

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Étude de l'activité de solubilisation du phosphate
par différentes bactéries telluriques

Préparer par : MOUSSAOUI Zineb

Encadré par :

- Pr. ERRACHIDI Faouzi - Pr. MIKOU Karima

Soutenu le : 05/07/2022

Devant le jury composé de :

- Pr. EL EL GHADRAOUI lahssen
- Pr. MIKOU Karima
- Pr. ERRACHIDI Faouzi

Année universitaire
2021/2022

Dédicaces

A ma mère Aucun hommage ne peut être égal à l'amour dont il m'a toujours comblé,

Que Dieu leur donne une bonne santé et une longue vie.

A mon frère: Ali et mes sœurs : Khadija, hind, et soundous.

A tous les membres de la famille.

En témoignage de la fraternité, avec nos souhaits de bonheur de santé et de succès, A tous mes amies surtout Meryem et oumaima, A tous mes professeurs,

Merci infiniment

Moussaoui zineb

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Je remercie le directeur du laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Génie d'Environnement de la faculté des sciences et technique de Fès Mr. EL GHADRAOUI Lahsen et tout le personnel qui m'a aidé dans ce laboratoire.

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur ERRACHIDI Faouzi et le doctorant JANATI Walid, qui m'ont suivi tout au long de cette période de formation et m'ont conseillé sur l'orientation que celle-ci devait prendre.

Je tiens à remercier également le professeure Mme. MIKOU Karima pour avoir lu et commenté notre travail.

Je tiens à remercier également tous les professeurs de biologie qui ont participé à notre formation dans les meilleures conditions.

Finalement je voudrais adresser mes profondes gratitude à tous les membres de ma famille, qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

Résumé

Le phosphate (P) est un élément très important pour la croissance des plantes, comme l'azote et le potassium. Sa forme inorganique présente une difficulté d'assimilation pour les plantes en raison de son adsorption avec d'autres particules du sol. Dans le présent travail, nous avons développé un processus permettant de rendre le phosphate soluble et assimilable par la plante dans le but de trouver une solution alternative des engrais chimiques. Nous avons donc essayé de tester certaines bactéries solubilisatrices du phosphate (BSP) qui jouent un rôle dans la transformation du P insoluble en P soluble. Pour ce faire, nous avons utilisé le milieu NBRIP avec la Roche phosphate (RP) comme seule source de phosphore pour tester la capacité de ces bactéries à solubiliser le P. La méthode du vanadate-molybdate a été utilisée pour estimer l'activité de solubilisation du P. Pour caractériser ces souches, l'activité antimicrobienne a été testé sur des bactéries pathogènes. La souche WJEF51 a montré une valeur de solubilisation maximale de $130 \mu\text{g.ml}^{-1}$ corrélé à une baisse de pH du milieu d'une valeur de 4.67. En effet, parmi les souches sélectionnées, la souche WJEF46 a été capable de limiter la croissance des bactéries pathogènes testées. Les compétences de ces souches bactériennes sont nombreuses, cela révèle un effet potentiel pour soutenir une valorisation biotechnologique dans le domaine agricole.

Illustration

Liste des tableaux

Tableau 1: Acides organiques solubilisant les phosphates.	6
Tableau 2 : Observation microscopique des bactéries à gram + et gram- objective 100 (grossissement × 1000).	18
Tableau 3 : Etude macroscopique des BSPs isolés.	19
Tableau 4 : Inhibition de la croissance des bactéries phyto-pathogènes par les BSPs testés.	20

Liste des figures

Figure 1: Gamme étalon des ions phosphate	14
Figure 2 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.....	15
Figure 3 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.....	15
Figure 4 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.....	16

Liste des abréviations

P	:	Le phosphate
PGPR	:	Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria
PR	:	la roche phosphate
PSB	:	les bactéries solubilisatrices du phosphate
TCP	:	Tricalcium du phosphate

Table des matières

Introduction.....	1
Etude Bibliographique	3
1 L'intérêt écologique du phosphate.....	3
2 L'assimilation du phosphate par les végétaux	4
3 La solubilisation du phosphate par les bactéries.....	5
3.1 Les mécanismes	5
3.1.1 Solubilisation du phosphate minéral.....	5
3.1.2 La minéralisation du phosphate organique	7
4 La solubilisation du phosphate sous forme de la roche phosphatée et du tricalcium du phosphate	8
Matériel et méthodes.....	11
1. Matériel.....	11
4.1 Matériel biologique.....	11
4.2 Matière minérale	11
2. Protocole expérimentale.....	11
2.1. Préparation du milieu NBRIP	11
2.2. Le dosage des ions phosphate	11
2.3. Etude morphologique.....	12
2.4. Etude de l'activité antimicrobiennes.....	12
Résultats et discussion	14
1 Dosage des ions phosphate et mesure du pH.....	14
2 Etude morphologique.....	17
2.1 Coloration de gram	17

2.2	Etude macroscopique	19
3	Etude de l'activité antimicrobienne	19
	Conclusion	21
	Références.....	22

Introduction

Le phosphate (P) contrairement à l'azote, il ne peut provenir que du sol, où il est apporté sous forme de P inorganique soluble, qui devient généralement insoluble et donc non disponible pour les plantes. Le P est facilement adsorbé, c'est pour cette raison qu'il a une très faible mobilité. De plus, le P peut être immobilisé par l'activité biologique du sol. Dans les agrosystèmes, le P est fréquemment un nutriment limitant, d'autre part, son immobilisation dans les sols représente un risque potentiel pour la qualité de l'environnement (eutrophisation).

Dans le sol, les rhizobactéries jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques à travers la régulation de la dynamique de décomposition de la matière organique et l'élaboration de nutriments tels que l'azote (N). Ils ont donc un rôle essentiel dans la favorisation de la croissance des plantes, ce qui explique leur qualification de PGPR (Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes), en particulier, celles d'entre elles les bactéries solubilisatrices des phosphates (BSP) qui sont de plus en plus utilisées comme biofertilisants en agriculture.

Le présent travail a pour objectif de soumettre certains isolats bactériens à des tests pour déterminer leur capacité à solubiliser le phosphate inorganique par deux tests, la première étant le dosage des ions phosphate, le second étant le changement de pH. Ce document clive sur 4 parties. La première partie représente une synthèse bibliographique sur le P dans le sol et son intérêt avec les conditions de leur assimilation par les plantes, ainsi que les mécanismes de solubilisation par les bactéries. La deuxième partie est consacrée à la méthodologie expérimentale suivie pour atteindre nos objectifs. La troisième partie représente les résultats de différentes expériences et leur discussion. Nous terminons notre rédaction par une conclusion et perspectives.



PARTIE I

Etude Bibliographique



Etude Bibliographique

1 L'intérêt écologique du phosphate

Le P est un macronutriment essentiel à la croissance et au développement des plantes. En absence de P, il devient un nutriment limitant pour la croissance des plantes. Même dans les sols riches en P, la quantité maximale de cet élément n'est pas nécessairement sous une forme assimilable (Ezawa et al., 2002). En agriculture, les carences en phosphate sont souvent compensées par l'apport d'engrais chimiques phosphatés au sol. Cependant, il est rapidement immobilisé dans les structures du sol et donc non disponible pour les plantes (Mara et al., 2014). De plus, le coût élevé des engrais, l'accumulation de contaminants phosphatés dans les produits agricoles, les sous-produits agroalimentaires et l'atmosphère, ainsi que l'accumulation d'oligo-métaux lourds dans les sols (qui sont présents dans les engrais) ont incité les chercheurs à se pencher vers des meilleurs outils pour réduire l'utilisation de ces engrais (Song et al., 2008 ; Sharma et al., 2013).

Parmi ces alternatives, l'utilisation de BSP est l'une des options les plus écologiques pour éviter ou minimiser la surutilisation de produits chimiques dans l'agriculture (Vijayalakshmi et al., 2016). Les BSPs sont un groupe de PGPR capables de convertir des formes complexes de phosphate dans le sol en formes assimilables par les plantes. Les PGPR sont définies comme des bactéries présentes dans la rhizosphère qui ont un effet positif sur la physiologie des plantes. Selon Kloepper (1993), les PGPR se caractérisent par leur capacité à coloniser, survivre, se reproduire et entrer en compétition avec d'autres micro-organismes sur les surfaces racinaires tout en stimulant la croissance des plantes.

Dans la rhizosphère, ces bactéries peuvent se trouver au niveau intracellulaire ou extracellulaire (Gray & Smith, 2005). Au niveau intracellulaire, les bactéries sont considérées comme endogènes et colonisent l'apoplaste. Ces bactéries font partie de la famille des Rhizobium. Souvent symbiotiques, ce sont surtout des PGPR qui se spécialisent dans la structure nodale des légumineuses. Au niveau extracellulaire, elles sont situées en surface ou près de la racine, elles sont donc rhizosphériques (Vessey, 2003).

2 L'assimilation du phosphate par les végétaux

La majorité des sols agricoles ne contiennent que peu de P soluble, car il est hautement réactif avec les autres composants du sol. De plus, l'apport excessif d'engrais phosphatés entraîne son accumulation sous forme organique et minérale (Richardson, 1994). En conséquence, l'assimilation de ce dernier par les plantes est très limitée. Alors, afin de libérer l'agriculture des différentes problématiques liées aux engrais phosphatés, des recherches importantes ont été menées pour tirer profit de ces grandes réserves de P, ce qui explique l'importance de s'intéresser aux micro-organismes du sol capable de solubiliser le P inorganique. Pour Sundara et ses collaborateurs (2002), l'utilisation de micro-organismes solubilisant le phosphate pourrait réduire de 25% l'apport d'engrais phosphatés.

Les végétaux assimilent le P du sol sous forme d'anions orthophosphates, en particulier le dihydrogénophosphate (H_2PO_4^-) et l'hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}). La forme du P inorganique (Pi) présent dans le sol a tendance à changer avec le pH. En dessous de pH 6, la plupart du Pi sera présent comme forme monovalente H_2PO_4^- qui est disponible pour les plantes. En outre, à un pH compris entre 6.8 et 7.2, la forme dominante est HPO_4^{2-} . Dans les sols alcalins (pH > 7.2), le cas de la plupart des sols agricoles, la principale forme est l'ion trivalent PO_4^{3-} . Cette forme n'est pas forcément assimilable par les plantes (Maharajan et al., 2017 ; Billah et al., 2019). La dynamique du P au niveau des écosystèmes est ainsi représentée par un cycle biogéochimique qui comporte à la fois des réactions d'adsorption et de désorption, de précipitation et de dissolution, de minéralisation et d'immobilisation.

Le cycle biogéochimique du P intègre également les flux de P sous forme d'absorption par les plantes, de pertes par érosion, de ruissellement à la surface et en profondeur, de lixiviation ainsi que de drainage (Behera et al., 2014). Il faut noter que plus de 70 à 90 % des engrais phosphatés utilisés sont fixés dans le sol. Autrement dit, ils sont immobilisés par des réactions chimiques actives et des réactions rapides avec des cations tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} dans des terrains alcalins, tandis que dans des terrains acides, le P a tendance à former des complexes avec Al^{3+} et Fe^{3+} . En revanche, dans les sols acides, le P a tendance à former des complexes avec Al^{3+} et Fe^{3+} . Les complexes en question sont le phosphate d'aluminium (AlPO_4) et le phosphate de fer (FePO_4), ce qui aboutit finalement à de faibles concentrations de P disponible (Chen et Liu, 2019 ; Kalayu, 2019). Au niveau de la plante Le P est l'un des plus importants macronutriments pour sa croissance.

Le P a un rôle essentiel dans de multiples processus vitaux des plantes, y compris la germination des graines.

La floraison et la formation des fruits (Elanchezhian et al., 2015 ; Panigrahy et al., 2009). Le P est un élément des membranes cellulaires sous forme de phospholipides ; il participe à une multitude de fonctions dans les systèmes vivants, dont le transfert d'énergie, la photosynthèse, de multiples aspects du métabolisme, la signalisation intracellulaire, ainsi que la réplication et l'expression des gènes (Ceasar et al., 2014). Le P est le deuxième macronutriment après l'azote le plus restrictif pour la croissance ; il est important pour la production agricole (Lynch & Brown, 2008 ; Shimizu et al, 2008 ; Valdes Lopez & Hernandez, 2008 ; Wang et al., 2009).

3 La solubilisation du phosphate par les bactéries

3.1 Les mécanismes

Les BSP ont la capacité de solubiliser le P organique ou inorganique par différents mécanismes : diminution du pH du sol par la production d'acides organiques, émission de protons et minéralisation par la production de phosphatases acides.

3.1.1 Solubilisation du phosphate minéral

3.1.1.1 Par les acides organiques

Il est connu que la production d'acides organiques par les BSPs est considérée comme le mécanisme principal permettant de solubiliser le P inorganique. La quantité de P soluble libérée dépend de la puissance et du type d'acide organique produit (Rodríguez et Fraga ,1999). Ces acides organiques sont issus de métabolismes microbiens, essentiellement par respiration oxydative ou par fermentation de sources comme le glucose (Kumar et al., 2016 ; Gowami et al.,2019).

Par ailleurs, l'acide gluconique apparaît comme l'agent le plus fréquent pour la solubilisation du Pi. Il est notamment considéré comme étant le principal acide organique produit par les BSP dont notamment *Pseudomonas sp.*, *Erwinia herbicola* *Pseudomonas cepacia* et *Burkholderia cepacia* (Behera et al., 2014 ; Satyaprakash et al., 2017). De plus, l'acide 2-cétogluconique est fabriqué par des souches PGPR telles que *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* et *Bacillus firmus* (Kim et al., 2003). Les souches de *Bacillus liqueniformis* et de *Bacillus amyloliquefaciens* fabriquent des mélanges d'acides lactique, isovalérique, isobutyrique et acétique (tableau 1). On a également identifié d'autres acides organiques, comme l'acide glycolique, oxalique, malonique, fumarique, tartrique, propionique et succinique (Kumar et al., 2016).

Ces acides organiques peuvent solubiliser le P par différentes méthodes possibles : chélation, acidification, concurrence pour les sites d'adsorption etc.

Tableau 1: Acides organiques solubilisant le phosphate.

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

3.1.1.2 Acidification

La production d'acides organiques abaisse le pH et aide à convertir les formes divalentes et trivalentes non assimilables de phosphate en formes monovalentes assimilables (Rodríguez et Fraga, 1999 ; Khan et al., 2009 ; Kalayu, 2019).

3.1.1.3 Chélation

La chélation est le processus physico-chimique de formation d'un complexe, le chélate : « chélateur - cation (ou atome) ». Il est à noter que les acides organiques (acide humique, acide fulvique, etc.) agissent comme agents chélatants par leurs groupements hydroxyle (-OH) et carboxyle (-COOH).

Ces groupements dissocient les cations liés au P (Al^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+}), libérant ainsi des formes assimilables de phosphate (Kalayu, 2019 ; Prabhu et al., 2019).

3.1.1.4 Acides inorganiques

Les acides inorganiques, tels que l'acide sulfurique, nitrique et carbonique, peuvent également abaisser le pH, de sorte qu'ils peuvent dissoudre les phosphates 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 inefficaces (Rodríguez et Fraga, 1999 ; Kumar et al., 2016).

3.1.2 La minéralisation du phosphate organique

Le P organique peut constituer de 4 à 90 % du P total du sol, et son effet de solubilisation est aussi appelé « minéralisation ». La dégradabilité des composés organophosphorés dépend principalement du potentiel physico-chimique et biochimique du sol. Par exemple, les acides nucléiques, les phospholipides et les phosphates de sucre sont facilement décomposés. Cependant, l'acide phytique, les polyphosphates et les phosphonates se décomposent plus lentement (Rodríguez et Fraga, 1999 ; Maharajan et al., 2017).

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

- (1) les phosphatases (phosphohydrolases), qui affectent la déphosphorylation des liaisons P ou phosphoanhydride liées aux matières organiques.
- (2) les phytases, qui entraînent spécifiquement la libération de P à partir de l'acide phytique.
- (3) les phosphonates et les C-P lyases, qui affectent le clivage des liaisons C-P dans les organophosphonates.

3.1.2.1 Les Phosphatases (phosphohydrolases)

Selon Khan et al. (2009), de nombreux BSP tels que *Emericella rugulosa*, *Serratia marcescens*, *Chaetomium globosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes* et *Freund Citrobacter spp.* ont développé une enzyme appelée phosphatase qui libère du P_i du complexe organophosphoré. Ces enzymes sont classées en phosphatases alcalines ($\text{pH} > 7$) ou acides ($\text{pH} < 6$) selon leur pH optimal pour l'activité. Elle catalyse l'hydrolyse du phosphate de nombreuses macromolécules (alcools primaires, secondaires et cycliques, phénols et amines). De nombreux gènes de phosphatase acide issus de bactéries Gram négatives ont été isolés et caractérisés.

3.1.2.2 Les phytases

Les phytases des SBP rendent possible la libération du P assimilable des phytates, principales formes organiques de P dans le sol (Behera et al., 2014 ; Satyaprakash et al., 2017 ; Billah et al., 2019).

4 La solubilisation du phosphate sous forme de la roche phosphatée et du tricalcium du phosphate

Neeru Narula et ses collaborateurs ont tiré les résultats suivants de leurs expériences: six isolats d'*A. chroococcum* solubilisant le P ont été isolés du sol rhizosphérique de la culture de la moutarde. Et ont été évalués pour leur croissance, leur production d'acide indole-acétique et leur activité de solubilisation du P à trois températures différentes (30°C, 37°C et 42°C). Les résultats indiquent que les six isolats de *A. chroococcum* ont démontré la solubilisation du TCP (tricalcium du phosphate) et du RP et ont conduit à l'acidification du milieu aux trois températures. La solubilisation maximale a été observée par les isolats PS 2 et PS 6 à 37°C et 42°C respectivement. Dix-neuf isolats ont été isolés du sol de la rhizosphère de la culture de la moutarde à Haryana. Agriculture University Farm de Hisar, Haryana, Inde. Tous les isolats ont été identifiés comme *Azotobacter*. Tous sauf un isolat appartiennent à l'espèce *A. chroococcum*. Tous les isolats identifiés ont été testés sur le milieu de Jensen et de Pikovskya contenant du phosphate tricalcique, La zone de clairance a été mesurée et l'indice de solubilisation a été calculé. 19 isolats où 6 isolats ont montré une grande zone de clairance et ont été choisis pour des études ultérieures.

L'efficacité des différents isolats à solubiliser le P chez le *chroococcum* a été étudiée à différentes températures d'incubation. L'isolat PS2 suivi de PS6 et de PS12 a également été observé par une diminution du pH, cela pourrait être dû à la production d'acide et à l'augmentation de la quantité de P la solubilisation des P insolubles par les les micro-organismes sont principalement responsables de la production d'acides organiques et de substances chélatrices (Singh et al., 1980 ; Mishra et al.,1983 ; Halder et al.,1991 ; Surange and kumar ,1993). Le phosphate solubilisé peut réagir avec le Ca et le Mg présents dans la roche dès que le pH du milieu augmente.

De nombreuses bactéries du sol comme *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus radyhizobiume* etc. sont signalées pour dissoudre et solubiliser différents types de phosphates insolubles (Singh et al., 1980 ; Halder et al.,1991). Divers rapports montrent que les effets des bactéries solubilisatrices de P sur la croissance des plantes peuvent également être liés à leur capacité à synthétiser des substances régulatrices de la croissance des plantes (AzcoN et al,

1978) ; SATTER et Gaur, 1987). Tous les isolats ont été testés pour leur production d'IAA dans des conditions de culture. Les résultats montrent que la production maximale d'IAA a été obtenue par *A. chroococcum* isolat PS21 (22.96 pm) suivi par PS 13, PS2, PS 12, PS 11 et PS 6.

Presque tous les isolats solubilisant du P de *A. chroococcum* ont été capables de produire de l'IAA dans une culture liquide contenant du tryptophane. Les résultats démontrent que la capacité d'*Azotobacter* à solubiliser le P produisant des auxines indoliques biologiquement actives in vitro est affectée par le pH, les facteurs environnementaux et la concentration en sucre n (Halder et al, 1991; LEINHOS, 1994). Il est suggéré que la croissance de la plante qui résulte de l'inoculation de ces bactéries est causée principalement par les régulateurs de croissance. Il en résulte une augmentation de la taille des plantes, de l'absorption du P et de la fixation de l'azote.

Des chercheurs ont constaté que la rhizosphère des cultures contient un plus grand nombre de BSP. (Gaind, 1987; Gaind and Gaur, 1991; Kundu and Gaur, 1980), et une plus grande population de ces bactéries a été trouvée dans des plantes comme le blé (Broad Bean), (Mahmoud et al.1973) et l'orge. (Kumar and Narula, 1999). Le grand nombre de BSP pourrait être dû à l'influence favorable des exsudats de racine qui contient des acides aminés, des acides organiques, des sucres et des substances favorisant la croissance. Un *A. chroococcum* thermotolérant, solubilisateur de P et producteur d'IAA, qui n'est pas facilement disponible, pourrait s'avérer efficace pour être un meilleur biofertilisant pour diverses céréales.



PARTIE II

Matériel et méthodes



Matériel et méthodes

1. Matériel

4.1 Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées dans nos tests sont des bactéries à gram négatif et bactérie à gram positif de la banque des souches du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Génie d'Environnement.

4.2 Matière minérale

- La roche phosphatée

2. Protocole expérimentale

2.1. Préparation du milieu NBRIP

Nous avons utilisé le milieu NBRIP qui est un milieu spécifique pour les bactéries solubilisatrice du phosphate. Pour 1000 ml on inverse dans un erlenmeyer 10 g de glucose, 0.25 g de $7H_2O.MgSO_4$, 0.2 g de KCl, 0.1 g de $(NH_4)_2SO_4$ et 5g de la RP comme seul sources de P. Dans nos tests, nous avons utilisé 400 ml de ce milieu dans 27 flacons (deux répétition), chaque flacon contient 5 ml de ce milieu. Après autoclavage, nous avons inoculé les flacons par les bactéries présentées dans les boîtes. Finalement nous avons mis les flacons en étuve pendant 7 jours (durée moyennes de la solubilisation du phosphate par les bactéries).

2.2. Le dosage des ions phosphate

Après sept jours d'incubation, on met le milieu contenant les bactéries dans des tubes eppendorf, avec deux répétitions pour chaque flacon, on passera tous ces tubes par centrifugation après avoir préparé les doses suivantes : Préparation d'une dilution à 1/20 pour le volume total des tubes de 3 ml (110 tubes), alors ces tubes doivent contenir : 150 μL de surnageant + 2850 μL d'eau distillée + 480 μL de réactif.

Pour préparer 100 ml de réactif on a : 50 ml d'acide sulfurique (35 ml d'acide sulfurique dilué dans 250 ml de l'eau distillé), 5 ml de Potassium antimonyl tartrate (1,3715g dilué dans 400 ml de l'eau distillé), 15 ml d'ammonium molybdate (8 g dilué dans 200 ml de l'eau distillé) et 30 ml d'acide ascorbique (1,76 g dilué dans 100 ml de l'eau distillé). Suite au dosage nous avons préparé une gamme d'étalonnage qui est caractérisée par des concentrations connues de KH_2PO_4 et à partir

de ces concentrations et de la densité optique nous avons calculé les concentrations recherchées des ions phosphates.

2.3. Etude morphologique

Coloration de gram

Pour la réalisation des frottis nous avons déposé une goutte d'eau sur une lame de verre propre, puis nous prélèverons une colonie bactérienne et l'étalerons sur la lame pendant que nous séchons la préparation et la fixons devant le bec Benzène. Après nous avons colorer premièrement par le cristal violet. On le laisse agir une minute sur le frotti, puis on le rince à l'eau, puis on utilise le mordantage au lugol, on recouvre le lugol et on le laisse agir le même temps que le cristal violet puis on rince à l'eau. Puis on faire une décoloration (rapide) à l'alcool pendant 15 seconde, finalement on recolore le frotti avec la safranine, on met quelques gouttes de safranine sur la lame et on laisse agir pendant 45 secondes. Nous laisserons sécher la lame à l'air libre et l'observerons avec une goutte d'huile d'immersion objective 100 (grossissement $\times 1000$).

2.4. Etude de l'activité antimicrobiennes

Pour étudier l'activité antimicrobienne des bactéries utilisées dans notre test sur des bactéries pathogènes, le protocole suivant a été suivi :

Dans le premier jour, Nous préparons un milieu liquide LB par : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Nous mettons le milieu dans l'autoclave puis nous inversons ce milieu dans des flacons (5ml dans chaque flacon). Puis nous avons aliquote nos bactéries dans ces flacons et on les laisse en incubateur pendant 24 heures. Dans le deuxième jour, Nous préparons un milieu LB solide par : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl et 20 g d'agar. Nous mettons le milieu dans l'autoclave et ensuite nous remplissons 30 boîtes de Pétri avec ce milieu, et après avoir une solidification du milieu nous ajoutant 20 μ l de nos souches bactériennes dans chaque boîte (chaque boîte contient une souche différente de l'autre) et nous mettons ces boîtes dans l'incubateur pendant 24 heures. Et finalement dans le Troisième jour, Nous préparons un nouveau milieu LB et nous l'inversons dans les boîtes de Pétri précédentes. Nous avons inoculé cette deuxième couche par des bactéries pathogènes, 50 μ l de ces souches dans chaque boîte, et nous laissons ces boîtes dans l'incubateur pendant 48 h.



PARTIE III

Résultats et discussion



Résultats et discussion

1 Dosage des ions phosphate et mesure du pH

La concentration de la teneur en P a été calculée sur la base d'une gamme standard préparée avec des solutions de référence KH_2PO_4 contenant des concentrations de P allant de zéro à $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Avec $y = 0,5683x - 0,0079$ et $R^2 = 0,9957$ (Figure 1).

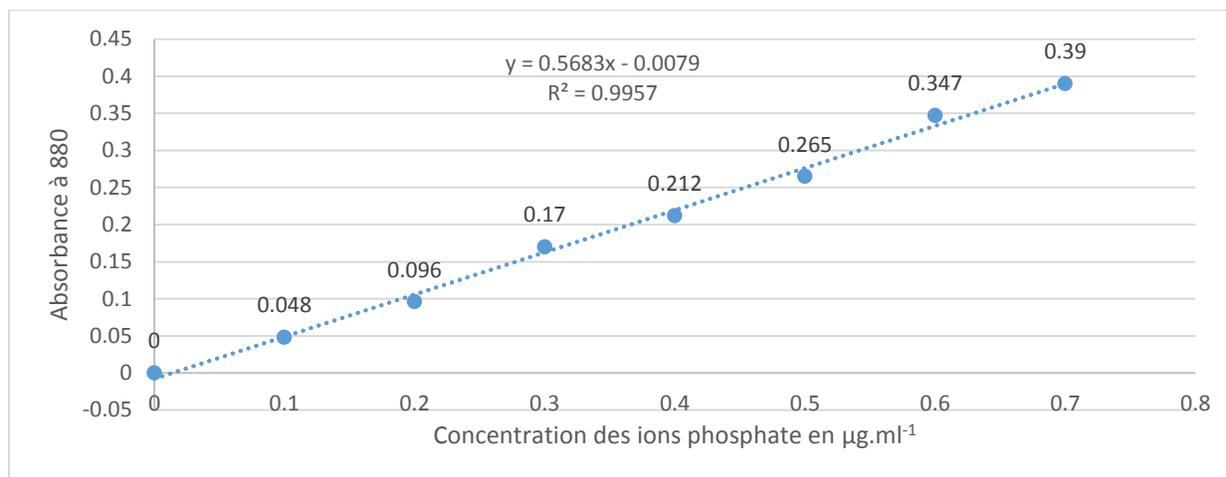


Figure 1: Gamme étalon des ions phosphate

A partir de la fonction $Y(x)$, nous avons calculé les concentrations des ions P. Les résultats relatifs à l'évaluation quantitative du P sur milieu NBRIP liquide avec la variation du pH sont reportés dans les figures 2, 3 et 4.

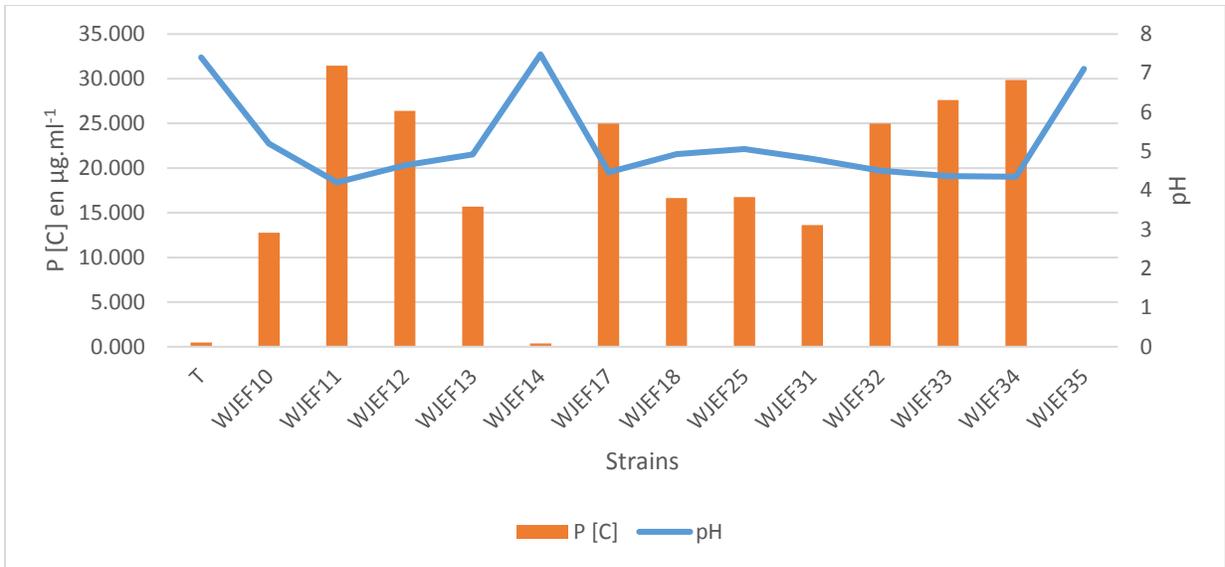


Figure 2 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.

On observe que la courbe du pH et l’histogramme de la concentration des ions P ont un développement opposé, On peut dire qu’il existe une corrélation entre les valeurs du pH et les valeurs de concentration des ions P. Dans la figure 2, Il apparait que les isolats WJEF11, WJEF12, WJEF17, WJEF32, WJEF33 et WJEF34 ont une solubilisation moyenne de 25 µg.ml⁻¹ jusqu’à 32 µg.ml⁻¹ par rapport au témoin avec des valeurs du pH acide. Par contre les isolats WJEF10, WJEF13, WJEF14, WJEF18, WJEF25, WJEF31 et WJEF35 montrent une solubilisation faible avec des valeurs du pH supérieur à 6. On peut dire ainsi que ces derniers isolats ne sont pas des BSP.

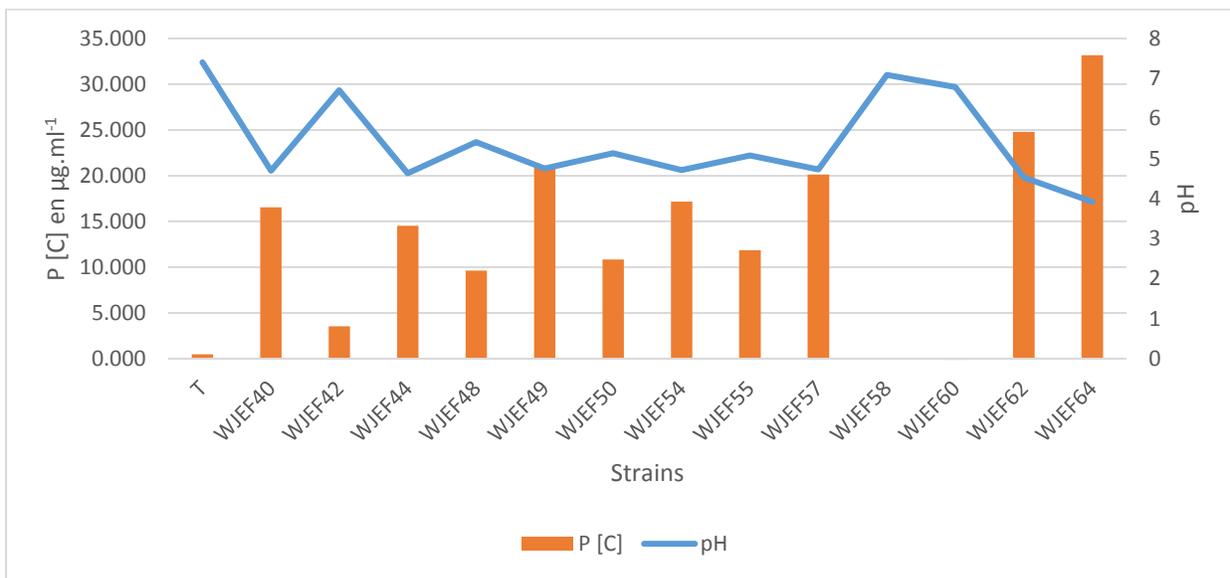


Figure 3 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.

On constate que la plupart des isolats montrés ont une solubilisation tendant vers zéro suivie par des valeurs de pH proches du témoin. On note que seule la souche WJEF64 qui a une solubilisation moyenne avec un pH acide de valeur 4 par rapport au témoin (Figure 3).

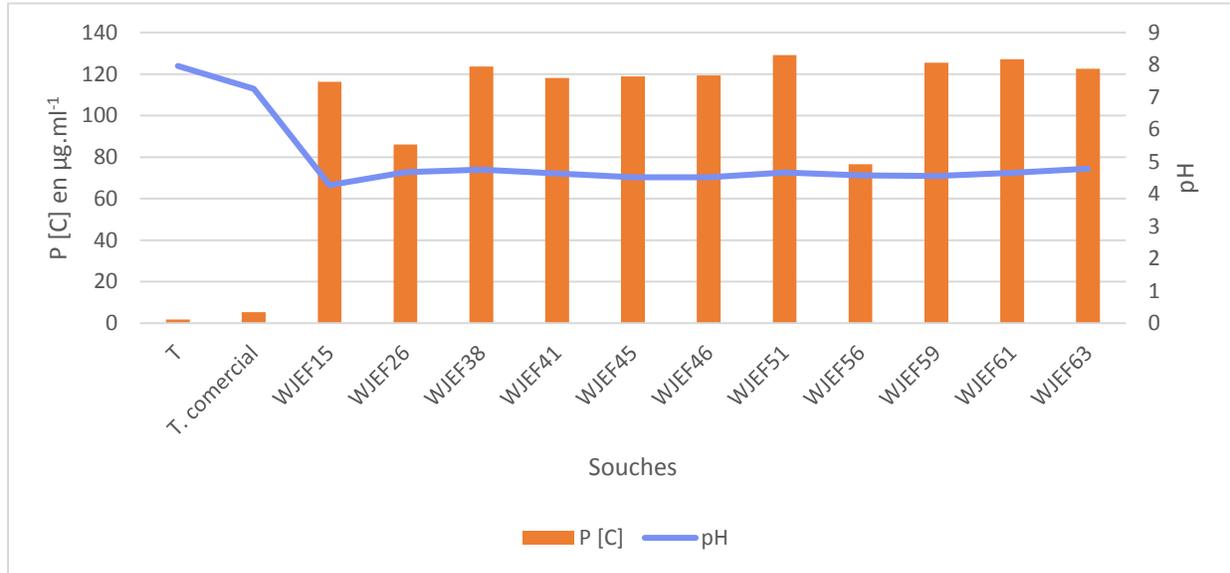


Figure 4 : Capacité de solubilisation du RP pendant 7 jours en milieu liquide par les bactéries isolées.

Il apparaît que la plus part des isolats solubilisent des concentrations allant de $79 \mu\text{g.ml}^{-1}$ jusqu'à $130 \mu\text{g.ml}^{-1}$ avec un pH 4.25 et 4.78, ces isolats sont les plus performantes par rapport au témoin et au témoin commercial, et aussi par rapport aux isolats précédentes (Figure 4).

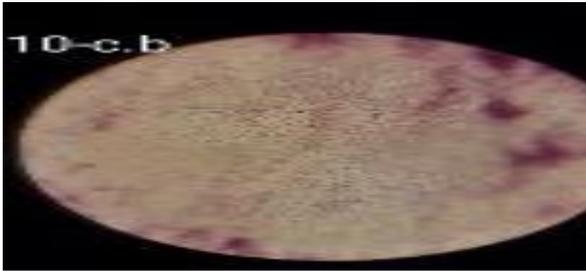
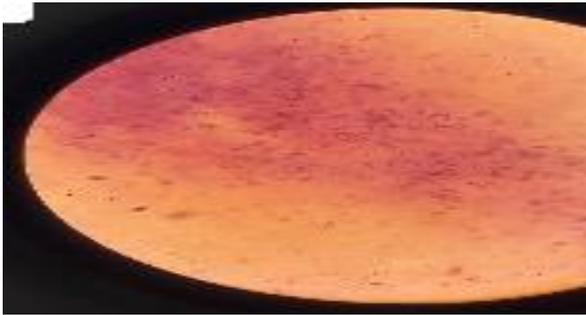
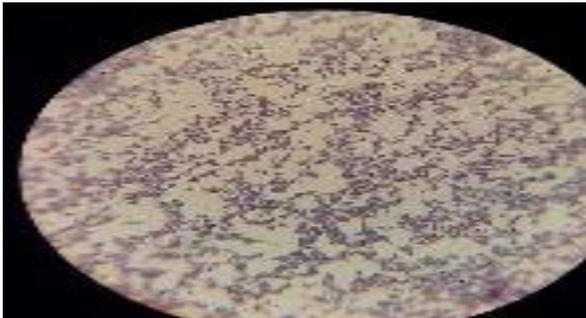
Dans cette étude, 37 isolats capables de dissoudre le P ont été sélectionnés. Les évaluations de solubilité, basées sur des investissements dans la quantification des taux de dissolution du P sur des milieux liquides contenant de la RP comme seule source de P, ont révélé des différences entre les souches. La quantité maximale de P dissous était de $130 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux rapportés par Aarab et al (2009), qui ont trouvé que la quantité de P dissous variait entre $109,4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $131,74 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Quoique d'autres études ont montré que certaines rhizobactéries ont pu solubiliser des taux assez faibles ne dépassant pas $16,65 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Aussi, la solubilisation du P s'accompagne d'une baisse du pH du milieu ; cette corrélation négative a été signalée par plusieurs auteurs (Chen et al., 2006 ; Asuming-Brempong et al., 2014) et serait due principalement à la libération des acides organiques par les bactéries.

2 Etude morphologique

2.1 Coloration de gram

Après l'observation microscopique des isolats bactériens, nous avons trouvé 34 isolats qui sont des bactéries à gram négative, et 15 isolats qui sont des bactéries à gram positive. Khan et son équipe (2009) montre que l'abondance des bactéries à gram négative constitue un avantage pour la solubilisation du P, car plusieurs gènes d'enzyme phosphatase acide des bactéries à gram négative, catalysent l'hydrolyse des P de nombreuses macromolécules. Le tableau 2 présente quelque image de souches sélectionnées avec leur type et leur forme.

Tableau 2 : Observation microscopique des bactéries à gram + et gram- objectif 100.

Souches	image	Type	Forme
WJEF10		Gram +	Coco bacille
WJEF37		Gram +	Bacille
WJEF20		Gram +	Cocci
WJEF13		Gram -	Coco bacille

2.2 Etude macroscopique

Le tableau 3 présente l'étude macroscopique des colonies des bactéries sélectionnées en tant que BSPs.

Tableau 3 : Etude macroscopique des BSPs isolés.

Souche	Taille	Couleur	Aspect	Bord	Forme	Opacité	contour
WJEF10	<1mm	B	LS	E	R	O	L
WJEF11	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF12	> 1mm	J	LS	E	R	T	L
WJEF13	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF14	> 1mm	J	LS	E	R	O	DS
WJEF17	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF18	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF25	<1mm	J	RG	LB	R	O	L
WJEF31	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF32	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF33	> 1mm	J	LS	E	R	O	DS
WJEF34	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF35	<1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF40	> 1mm	J	LS	E	R	T	L
WJEF42	> 1mm	J	RG	LB	R	O	L
WJEF44	<1mm	J	LS	OD	R	O	L
WJEF48	<1mm	B	LS	E	P	T	DS
WJEF49	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF50	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF54	<1mm	J	RG	E	R	O	L
WJEF55	> 1mm	J	LS	E	R	O	L
WJEF57	> 1mm	B	LS	OD	R	T	DS
WJEF58	> 1mm	B	LS	LB	R	O	DS
WJEF60	<1mm	B	LS	E	R	o	L
WJEF62	> 1mm	B	RG	E	R	T	L
WJEF64	> 1mm	J	LS	E	R	O	L

B: Blanche, DS: Désorganisé, E: Entier, J: Jaune, L: Limité, LB: Lobé, LS: Lisse, O: Opaque, P: Plissé, R: Ronde, RG: rugueux, T: Transparent (Canadian Journal of Microbiology Volume 24, Number 5, May 1978 Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*.)

3 Etude de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobiennes des BSPs sur des bactéries phyto-pathogènes présente pour SX1 les isolats qui ont montré une inhibition de croissance sur cette souche phyto-pathogène sont WJEF38, WJEF41 et WJEF51. Pour SX2, l'inhibition est portée par le témoin commercial et les isolats WJEF38, WJEF41, WJEF45 et WJEF61. Le témoin commercial et les isolats WJEF38, WJEF41 et WJEF59 montrent une inhibition de la souche SX3. Finalement la souche SX4 est inhibée que par l'isolat WJEF46 (Le tableau 4).

Tableau 4 : Inhibition de la croissance des bactéries phyto-pathogènes par les BSPs testés.

Souches BSP / Souches phyto- pathogène	Témoin commercial	WJEF 15	WJEF 26	WJEF 38	WJEF 41	WJEF 45	WJEF 46	WJEF 51	WJE F 56	WJEF 59	WJEF 61	WJEF 63
SX1	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
SX2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
SX3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
SX4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Nous avons constaté qu'ils existent des isolats possèdent une activité antimicrobienne spécifique et d'autre non spécifique. Les isolats WJEF41 et WJEF38 ont une activité contre 3 souches, ils sont évalués comme des isolats non spécifique, par contre d'après Schillinger (1989), qui est montré qu'il existe des isolats spécifiques pour une souche précise, l'isolat WJEF46 est efficace que pour la souche phyto-pathogène SX4, donc on peut dire que l'isolat WJEF46 est spécifique.

Conclusion

Ce travail vise la caractérisation des BSPs isolés à partir de la rhizosphère des légumineuses, pour tester la capacité de solubilisation de P exactement la roche phosphate dans un milieu NBRIP liquide. Sur 37 isolats nous avons sélectionnés des souches compétentes dans la solubilisation jusqu'à $130 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de la RP. Nous avons testé l'activité antimicrobienne de ces isolats et nous avons trouvé que l'isolat WJEF46 possède une activité spécifique qui est efficace que pour la souche phyto-pathogène SX4. La solubilisation bactérienne de P joue un rôle très important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été constaté que quelques micro-organismes du sol impliqués dans la solubilisation de P peuvent améliorer la nutrition phosphatée des plantes, de même que ces BSPs retenus sont capables de solubiliser la RP en milieu liquide par la production d'acides organiques. Les souches sélectionnées dans la présente étude ont un potentiel important de solubilisation du P. Par conséquent, leur utilisation comme biofertilisant pour les cultures serait intéressante, notamment pour promouvoir une agriculture durable au Maroc.

Références

A.E. Richardson, Soil microorganisms and phosphorus availability. In: C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupts, P.R. Grace, Ed., Soil Biota, management in sustainable farming systems. CSIRO Australia, Melbourne, (1994) 50-62.

A.K. Halder, P.K. Chakrabarty, Solubilization of inorganic phosphate by Rhizobium, Folia Microbiol. 38 (1993) 325-330.

Aarab S, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A. 2009. Sélection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique : inoculation des graines du triticale (variété momtaz). COVAPHOS III Volume 5.147-152 ISBN: 9954-8734-2-7.

Azkon R., AzcoN G., DE AguiLAR and J.H. Barea, 1978: Effect of plant hormones present in bacterial cultures on the formation and response to vandomycorrhiza. New Phytology 80, 359 -364.

B. Sundara, V. Natarajan, K. Hari, Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crop. Res. 77 (2002) 43-49.

Babu-Khan, S., Yeo, T. C., Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D., Goldstein, A. H. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. Applied and environmental microbiology, 61(3), 972- 978.

Barman, S., Das, S., Bhattacharya, S. S. 2019. The prospects of bio-fertilizer technology for productive and sustainable agricultural growth. In: Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Saxena, A. K. (Ed.), New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp. 233-253.

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

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

Canadian Journal of Microbiology Volume 24, Number 5, May 1978 Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*

Cesar, S. A., Hodge, A., Baker, A., & Baldwin, S. A. (2014). Phosphate concentration and arbuscular mycorrhizal colonisation influence the growth, yield and expression of twelve PHT1 family phosphate transporters in foxtail millet (*Setaria italica*). PLoS One, 9, 1–12.

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol.P; 34:33–41.

Chen, Q., Liu, S. 2019. Identification and Characterization of the Phosphate- Solubilizing Bacterium *Pantoea sp. S32* in Reclamation Soil in Shanxi, China. Frontiers in Microbiology, 10, doi: 10.3389/fmicb.2019.02171.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., Young, C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 34(1), 33–41.

Elanchezhian, R., Krishnapriya, V., Pandey, R., Rao, A. S., & Abrol, Y. P. (2015). Physiological and molecular approaches for improving phosphorus uptake efficiency of crops. Current Science, 108, 1271–1279.

Ezawa, T., Smith, S. E., Smith, F. A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. Plant Soil, 244(1-2). 221–230.

Gaind S. and A.C. Gaur, 1991: Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. Plant and Soil 133, 141-149

GLICK, B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and applications. In: Scientifica. Octobre 2012. Vol. 2012, p. 1-15. DOI 10.6064/2012/963401.

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

Gull, M., Hafeez, F. Y., Saleem, M., Malik, K. A. 2004. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 623-628.

HALDER A. K., Mishra A.K. and P.K. Chakrabarty, 1991: Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian Journal of Experimental Biology* 29, 28- J1.

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

Kalayu, G. 2019. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 1-7, <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.

Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci*, (1). 48–58.

Kim, K. Y., Hwangbo, H., Kim, Y. W., Kim, H. J., Park, K. H., Kim, Y. C., Seoung, K. Y. 2002. Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. *Korean J Soil Sci Fert*, 35, 59-67.

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), 87-92.

Kim, M. J., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Jeong, E. J., Kim, J. G., Lee, I. J. 2017. Plant growth-promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H- 2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(3), 571-580.

KLOEPPER, J.W., LEONG, J., TEINTZE, M., SCHROTH, M.N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Nature*. Vol. 286, n°1, p. 885-886. DOI 10.1038/286885a0.

KUMAR V. and N. Narula, 1999: Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 28,301-305.

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), 37-40.

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), 37-40.

Kundu B.S. and A.C. Gaur, 1980: Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant and Soil* 57,223-230.

LEINHOS V., 1994: Effect of pH and glucose on auxin production of phosphate solubilizing rhizobacteria *in vitro*. *Microbiological Research* 149, 1235-138.

Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., Goldstein, A. H. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5814-5819.

Lynch, J. P., & Brown, K. M. (2008). Root strategies for phosphorus acquisition. In P. J. White & J. P. Hammond (Eds), *the ecophysiology of plant-phosphorus interactions Plant Ecophysiology*, Vol. 7. Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp 83–116.

Maharajan, T., Ceasar, S. A., Ajeesh Krishna, T. P., Ramakrishnan, M., Durairamian, V., Naif Abdulla, A. D., Ignacimuthu, S. 2017. Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants. *Plant* 137(1), 10Breeding,–26.

Mahmoud S.A.Z., ABDEL HAFEx A.M., EL-SEG M. and E.A. HANEFY, 1973: Inorganic phosphate dissolving bacteria in the soils of Egypt and rhizosphere of broad bean and wheat. *Agrokem Talajtan* 22, 351-356.

Mara, P. R., Isabel, C. M. C. J., Luiz, C. R. S., Marcos, A. S., Flvia, D. P., Edson, L. S., Fabiano, G. S. 2014. Phosphate solubilization and phytohormone production by endophytic and rhizosphere *Trichoderma* isolates of guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). *African Journal of Microbiology Research*, 8(27), 2616–2623. doi:10.5897/ajmr2014.6633.

Mohamed, E. A., Farag, A. G., Youssef, S. A. 2018. Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* isolated from tomato plant rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 9(03), DOI: 10.4236/jep.2018.93018.

Neeru Narula 1, Kamlesh Kukreja, Vivek Kumar and K. Lakshminarayana (2002). Phosphate solubilization by soil isolates of *Azotobacter chroococcum* and their survival at different temperatures. *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics* Volume 103, No. 1, 2002' pP. 81 – 87

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, (6), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>.

Panigrahy, M., Rao, D. N., & Sarla, N. (2009). Molecular mechanisms in response to phosphate starvation in rice. *Biotechnology Advances*, 27, 389–397.

Prabhu, N., Borkar, S., Garg, S. 2019. Phosphate solubilization by microorganisms. *Advances in Biological Science Research*, 161– 176, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>.

Prabhu, N., Borkar, S., Garg, S. 2019. Phosphate solubilization by microorganisms. *Advances in Biological Science Research*, 161– 176, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>.

R. Chabot, H. Antoun, J.W. Kloepper, C.J. Beauchamp, Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2767- 2772.

Rfaki, A., Zennouhi, O., Aliyat, F. Z., Nassiri, L., Ibjbjen, J. 2020. Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in Moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*, 37(3), 230-241.

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

Saeid, A., Prochownik, E., Dobrowolska-Iwanek, J. 2018. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23(11), <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>.

SATTER M.A. and A.C. Gaur, 1987: Production of auxins and gibberellins by phosphate dissolving microorganisms. *Zentralbl Microbiology*, 142,393-395

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), 2133-2144.

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), 2133-2144.

SCHILLINGER ET F.K. LUKE, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ Microbiol.* 55(1989) 1901–1906.

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), <https://doi:10.1186/2193-1801-2-587>.

Shimizu, A., Kato, K., Komatsu, A., Motomura, K., & Ikehashi, H. (2008). Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.): Fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*, 117, 987–996.

SINGH C.P., MISHRA M.M. and K.S. YADAN, 1980: Solubilization of insoluble Phosphate by thermophilic fungi. *Annals of Microbiology* 131,289-96. Mishra M.M., PHOGAT V.K., SNEH GOYAL and K.S. YADAV, 1983: Solubilization of phosphorus from Mussoorie rock phosphate by *Aspergillus awamori* and humic substances. *Tropical Plant Science Research* 1,221-224.

Song, O. R., Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, S. C., Kim, K. K., Choi, Y. L. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 151-156.

SOUZA, R. de, AMBROSINI, A. et PASSAGLIA, L.M.P., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. In: *Genetics and Molecular Biology*. 2015. Vol. 38, p. 401 – 419.

Srishty, A. S. C., Kaur, P. 2019. Phosphate Solubilisation Potential of Screened Nitrogen Fixing *Rhizobium leguminosarum* Strains Isolated from Nodules of Pea Plant. *Ind. J. Pure App. Biosci*, 7(5), 360-363.

SURANGES. And N. Kumar, 1993: Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian Journal of Experimental Biology* 31, 855-857.

Valdes Lopez, O., & Hernandez, G. (2008). Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: What about legumes? *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1213–1222.

VESSEY, K., 2003. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. In: *Plant and soil*. 2003. Vol. 255, p. 571-586.

Vijayakshmi. Kairunnisa, S. Natarajan. 2016. Phosphate solubilization by rhizosphere Bacteria isolated from Rose garden soils of Satkhol, India, *J. Acad. Ind. Res.* 4(11), 243-245.

Wang, C., Ying, S., Huang, H., Li, K., Wu, P., & Shou, H. (2009). Involvement of OsSPX1 in phosphate homeostasis in rice. *Plant Journal*, 57, 895–904.

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., Chen, Q. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169(1), 76-82.