyenne	Irrégulier	Ramifier	Poudreuse	Blanche	opaque	P

6.2.2. Caractères micro-morphologiques :

L'observation des lames après colorations simple et coloration de Gram sous un microscope optique à immersion, permet de détecter une seul forme filamenteuse à coloration de Gram positive (figure 19) ce qui confirme la pureté des souches de Streptomyces. Chez quelques souches le mycélium apparaît fragmenté comme les souches S1, S2 et S3. De cette fragmentation, il résulte soit des formes coccoïdes, soit des formes bacillaires. D'autres souches (S4 et S5), se présentent sous forme de mycéliums longs filaments ramifiés dépourvus de septums (figure 19)

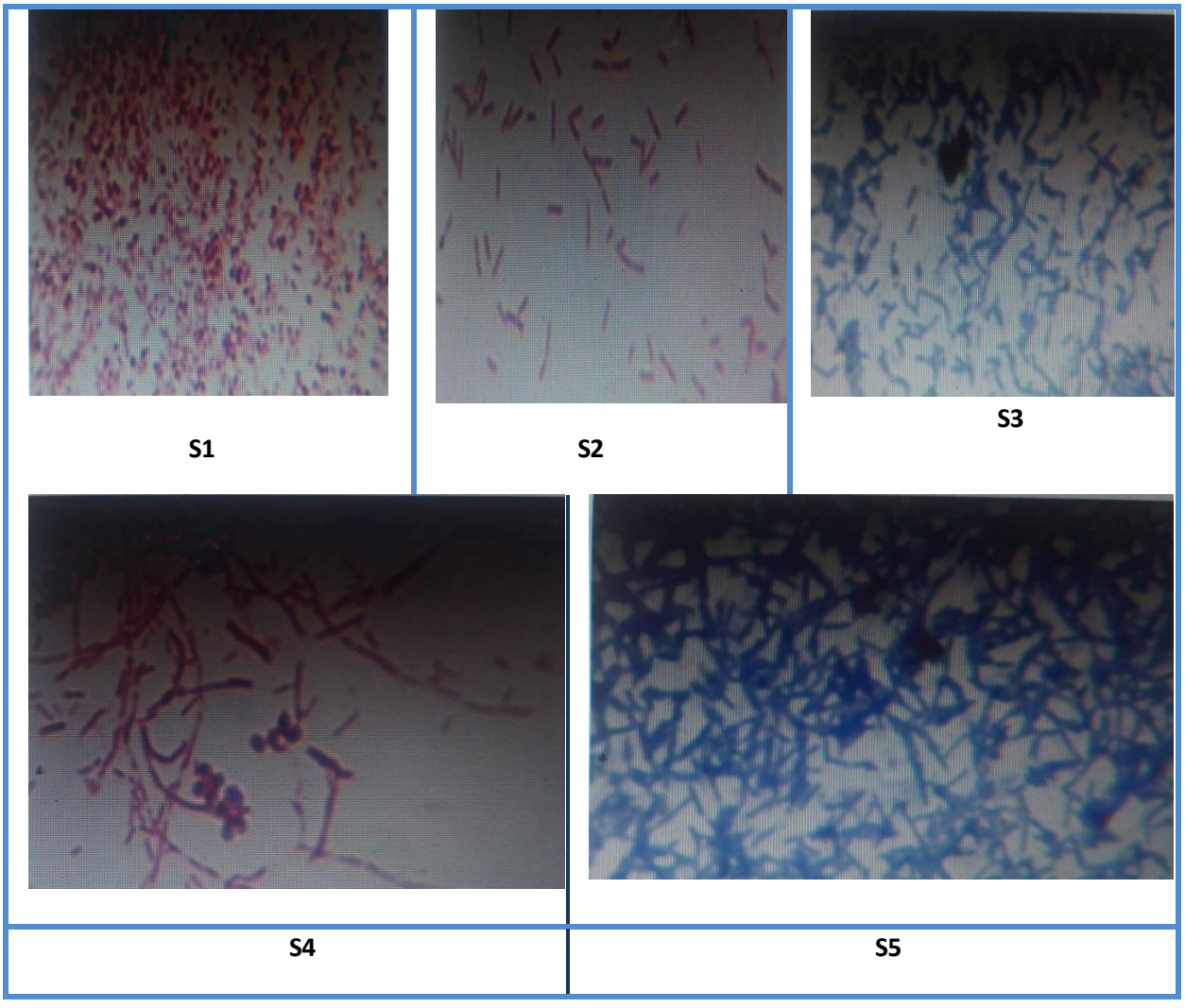


Fig 18 : Aspect micromorphologique des souches isolées après vingt et un jours d'incubation

6.3. Tests d'identification des isolats de la rhizosphère :

6.3.1. Caractéristiques chimiques :

L'absence de sucres caractéristiques, possèdent donc un spectre glucidique (C)

Tableau 8 : Caractères culturaux des isolats sur différents milieux de cultures

Temps d'incubation	Milieu de cultures	Croissance	Mycelium aérien	Mycelium végétatif
7 jours	ISP2	Moyenne	Blanc Gris	Beige
	ISP1	Moyenne	Gris poudreux	Beige
	Amidon-Caséine	Faible	Gris poudreux	Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Faible	Crème	jaune brun
14 jours	ISP2	Moyenne	Blanc poudreux	Beige
	ISP1	Moyenne	Gris poudreux	Beige
	Amidon-Caséine	Bonne	Gris poudreux	Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Faible	Beige	jaune brun
21 jours	ISP2	Bonne	Gris poudreux	Beige
	ISP1	Bonne	Gris poudreux	Beige
	Amidon-Caséine	Bonne	Gris poudreux	Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Moyenne	Gris poudreux	jaune brun

L'ensemble des caractéristiques morphologiques et biochimiques étudiés dans les 5 isolats permet de la rapprocher du genre *Streptomyces* (**Suutari et *al.*, 2001**). En effet ces souches présentent une température optimale a 35 °C et pH optimum entre 7 et 8, elle dégrade l'amidon et la caséine et la gélatine et elle coagule et peptonise le lait.

Tableau 9 : Caractères physiologique set biochimiques des souches testées.

Tests physiologiques	Résultats	Tests physiologiques	Résultats
Température optimal	35	Reduction des nitrates	+
Croissance a 45 °C	+	Production H2S	-
pH optimum	7.5	Pigment melanoide	+
Hydrolyse		Sensibilité au penicilline	-
Amidon	+	Sensibilité au rifampicine	+
Caséine	+	Substrats carbonés	
Gélatine	+	Glucose	+
Coagulation du lait	+	Saccharose	+
Peptonisation	+-	Galactose	+
Tolerance a NaCl [0-10]	+	Rafinose	+
		Xylose	-
		Pectine	-

6.4. Étude de la solubilisation du phosphate :

6.4.1. Evaluation de l'efficacité des isolats a solubiliser le phosphate inorganique:

L'efficacité de la solubilisation du phosphate par les souches de *Streptomyces* dépend, de la souche et le milieu utilisé. La plupart des colonies forment un halo clair dans les milieux PVK signe de solubilisation du phosphate. Le milieu PVK permet d'observer un halo transparent autour de chaque colonie, la souche S1 présente le plus grand diamètre (35mm) correspond un indice de solubilisation IS= 288.88% (+188/88%). Le diamètre (12 mm : IS=33/33%) est observé autour de la souche S2 (**figure 20)**, Cependant sur le milieu aucun halo n'est formé autour des colonies S3, S4 et S5.

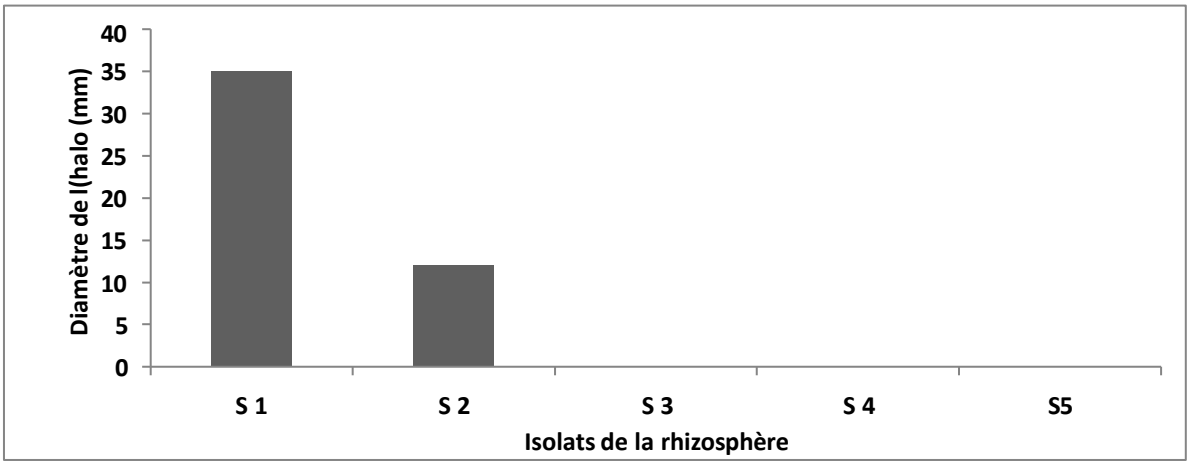


Fig 19 : Efficacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique (hydroxy-apatite) dans un milieu PVK.

Les souches S1, S2 étudiées ont pu solubiliser le phosphate. L'étude comparative des trois milieux de culture utilisés pour l'étude de la solubilisation du phosphate par les souches de Streptomyces montre que les deux milieux solides PVK et NBRIP préconisés pour ce test donnent des résultats similaires, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Cherif-Silini et *al* ; 2013** contrairement au milieu LB, ce qui est due probablement a sa composition et sa richesse en nutriments (**Nautyial, 1999**). Il faut signaler que plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de la solubilisation de phosphate, leurs choix dépend des espèces des bactéries étudiées (**Banik et Dey, 1982**).

Des recherches ont montré la corrélation entre l'activité de solubilisation du phosphate de calcium (hydroxyapatite) et l'acide acétique provenant des racines garnies de sédiments, des sédiments eux-mêmes et des isolats bactériens qui ont cultivés sur un milieu enrichi du glucose . La concentration minimale d'acide acétique produisant une solubilisation décelable de phosphate de calcium se situe a 10^{-5} M. Comme l'acide acétique est un produit du métabolisme du glucose par la flore de la rhizosphère, la suggestion est avancée que cet acide est responsable de la solubilisation du phosphate dans cet environnement.

6.4.2. Acidification du milieu par les isolats :

Afin de comparer les transformations métaboliques (la biosynthèse de l'acide citrique) dans des milieux d'activité biologique, nous avons choisi le changement de pH comme indice de transformation. Le faible pH enregistré dans les milieux contenant les deux souches (S1, S2) , a montré une décomposition des glucose et une synthèse de l'acide organique par ces deux isolats sachant que le pH initiale de la solution témoin a été 7

D'après **la figure 21 et le tableau IX** , nous pouvons constater que les souches S1 présente le plus grand indice (IS). Aucun halo de solubilisation n'a été détecté autour des colonies de (S3; S4 ; S5) dans le milieu PVK, au cours du test de solubilisation effectué sur le milieu ce qui peut s'expliquer par la faible diffusion **des acides (acide citrique) produits** par ces bactéries au cours de leur croissance dans le milieu solide ce qui est d'ailleurs confirmé par les travaux de **Cherif-Silini et *al.*, en 2013.**

Tableau 10: Evolution de l'acidité (pH) du milieu en fonction de l'inoculum étudié.

Fraction rhizosphérique	Isolats	pH
RP	S1	6.466 ± 0.222
SR	S2	6.523 ± 0.387
SR	S3	6.593 ± 0.348
SNR	S4	6.58 ± 0.321
SNR	S5	6.59 ± 0.188

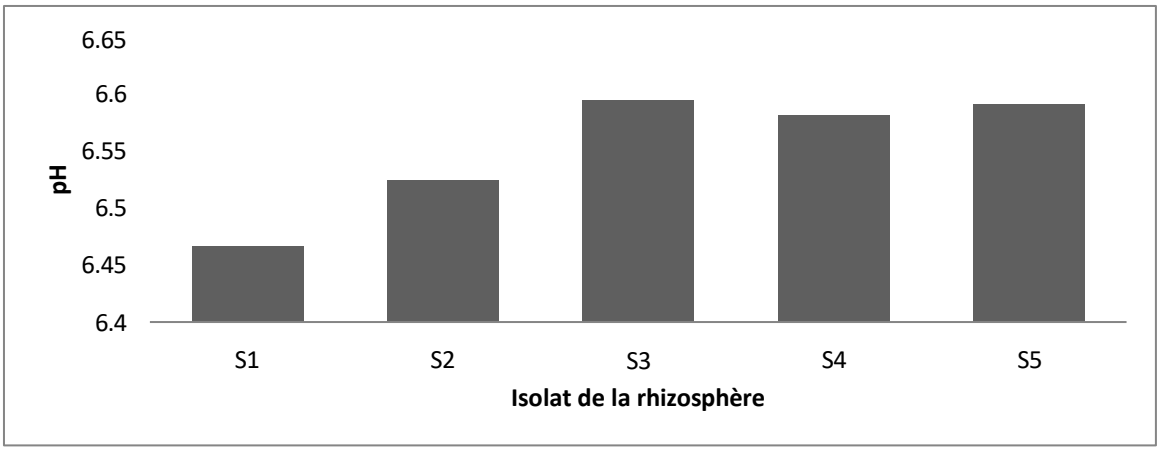


Fig 20 : Evolution de l'acidité (pH) du milieu en fonction de l'inoculum étudié.

Ce résultat nous a mené à procéder à l'étude phylogénétique des souches S1,S2, S3, S4 et S5.

6.5. Etude de la biodiversité des souches de la rhizosphère de Rosa:

6.5.1. Diversité en fonction de la variabilité métabolique:

La variance et l'écart-type nous permettent de quantifier a quel point les valeurs sont dispersées ou regroupées autour de la valeur moyenne.

a. Variable pH :

Selon le tableau X , la valeur faible de la variance 0.0024 indique une faible dispersion (une forte concentration des valeurs autour de la moyenne)

Les valeurs de l'intervalle de dispersion ont montré que le pH(S1) < 6.501, et que pH (S2) est proche de cette valeur ce qui signifie une forte variabilité des souches isolées en fonction de la fraction rhizosphérique où les souches de la fraction rhizoplan (RP) caractérisée par un Ph plus acide par rapport aux souches des fractions SR et SNR.

Tableau 11 : Valeurs des indices de la variabilité du pH des isolats.

Fraction	**Isolats**	**pH :**	x	**δ**	$x \pm \delta$
RP	S1	6.466	**6.55**	**0.049**	**[6.501; 6.599]**
SR	S2	6.523			
SR	S3	6.593			
SNR	S4	6.58			
SNR	S5	6.59			
Variance δ^2	0.0024				

b. Variable diamètre de l'halo de solubilisation :

Tableau 12 : Valeurs des indices de la variabilité du pH des isolats.

Fraction	**Isolats**	**Φ(H)**	x	**δ**	$x \pm \delta$
RP	S1	3.5	**0.94**	**1.361**	**[0.421; 2.301]**
SR	S2	1.2			
SR	S3	00			
SNR	S4	00			
SNR	S5	00			
Variance δ^2	1.852				

Les valeurs répertoriées dans le tableau ont montré une forte variabilité (dominance des souches de la fraction RP à solubiliser l'hydroxy-apatite), cette dispersion nous permet de les distinguer au groupe des souches les plus adaptées dans la rhizosphère des Rosacées.

6.5.2. Classification phylogénétique (classification ascendante hiérarchique : CAH)

Les résultats des analyses des deux variables quantitatives **[*X (Φ):* diamètre de l'halo ;*Y (pH)* : biosynthèse des acides organiques]** : des cinq isolats fourni dans le tableau suivant ont permet de tracer les Matrice de la distance euclidienne entre les variables :

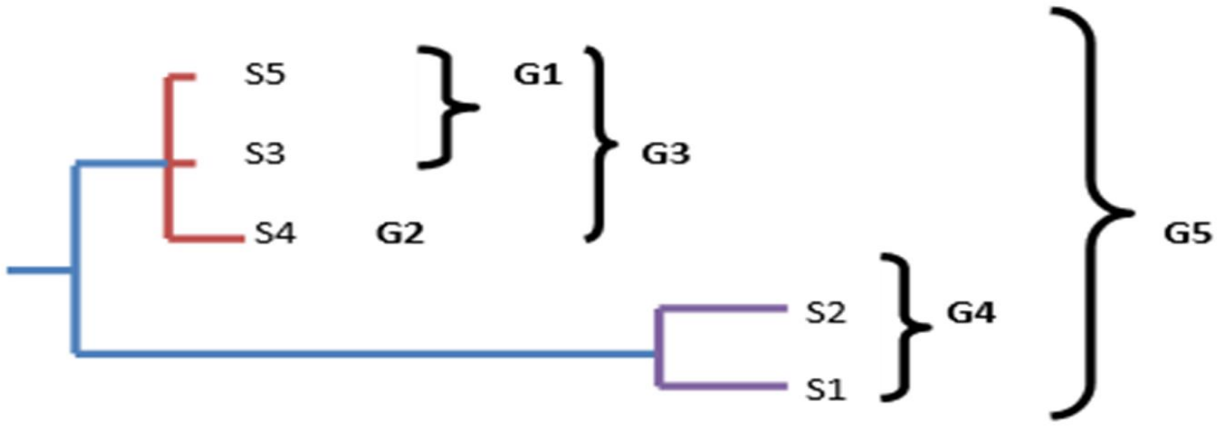
Tableau 13 : Résultats des données des deux variables quantitatives ***Y (pH) = f [X (Φ)].***

Souches	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**
X (Φ): cm	3.5	1.2	00	00	00
Y(pH)	6.466	6.523	6.59	6.58	6.59

Tableau 14: Matrice de la distance euclidienne D^2 de ***Y (pH) = f [X (Φ)]:***

Sachant que : $D^2 (S1 ; S2) = (X1-X2)^2+(Y1-Y2)^2$

D^2	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**
S1	00	5.293(4)	12.234(6)	12.166 (5)	12.234(6)
S2		00	1.435(3)	1.435 (3)	1.435 (3)
S3			00	0.0001 (2)	0.000 (1)
S4				00	0.0001 (2)
S5					00



$D^2 = 0.1$

Fig 21 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des isolats de la rhizosphère de Rosa.

Un arbre phylogénétique est une représentation graphique des relations de parenté entre des espèces, supposées ayant un ancêtre commun. Chaque nœud de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants.

Les analyses de similitude (BLAST) effectuées confirment son appartenance au genre commun groupe G5 (*Streptomyces*) , dont les souches S1, S2 se rapprochent d'une même espèce (groupe G4) et les souches S3, S4 , S5 se rapprochent à une autre espèce (G3)qui renfermant deux sous espèces : G1(S3 et S5) et G2 (S4). L'espèce la plus proche du groupe G4 c'est G2 (S4) selon leur degré de similitude selon les résultats du BLAST.

Conclusion

V. Conclusion :

L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité de cinq souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* à solubiliser le phosphate (hydroxy-apatite) et d'élucider la position phylogénétique des souches performantes.

En effet la majorité des souches cultivées en vingt-un jours sur le milieu ISP2, présentent des colonies poudreuses de couleur blanchâtre ou mélangée avec d'autre couleurs de tailles petites régulières ou non, aplaties ou bombées avec une odeur terreuse. Cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien, quelques souches apparaissent pigmentées et sporulées.

Nos résultats après coloration confirment que ces souches présentent des filaments ramifiés à coloration de Gram positive. Nous avons pu au cours de cette étude démontrer que les souches étudiées S1, S2 ont la capacité de solubiliser le phosphate qui s'est traduite par l'apparition d'halos clairs autour des différentes colonies. D'après certaines études ce processus est lié à la sécrétion des acides organique produits par ces bactéries, qui entrainent la libération du phosphate après destruction complète des liaisons ioniques qui lient le calcium au phosphate. Il s'agit de l'acide gluconique d'après Hamdali, (2008). Dans notre étude, vu le manque de temps et de moyens nous n'avons pas pu déterminer le mécanisme de solubilisation du phosphate par les souches de *Streptomyces* étudiées, ça fera l'objectif de la suite de ce travail dans l'avenir.

Les souches étudiées n'ont pas la même capacité de solubiliser le phosphate ce qui explique la différence entre les diamètres mesurés. La souche S1 a engendré le plus grand diamètre donc elles solubilisent plus le phosphate par rapport aux autres bactéries, elles ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique.

Les résultats de l'étude phylogénétique de ces souches montrent que ces souches appartiennent au genre *Streptomyces*.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques :

1. **AGRITECH .(2014).** Organic Inputs and Techniques. Organic Farming.

2. **Amarger, N. (2002).** Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie, 84 (11): 1061-72.

3. **BARKER A.V., PILBEAM D.J., 2007**. Handbook of plant nutrition. Books in soils, plants, and the environment; 117P.

4. **Bano, N., Musarrat, J. (2003).** Characterization of a new Pseudomonas aeruginosa strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. Cur. Microbiol, 46: 324-328.

5. **Barea, l.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005).** Microbial cooperation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56 (417): 1761- 1778.

6. **Beaudin I., Michaud A., Beaudet P ., Giroux M, 2008a**.La mobilité du phosphore : du sol au cours d'eau. Fiche technique n° 1. Québec, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, 8 p.

7. **Behera B.C., Singdevsachan S.K., Mishra R.R., Dutta S.K., Thatoi H.N, 2014.Diversity**, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review.Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2), 97–110P.

8. **Billah M., Khan M., Bano A., Hassan T.U., Munir A., Gurmani A.R, 2019.Phosphorus** and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. Geomicrobiology Journal, 36(10), 904-916P.

9. **Caravaca F, Alguacil M.M, Azcon R ., Diaz G ., Roldan A,2004.** Comparison of the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and Aspergillus niger to improve field performance of the leguminous shrub Dorycnium pentaphyllum L. Appl Soil Ecol 25(2),169–180P .

10. **cattelan, A.J., Hartel, P.G. Fuhrmann, J.J. (1999**). Screening for plant growthpromoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J, 63: 1670-1680.

11. **Chaboud, A. (1983).** Isolation purification and chemical composition of maize root cap slime. Plant Soil, 73: 395-402..

12. **Chen, L.H.; Tang, X.M., Raze, W., Li, J.H., Liu, Y.X., Qiu, M.H., Zhang, F.G., Shen, Q.R. (2011).** Trichoderma harzianum SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres continuously cropped cucumbers. Appl. Microbiol. Biotechnol, 89:1653–1663.

13. **Cordell D., Drangert J.O., White S, 2009**.The story of phosphorus: Global food security and food for thought. Glob. Environ Chang. 19(2), 292–305P.

14. **Djigal D, 2003**. Interactions entre la communauté microbienne du sol (Bactéries et champignons mycorhizes) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Université cheikh antadiop de Dakar ,19-22P

.15.**DUTIL P, 1976.** La fertilisation phosphatée des sols calcaires.An.Agro, I.N.A, 6(2, 2) :75-80P.

16Farhat MB., Farhat A., Bejar W, Kammoun Rq ., Bouchaala K., Fourati A., Antoun H, Bejar S., Chouayekh H, 2009. Characterization of the solubilization activity of the mineral phosphate of Serratia marcescens CTM 50650 isolated from the phosphate mine from Gafsa. Arch Microbiol 191,815–824P.

17. Gagnon E., Beaulieu R, 2002. Utilisation du phosphore dans les engrais de démarrage. PRODUCTION VÉGÉTALE, 58P.

18. GERVY R, 1970 , Les phosphates et l'agriculture.Edition DUNOD, Paris,298P .

19. Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M., Rahmani, H.A. (2012). Growth promotion of maize (Zea mays L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. Communications in soil science and plant analysis, 43: 1263-1272.

20. Glick BR ,1995. Enhancement of plant growth by living free bacteria. Can J Microbiol ,41(2),145–148P.

21. Gowami S.P., Maurya B.R., Dubey A.N, 2019. Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. International Journal of Chemical Studies, 7(3), 3905-3913.

22. **Harrison A.F, 1987.** Soil organic phosphorus. A review of world literature. CAB International. **Hamdali H, Bouizgarne B ., Hafidi M., Lebrihi A., Virolle MJ., Ouhdouch Y ,2008**. Detection of actinomycetes solubilizing natural phosphate from Moroccan phosphate mines. Appl Sol Ecol , 38(11),12–19

23. JIANG Yi.LI., Wen-Jun ., XU., Ping ., Tang S.K., Xu L. H, 2006 . Study on diversity of actinomycetes under salt and alkaline environments. Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica,46(2), 191-195P.

24. Kalayu G, 2019. Phosphate Solubilizing Microorganisms:Promising Approach as Biofertilizers. International Journal of Agronomy,1-7P

25. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M, 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils.Environmental chemistry letters,7(1), 1–19P.

26. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M, 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils.Environmental chemistry letters,7(1), 1–19P.

27. Khan M.S., Zaidi A., Musarrat J, 2016. Phosphate solubilizing microorganisms : Principles and applications of microphos technology. Springer International Publishing, New York..

28. Kim, K. Y., Hwangbo, H., Park, R. D., Kim, Y. W., Rim, Y. S., Park, K. H., Suh, J. S,2003. 2-Ketogluconic Acid Production and Phosphate Solubilization by Enterobacter intermedium. Current Microbiology, 47(2), 87-92P.

29. Kumar A., Baby K., Mallick M, 2016. phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers,International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,8(2), 37-40.

30. **Kucey R.M.N ., Janzen H.H ., Leggett ME, 1989.** Microbial increase in plantavailable phosphorus. Advances in Agronomy, 42,199-228P.

31. **Kucey RMN, 1983.** Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and pristine soils of Alberta. Can J Sol Sci 63(4),671–678P.

32. **Kundu B .S ., Gaur A.C ,1981.** Effect of simple and composite cultures on the solubilization of natural phosphate. Haryana Agric Univ J Res 11 559–562P.

33. **Lepinay C, 2013.** -Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes,au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.Dijon. 257P.

34. **Le Tacon F, 1978.** La mycorhization contrôlée et ses possibilités d'application. Les progrès réalisés aux Etats-Unis. Revue Forestière Française XXX, 30(5), 353-362P.

35. **Maharajan T., Ceasar S.A., Ajeesh Krishna T.P., Ramakrishnan M., Duraipandiyan V., Naif Abdulla A.D., Ignacimuthu S, 2018.** Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants. Plant Breeding, 137(1), 10–26P.

36. **Moose B, 1980 .** Research on vesicular-arbuscular mycorrhizae for tropical agriculture. Research Bulletin 194, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, Honolulu, HI, USA, University of Hawaii.

37. **Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., Tebbe, C.C. (2000).** Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with Sinorhizobium meliloti L33. Microbial Ecology, 41: 43- 56.

38. **Miransari, M. (2011).** Soil microbes and plant fertilization. Appl Microbiol Biotechnol,92: 875-885.

39. **Oldroyd G.E., Downie J.A, 2004.** Calcium, kinases et signalisation de nodulation chez les légumineuses. Nature Reviews Molecular Cell Biology , 5 (7), 566-576P.

40. **Pathom-Aree W ., Stach J.E., Ward A.C., Horikoshi K, Bull A.T., Goodfellow M, 2006.**Diversité des actinomycètes isolés des sédiments profonds challenger (10 898 m) de la fosse mariana. Extrémophiles 10(3),181–189P.

41. **Plaxton W.C., Tran H.T, 2011**. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. Plant Physiol. 156(3), 1006–1015P.

42. **Prabhu N., Borkar S., Garg S,2019.** Phosphate solubilization by microorganisms. Advances in Biological Science Research, 161– 176P.

43. **PRIYA P., SAHI S.V, 2009**. Influence of phosphorus nutrition ongrowth and metabolism of Duo grass (Duo festulolium). Plant Physiology and Biochemistry. 47(1), 31-36P.

44. **Qureshi M. A., Ahmad Z.A., Akhtar N., Iqbal A., Mujeeb F., Shakir M.A, 2012.** Role of phosphate solubilizing bacteria (psb) in enhancing Pavailability and promoting cotton growth. The Journal of Animal Plant Sciences, 22(1): 204-210P.

45. **Reyes I ., Bernier L., Simard R.R., Antoun H, 1999.** Effet de la source d'azote sur la solubilisation de différents phosphates inorganiques par un isolat de Penicillium rugulosum et deux mutants induits par les UV. FEMS Micobiol Écol 28,281–290P.

46. **Ricklefs R., Miller G, 2005.** Ecology. De Boeck Larcier, Bruxelles.

Richardson A.E, 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In:Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) Management of the soil biota in sustainable farming systems. CSIRO Publishing, Melbourne, 50–62P .

47. **Rodríguez H., Fraga R, 1999**. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17(4-5), 319-339P.

48. **Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi, T.A, 2013.** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2(1), 1-14. P

49. **Satyaprakash M., Nikitha T., Reddi E.U.B., Sadhana B., Satya Vani S, 2017.** A Review on Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and Their Role in Plant Nutrition.Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 6(4), 2133-2144P.

50. **Sharma K., Dak G., Agrawal A., Bhatnagar M., Sharma R, 2007.** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of Cicer arietinum seed sand seedling growth. J. Herb. Med. Toxicol, 1(1): 61-63P.

51. **Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi, T.A, 2013**. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2(1), 1-14. P.

52. **Sheshadari S, Kumarasamy R, Lakshminarasimham C, Ignacimuthu S 2000**. Solubilisation des phosphates inorganiques par Azospirillium halopraeferans . Curr Sci 79: 565–567P

53. **Singh A; Parmar N; Kuhad R. C, Ward O. P, 2011.** Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil biology. In : Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-23P.

54. **Singh CP, Mishra MM, Yadav KS, (1980).** Solubilisation des phosphates insolubles par les champignons thermophiles. Ann Microbiol, 131: 289-296P

55. **Sulbarán M, Pérez E ., Ball M.M, Bahsas A ., Yarzábal L.A, 2009** Characterization of mineral phosphate solubilization activity of Pantoea agglomerans MMB051 isolated from iron-rich soil in southeastern Venezuela (State of Bolivar). Curr Microbiol, 58 ,378–383P .

56. **Swain MR ., Ray R.C , 2009** . Biocontrol and other beneficial activities of Bacillus subtilis isolated from cow dung microflora. Res. microbial 164:121–130P .

57. Singh A; Parmar N; Kuhad R. C, Ward O. P, 2011. Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil biology. In : Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-23P.

58. Taiwo LB ., Ogundiya M, 2008. Microbial solubilization of Ogun rock phosphate in the laboratory and in soil. Afr J Microbiol Res 2,308–312P.

59. Vassilev N, Toro M ., Vassilev M, Azcón R, Barea J.M, 1997. Solubilization of rock phosphate by immobilized cells of Enterobacter sp. under fermentation and soil conditions. Biores Technol 61(1), 29–32P.

60. Vazquez P., Holguin G., Puente EM., Lopez-Cortes A, Bashan Y, 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. Biol Fertil Soils 30(5),460-468P.

61. Waddington, S.R. (1998). Organic matter management: From science to practice. Soil Fertil., 62:24–25.

62. Yadav B.K ., Verma A ,2012. Phosphate solubilization and mobilization in soil through soil microorganisms under arid ecosystems, the functioning of ecosystems. Rijeka,Intech, 93-108P.

63. Yang, X., Chen, L., Yong, X., Shen, Q. (2011). Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of Trichoderma harzianum SQR-T037 againts Fusartium wilt of cucumbers. NBiol. Fertil. Soils, 47:239–248.

*nill-the-frogg/wilimedia.org

*Www.biofertilisants.fr

*https://www.plantes-botanique.org/famille_rosaceae.

*https://jardinage.lemonde.fr/dossier-511-rosier.html

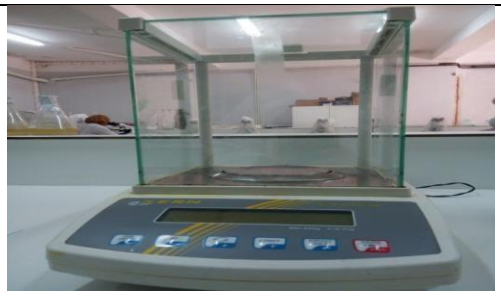
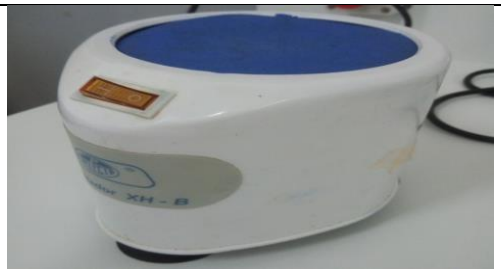
*https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1240-Biofertilisants.pdf

Annexes

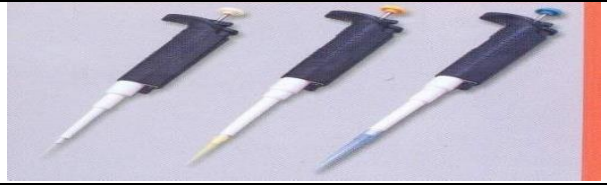
Annexe I :

1-Liste du matériel utilisé durant les étapes du traitement:

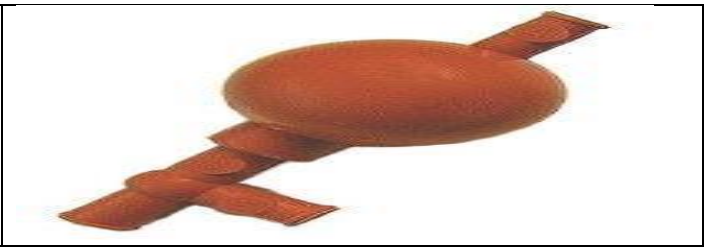
Instruments	Utilisation	Type d'appareillage
1- Bec bensène	Pour assurer une stérilisation instantanée.	
2- Bain marie	pour la transfusion des milieux de culture	
3-Autoclave	stérilisation á la vapeur	
4-Réfrigérateur	conservation des souches et des réactifs	
5-Microscope optique	Observation des micro-organismes	

6-Balance de précision	Pèse les produit et les composantes des milieux	
7-Agitateur magnétique de type vortex	Agitation et homogénéisation des solutions	
8-Incubateur	Incubation des cultures de micro-organismes	
9-Centrifugeuse	Séparation des fractions des solutions	

2-Verrerie :

1-Pipettes Pasteur et en plastique	-pour l'inoculation et l'ensemencement -coloration de Gram	
2-Micropipette	pour une prise très précise	

3-Becher á différents volumes	Contenir les solutions, les suspensions	
4-Verre á pied (200cc, 60cc)	Utilisation pendant la filtration	
5-Lames et lamelles	Faciliter l'observation microscopique	
6-Tubes à essai	Préparation des dillutions des suspensions bactériennes	
7-Boites de Pétri	Mise en culture dans des milieux nutritifs	
8-Anse de platine	Ensemencement des colonie bactériennes	
9-Portoirs	Porte les tubes à essai	

10-Poires	Aspirer les solutions	

Annexe II

Table statistique de t

La table donne la probabilité **P** pour que **t** égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée, en fonction du nombre de degrés de liberté (**d.d.l**.).

P / ddl	0.90	0.50	0.30	0.20	0.10	***0.05*** ↓	0.02	0.01	0.001
1	0.158	1.000	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.142	0.816	1.386	1.886	2.920	**4.303**	6.965	9.925	31.598
3	0.137	0.765	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	0.134	0.741	1.190	1.533	2.132	**2.776**	3.747	4.604	8.610
5	0.132	0.727	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	0.131	0.718	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.130	0.711	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	0.130	0.706	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.129	0.703	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.129	0.700	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.129	0.697	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	0.128	0.695	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.128	0.694	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.128	0.692	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.128	0.691	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.128	0.690	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	0.128	0.689	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.127	0.688	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.127	0.688	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	0.127	0.687	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.127	0.686	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.836	3.819
22	0.127	0.686	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.127	0.685	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	0.127	0.685	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.127	0.684	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.127	0.684	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	0.127	0.684	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	0.127	0.683	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	0.127	0.683	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	0.127	0.683	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
∞	0.126	0.674	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291