

République Algérienne Démocratique et  
Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et  
de la recherche scientifique

**UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1**



Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie  
Département de Biologie et Ecologie  
**Option Biotechnologie végétale**

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

République Française

Centre international d'études supérieures  
En sciences agronomiques



Ecole Doctorale: SIBAGHE (Systèmes Intégrés en  
Biologie, Agronomie, Géosciences,  
Hydrosciences, Environnement).  
**Option : Biologie Intégrative des Plantes**

### **THESE EN COTUTELLE**

**En vue de l'obtention de diplôme de Doctorat en Sciences**

## **Contribution des phytases bactériennes à l'adaptation de *Phaseolus vulgaris* à la faible disponibilité de phosphore en sols méditerranéens**

**Présentée par MAOUGAL Rim Tinhinen**

Membres du jury :

Examineur :	Nadia YKHLEF	Professeur à l'Université Constantine 1
Examineur :	Robin DUPONNOIS	Directeur de Recherche IRD Montpellier
Rapporteur:	Sidi Mohamed OUNANE	Professeur à l'ENSA. Alger.
Rapporteur:	Yvan MOENNE LOCCOZ	Professeur à l'Université Lyon 1
Directeurs de thèse :	Abdelhamid DJEKOUN	Professeur à l'Université Constantine 1
	Jean-Jacques DREVON	Directeur de Recherche. INRA. Montpellier

Année universitaire 2013-2014



A ma famille, petite et grande  
A mes parents qui ont toujours cru en moi  
A la mémoire de mes grands parents

## Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés en cotutelle à l'UMR Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des sols (Eco & Sol) à Montpellier et au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV) de l'université Constantine 1, avec le soutien financier du programme Averroès (Erasmus Mundus).

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes deux directeurs de thèse Monsieur Abdelhamid DJAKOUN, professeur à Constantine 1 et à monsieur Jean-Jacques DREVON, directeur de recherche à l'INRA de Montpellier qui m'ont offert l'opportunité de réaliser cette thèse dans leurs laboratoires respectifs, et pour m'avoir dirigé et encadré dans mon travail

Qu'il me soit permis d'adresser ma reconnaissance aux membres du jury. Merci au professeur Nadia Ykhlef d'avoir accepté d'être présidente du jury. Je remercie également le Pr. Sidi Ounane, le professeur Yvan Moenne Loccoz et le Dr. Robin Duponnois d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie également Madame Claude PLASSARD chargée de recherche à l'INRA Montpellier et monsieur Alain BRAUMAN directeur de recherche à l'IRD de Montpellier pour m'avoir aidé, soutenu et encouragé durant tout mon séjour à Montpellier et même après, pour le temps qu'ils m'ont consacré et leurs conseils avisés, merci encore.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse : Catherine, Helene, Josiane, Anne Laure, Laurie, Mr BELBEKRI, Ryma, merci au personnel administratif, de l'UMR : Farid, Corinne et Michelle, de SupAgro : Martine, et d'Averroès : Corinne pour leur aide lors de mon séjour à Montpellier.

Un grand merci à tous mes amis, pour leur aide, leur soutien : Arif, Adnane, Benoit, Julien, Anne-Laure, Elodie, Georg, Hesham, Nicolas, Patrice et Usman, merci pour votre soutien quand j'étais loin des miens ; Hania, Meriem, Najette, Sara, Soumeya merci d'avoir été toujours là



pour moi, vous êtes formidables, une pensée spéciale pour Maya ma comparse durant tout le long de cette thèse, pour les bons et les mauvais moments, sans oublier Radhia et Nassira. C'est une grande chance de vous avoir connu.

Ma gratitude va bien sur à Faouzi et Yasmin pour leur aide et leur soutien a ma chère belle mère aussi pour le temps qu'elle a consacré aux corrections.

Enfin merci a mes deux hommes pour leur amour et leurs précieux appuis



**Auteur :** Rim Tinhinen MAOUGAL

**Titre :** contribution des phytases bactériennes à l'adaptation de *Phaseolus vulgaris* à la faible disponibilité de phosphore en sols méditerranéens

**Directeurs de thèse :** Jean-Jacques DREVON et Abdelhamid DJEKOUN

---

## Résumé

Le phosphore (P) est souvent l'un des éléments les plus limitant pour la croissance des plantes du fait qu'il est peu mobile et le plus inaccessible dans les sols, spécialement dans les sols calcaires méditerranéens où sa rétention est élevée. Cette déficience en P affecte plus particulièrement les légumineuses à cause de la fixation symbiotique de l'azote qui consomme plus d'énergie que l'assimilation minérale. Ainsi des carences en P apparaissent au sein des cultures. Elles peuvent être levées avec des apports de fertilisants dérivés du phosphate. Mais ce n'est pas une ressource renouvelable. Dans ce contexte, nos objectifs ont été d'isoler et de caractériser la communauté bactérienne fonctionnelle du sol qui permet la minéralisation du phytate, forme majoritaire du P organique, en P minéral, forme assimilée par les plantes dans la rhizosphère du haricot. Les relations entre la croissance des plantes sous déficience en P, la mobilisation des bactéries dans leur rhizosphère et l'activité phytase ont été étudiées aux champs ou en conditions contrôlées. La densité de cette communauté fonctionnelle dans la rhizosphère du haricot est plus importante dans les environnements où le P est plus limitant. L'activité phytase a confirmé la capacité de ces isolats à minéraliser le phytate. Cette communauté fonctionnelle apparaît diversifiée dans les genres bactériens *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* et *Salmonella*. La RT-PCR *in situ* de gènes phytase BPP a montré la localisation des bactéries sur les racines avec un signal intense sur l'extrémité des racines. L'ensemble de ces résultats met en évidence que la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant le phytate apparaît stimulée en condition de déficience en P. Ils suggèrent de nouvelles perspectives pour améliorer l'utilisation du P organique pour la nutrition phosphatée des légumineuses.

**Mots clés :** activité phytase, communauté bactérienne fonctionnelle, *Phaseolus vulgaris*, phytate, rhizosphère.





**Author:** Rim Tinhinen MAOUGAL

**Title:** contribution of bacterial phytases to adaptation of *Phaseolus vulgaris* in low availability of phosphorus in mediterranean soils

**Ph.D Supervisors:** Jean-Jacques DREVON et Abdelhamid DJEKOUN

---

### **Abstract**

Phosphorus (P) is often one of the most limiting factors for plant growth because of its low mobility and inaccessibility in most soils, especially in the Mediterranean calcareous soils where retention of P is high. This P deficiency affects more particularly legumes because symbiotic nitrogen fixation consumes more energy than mineral assimilation. P deficiencies appear within cultures. They can be removed with inputs of phosphate fertilizers. But this is not a renewable resource. In this context, our objectives were to isolate and characterize the functional bacterial soil community that allows mineralization of phytate, major form of organic P, in inorganic P assimilated by plants in the bean rhizosphere. The relationship between plant growth under P deficiency, the mobilization of bacteria in their rhizosphere and phytase activity were studied in the field or under controlled conditions. The density of this functional community in the rhizosphere of beans is more important in environments where P is the most limiting and phytase activity has confirmed the ability of these isolates to mineralize phytate. This functional community appears in diverse bacterial genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* and *Salmonella*. *In situ* RT-PCR for gene phytase BPP showed the localization of bacteria on the roots with a strong signal on the root tip. Taken together, these results highlight the functional bacterial community mineralizing the phytate appears stimulated under condition of P deficiency. They suggest new opportunities for improving the use of organic P to P nutrition of legumes.

**Keywords:** phytase activity, functional bacterial community, *Phaseolus vulgaris*, phytate, rhizosphere.



المحرر معقال ريم تتهينان

العنوان مساهمة انزيم الفيتاز المستنتجة من طرف بكتيريا التربة لتكيف نبات الفصوليا انقص الفوسفور في التربة  
حوض البحر المتوسط

المؤطرين جون جاك دروفون عبد الحميد جكون

## ملخص

عنصر الفوسفور (P) في الكثير من الأحيان احد من العوامل المحددة لنمو المحاصيل لأنه منخفض التنقل و يتعذر الوصول إليه في معظم أنواع التربة، خصوصا في التربة حوض البحر الأبيض المتوسط حيث استبقاء عاليه عالي يؤثر هذا النقص في P أخصا على البقوليات بسبب تثبيتها لنيتروجين الذي يكلف استهلاك طاقة أكثر من الاستيعاب المعدني. و تظهر هذه القصور في P داخل المحاصيل ويمكن إزالتها مع زيادة الأسمدة الفوسفاتية ولكن هذا ليس مورد متجدد.

في هذا السياق، كانت أهدافنا عزل وتوصيف للعشائر البكتيرية الوظيفية لتربة التي تسمح تمعدن الفيتات ، كشكلا رئيسيا من أشكال P العضوي إلي شكله المعدني المستعاب من قبل النباتات و ذلك في rhizosphère الفاصوليا. لعلاقة بين نمو النبات تحت نقص P ،تحريك العشائر البكتيرية الوظيفية في rhizosphère الفاصوليا و فهم نشاطها الإنزيمي phytase الذي يسمح تحليل الفسفور من عضوي إلي شكله المعدني تمت دراستها على نمو نبات الفاصوليا وذلك من خلال إجراء عدة تجارب في البيوت الزجاجية و الحقل وفقا لنتائجنا كثافة هذا العشائر وظيفية في rhizosphère الفاصوليا هي أكثر أهمية في بيئات حيث P محدد . يظهر ان في هذه العشائر البكتيرية أجناس بكتيرية متنوعة من بين *Pseudomonas, Pantoea, Enterobacter et Salmonell* . بالإضافة إلى ذلك أظهرت RT-PCR الجين phytase BPP توطين البكتيريا على الجذور مع إشارة قوية على طرف الجذر.

استنادا علي هذه الدراسة فإننا نستنتج أن العشائر البكتيرية الوظيفية الخاصة بتحويل الفسفور من صفته العضوية إلي المعدنية phytate يظهر تحت حالة نقص P تشير هذه النتائج .لدور المحتمل لهذه العشائر الوظيفية في توفر P التربة الزراعية. هذه النتائج تشير إلى فرص جديدة لتحسين استخدام P العضوي للتغذية P البقوليات

الكلمات المفتاحية - إنزيم phytase - نشاط إنزيمي - عشائر البكتيريا الوظيفية - rhizosphère - الفاصوليا



## Sommaire

<b>Introduction generale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : synthèse bibliographique</b> .....	<b>4</b>
I-1- rhizosphere et communauté bactérienne rhizosphérique	4
I-1-1- rhizosphère.....	4
I-1-2- diversité bactérienne de la rhizosphère.....	5
I-1-3- les PGPR (plant growth–promoting rhizobacteria).....	6
I-1-4- la rhizodéposition.....	7
I-1-5- effet rhizosphère.....	9
I-1-6- conséquences de l'effet rhizosphère pour les microorganismes.....	10
I-1-7- conséquences de l'effet rhizosphère pour les plantes.....	10
I-2- le phosphore, un élément essentiel dans la nutrition des plantes.....	10
I-2-1- le phosphore dans la nature.....	11
I-2-2- réponse de la plante à une déficience en P.....	12
I-2-3- nature et formes du phosphore dans le sol.....	13
I-2-3-1- le P minéral.....	14
I-2-3-2 le P organique, une solution d'avenir pour la nutrition des plantes ?.....	15
I-2-4 le phytate.....	18
I-2-5- nomenclature et terminologie du phytate.....	19
I-2-6- le phytate dans les sols :.....	19
I-3- phytate et communauté microbienne rhizosphérique.....	20
I-3-1- Les phytases, enzymes clés du cycle du P.....	20
I-3-2- caractéristiques des phytases.....	21
I-3-3- nomenclature et classification des phytases.....	22
I-3-3-1- la classe des histidines acides phosphatases (haps) :.....	24
I-3-3-2- la classe des $\beta$ -propeller phytase (bpp) :.....	24
I-3-4- rôle des phytases.....	25
I-4- plante modèle: <i>Phaseolus vulgaris</i> , le haricot commun.....	26
I-4-1- taxonomie du haricot et description morphologique:.....	26
I-4-2- importance du haricot.....	27
I-4-3- déficience en P et haricot :.....	27
I-5- Références.....	28



<b>Chapitre II : bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) under p deficiency .....</b>	<b>44</b>
II.1. Introduction .....	47
II.2. Materials and methods .....	49
II.2.1. Plant growth conditions and soil sampling .....	49
II.2.2. Enumeration and isolation of total cultivable bacteria and phytate-utilising bacteria....	49
II.2.3. DNA extraction and sequence analysis of 16s rDNA gene .....	50
II.2.4. Phytase assays .....	51
II.2.5. Statistical analysis .....	52
II.3. Results .....	52
II.3.1. Isolation of total cultivable bacteria and phytate-utilising bacteria .....	52
II.3.2. Identification of true phytate–mineralizing bacterial isolates.....	53
II.3.3. Physiology of isolates in liquid medium.....	55
II.3.4. Phytase activity .....	58
II.4. Discussion.....	58
<b>Chapitre III: la faible disponibilité en P stimule les des activités phytase de la rhizosphère de <i>Phaseolus vulgaris</i> dans l'agro-écosystème de sétif .....</b>	<b>67</b>
VI.1. Introduction .....	70
VI.2. Matériel et methodes.....	72
VI.2.1. Matériel végétal et conditions de culture .....	72
VI.2.2. Dénombrement des bactéries totales et phytasiques .....	72
VI.2.3. Analyses physico-chimiques des sols .....	73
VI.2.4. Dosage d'activité phytase .....	74
VI.2.5. Dosage de p assimilable des sols .....	75
VI.2.6. Récolte des plantes, paramètres mesurés et analyse statistique .....	76
VI.3.Resultats.....	76
VI.3.1. Dénombrement bactérien et activités phytase des sols.....	76
VI.3.2. Libération de pi dans le milieu de culture.....	78
VI.3.3. Croissance des plantes et nodulation.....	81
VI.4.discussion .....	83
<b>Chapitre IV :localization of the <i>Bacillus subtilis</i> beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of phaseolus vulgaris supplied with phytate.....</b>	<b>88</b>
III.1. Introduction.....	91
III.2. Materials and methods .....	93
III.2.1.plant material and growth conditions.....	93





III.2.2.root preparation for enumeration of bacteria and gene localization .....	94
III.2.3. <i>in situ</i> RT-PCR of beta propeller phytase transcripts .....	94
III.2.4.measurement of plant growth, nodulation, p concentration and statistical analysis .....	96
III.3. Results .....	96
III.3.1.localization of the bpp transcripts.....	96
III.3.2.enumeration of <i>B. Subtilis</i> on the root surface .....	97
III.3.3.nodulation, growth and p use efficiency of plants.....	99
III.4. Discussion .....	101
<b>Conculsion générale et perspectives .....</b>	<b>108</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure. I. 1 schéma de la rhizosphère (Gobat <i>et al.</i> , 2004)	4
Figure. I. 2 : interaction des PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Richardson <i>et al.</i> , 2009a)	7
Figure. I. 3 : morphologie et production de la racine.	8
Figure. I. 4 cycle du phosphore (anonyme 2013)	12
Figure. I. 5 la dynamique du phosphore dans le sol (d'après Gros, 1979)	14
Figure. I. 6 influence du pH sur la solubilité du P dans le sol (Parent <i>et al.</i> , 2002)	14
Figure. I. 7 évolution de la production de fertilisants phosphatés depuis 20e siècle, et stimulation de l'évolution future prévoyant un pic de production lié à l'épuisement rapide des gisements de phosphates naturels (Cordell <i>et al.</i> , 2009)	17
Figure. I. 8 cycle biogéochimique de l'inositol phosphate dans le système terrestre (modifié de Turner <i>et al.</i> , 2002a)	18
Figure. I. 9: catégories de phytases : Classification, spécificité et produit final de différentes phytases (d'après Oh <i>et al.</i> , 2004; Vats et Banerjee, 2004).	23
Figure. II.1. Enumeration of bacterial CFU per gram dry weight from bulk soil (white bars) or rhizosphere soil (grey bars) from <i>Phaseolus vulgaris</i> on LB medium (a) and Angle medium (b).	52
Figure. II. 2. Duration of lag phase for Pi release (a) and rate (b) of Pi release by bacteria grown in liquid medium containing phytate as the sole source of P.	56
Figure III. 1 Carte géographique de la région de Sétif et position des placettes étudiées. La localité de Kasr el abtal (placette 6) (a) et la localité de l'Hamiat (placette 1) (b)	72
Figure.III 2 Densité des colonies bactériennes en UFC par g de sol sec au niveau du sol non rhizosphérique (□) et du sol rhizosphérique (■) pour les génotypes 115 et 147 de <i>Phaseolus vulgaris</i> sur milieu LB (a) et milieu Angle (b) en P suffisant (Placette 6) et P déficient (Placette 1). Les données sont les moyennes de trois répétitions récoltées au stade floraison des plantes.	77
Figure III.3 Activités phytase des sols rhizosphériques de deux génotypes de haricot cultivés sous sol suffisant (□) en P ou sol déficient (■) en P. Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison des plantes.	78
Figure III.4. Taux de Pi produit (■) durant le temps de croissance (□) des bactéries isolées du sol non rhizosphérique (a) et de la rhizosphère (b) du génotype 115 de <i>phaseolus vulgaris</i> . Les données sont les moyennes de trois répétitions.	80



- Figure III.4. bis. Taux de Pi produit (■) durant le temps de croissance (□) des bactéries isolées du sol non rhizosphérique (a) et de la rhizosphère (b) du génotype 147 de *phaseolus vulgaris*. Les données sont les moyens de trois répétitions. **81**
- Figure III.5 Biomasse de la partie aérienne (a), racinaire (b) et nodulaire (c) des génotypes 115 et 147 de haricot cultivés sous sol suffisant (□) ou déficient (■) en P. Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison des plantes. **82**
- Figure IV. 1 *In situ* localization of beta propeller phytase (BPP) transcripts (white arrowheads) in roots of common bean RIL147 inoculated with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium tropici* CIAT 899 grown under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phytate **97**
- Figure IV. 2 Intensity of bacterial colonization in the different root parts (left panel) of common bean RIL147 grown under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phytate inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899 and with (a, b, c) or without (a', b', c') *Bacillus subtilis* **98**
- Figure IV.3 Biomass (a) and number (b) of nodules in common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). **99**
- Figure IV. 4 Biomass of shoot (a) and root (b) of the common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). **100**
- Figure IV. 5 Shoot phosphorus accumulation (a) and phosphorus use efficiency (b) of the common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). **101**



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau. I.1. Tableau récapitulatif des principaux composés naturels de P organiques pouvant être présents dans l'environnement (d'après Turner <i>et al.</i> , 2005)	<b>16</b>
Tableau. I.2. le myo-inositol phosphates et ces abréviations les plus courantes	<b>19</b>
Table. II. 1. Description of bacterial isolates able to grow in liquid medium containing phytate as the sole source of P.	<b>54</b>
Tableau. III.1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol déficient en P (Site 1) ou suffisant en P (Site 6).	<b>73</b>
Tableau. III. 2: Fréquence des bactéries: nombre d'isolat positif (nbr bact +) et nombre total d'isolats testés (Total) et proportion d'isolat positif (%) pour la libération de Pi selon la RIL (115 versus 147) et la fraction du sol rhizosphérique (R) versus sol non rhizosphérique (B)	<b>79</b>





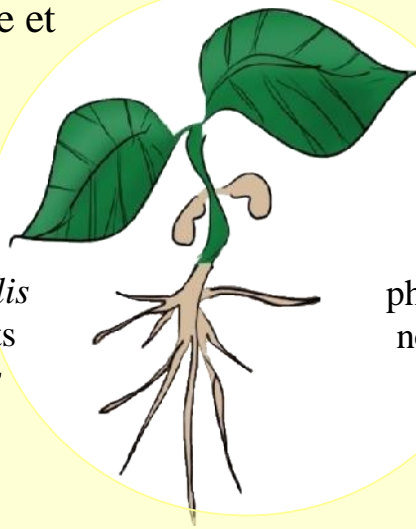
# Introduction générale

Chapitre 1 : revue  
bibliographique

Conclusion générale et  
perspectives

Chapitre 4

Localization of the *Bacillus subtilis*  
Beta-propeller phytase transcripts  
in nodulated-roots of *Phaseolus*  
*vulgaris* supplied with phytate.



Chapitre 2  
Bacterial capacities to mineralize  
phytate increase in the rhizosphere of  
nodulated common bean (*Phaseolus*  
*vulgaris*) under P deficiency

Chapitre 3 La faible disponibilité  
en P stimule les activités phytase de  
la rhizosphère de *Phaseolus*  
*vulgaris* dans l'agro-écosystème de  
Sétif



---

## INTRODUCTION GENERALE

---

Dans le bassin méditerranéen, différentes contraintes abiotiques concourent à la dégradation des terrains agricoles. Les principales contraintes sont la sécheresse, la salinité et les déficiences en éléments minéraux tels que l'azote (N) et le phosphore (P). Ce dernier, depuis l'avènement de la culture intensive, est devenu élément limitant de la croissance (Frossard *et al.*, 1995, Hinsinger, 2001). Il fait parti des éléments les plus ajoutés comme fertilisants or il est issu de ressources non renouvelables et entraine une eutrophisation des eaux douces en cas de mauvaise gestion de la fertilisation en P.

La faible disponibilité en P affecte les cultures et particulièrement les légumineuses qui possèdent de forts besoins en phosphore notamment le haricot (CIAT, 1987, Graham et Vance, 2003). La sensibilité des légumineuses à sa déficience à été largement documentée et elle est généralement attribuée à la grande quantité de rotation de carbone et d'énergie P-dépendante requise dans le métabolisme (Schulze et Drevon 2005).

En outre, la déficience en P assimilable caractérise les sols méditerranéens à cause de sa précipitation par les ions calciques et métalliques. Sous ces conditions, la fixation symbiotique de l'azote (FSN) est souvent inhibée chez la symbiose haricot-rhizobia qui demeure la plus sensible au déficit en P en comparaison avec d'autres symbioses rhizobiennes (Graham et Vance, 2003). Dans ce contexte, de nombreuses études agronomiques ont mis en évidence des exigences élevées en P pour les légumineuses dépendantes de la FSN par rapport à des plantes dont la croissance est assurée par la fertilisation minérale.

L'orthophosphate (Pi :  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), forme soluble, est la seule forme de P absorbé par les plantes, or la forme de P majoritaire dans le sol est une forme organique indisponible pour la nutrition phosphatée des plantes (Barber, 1984, Turner *et al.*, 2005). Le P organique est composé principalement par du Phytate (myo-inositol hexakisphosphate (IP6)), et l'utilisation directe du phytate par les plantes n'étant pas possibles, l'intervention de micro-organismes ayant la capacité de le solubiliser est essentielle pour assurer sa minéralisation grâce aux enzymes qu'elles secrètent : les phytases.



Les phytases éliminent successivement les groupes phosphate du *myo*-inositol 1, 2, 3, 4,5, 6- hexakisphosphate (phytates), et ont la capacité de rendre le phosphore du phytate disponible aux plantes. Cet effet bénéfique de l'activité phytase extracellulaire a été trouvé chez plusieurs bactéries du sol telles que *Pseudomonas* (Irving et Cosgrove, 1971), *Klebsiella* (Greiner *et al* 1997) et *Bacillus* spp. (Kerovuo *et al* 1998). L'activité phytase des bactéries de la rhizosphère des plantes peut ainsi contribuer à un effet favorisant leur croissance végétale (Idriss *et al.*, 2002; Sajidan *et al.*, 2004).

L'objectif global de ma thèse est de caractériser la communauté bactérienne fonctionnelle impliquée dans le processus de minéralisation du phosphore organique en phosphore minéral, au sein d'environnements rhizosphériques de géotypes de haricot présentant des demandes contrastantes en phosphore. Ce travail de thèse a permis de caractériser la communauté bactérienne fonctionnelle impliquée dans la minéralisation du P organique dans les sols (**Chapitres II et III**) d'étudier leur efficacité à solubiliser le phytate et d'ajuster la méthode de dosage de l'enzyme responsable de la minéralisation du P (**Chapitre II**). Nous avons comparé également la structure de ces communautés bactériennes fonctionnelles issues de la rhizosphère de plantes présentant des demandes en phosphore contrastées et dans des sols déficient et suffisant en P (**Chapitre III**). Afin de mieux comprendre l'induction de cette activité chez les bactéries telluriques, nous avons observé leur degré de colonisation des racines et l'association de cette dernière avec l'expression du gène BPP de la bactérie (**Chapitre IV**).

## Références

- Barber SA (1984). Phosphorus. In: Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. A Wiley Interscience Publication, John Willey & Sons, New York, 201-228.
- CIAT (1987) CIAT annual report, 1986. CIAT, Cali, Colombia.
- Frossard E, Brossard M, Hedley MJ et Metherell A (1995) Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessen H Eds, Phosphorus in global environment, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 108-137.



- Graham PH et Vance CP (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Physiol Plant* 3: 872–877
- Greiner RE, Haller U, Konietzky et Jany KD (1997) Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Bio-phys.* 341:229–248.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173-195.
- Idriss EEO, Makarewicz A, Farouk K, Rosner R, Greiner H, Bochow T, Richter et R Borriss (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth promoting effect. *Microbiology* 148:2097–2109.
- Irving GJC et Cosgrove DJ (1971) Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* 24:547–557
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N et Apajalahti J (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2079–2085
- Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Müller E.-C, et Borriss R (2004) Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:110–118)
- Schulze J et Drevon J-J (2005) P-deficiency increases the O<sub>2</sub> uptake per N<sub>2</sub> reduced in alfalfa. *J. Exp Bot* 56:1779–1784
- Turner BL, Frossard E et Baldwin DS (2005) Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, Cambridge, USA, 399 p.

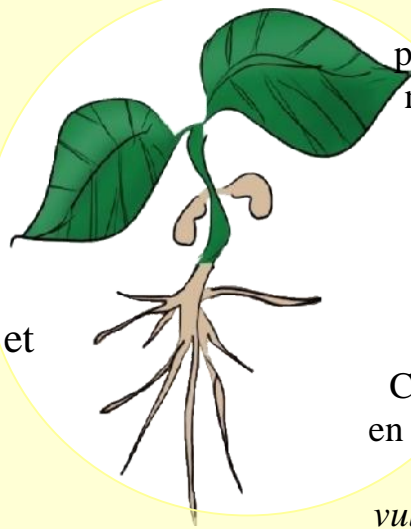




# Chapitre 1 : revue bibliographique

Introduction  
générale

Conclusion générale et  
perspectives



Chapitre 2  
Bacterial capacities to mineralize  
phytate increase in the rhizosphere of  
nodulated common bean (*Phaseolus  
vulgaris*) under P deficiency

Chapitre 3 La faible disponibilité  
en P stimule les activités phytase de  
la rhizosphère de *Phaseolus  
vulgaris* dans l'agro-écosystème de  
Sétif

Chapitre 4  
Localization of the *Bacillus subtilis*  
Beta-propeller phytase transcripts  
in nodulated-roots of *Phaseolus  
vulgaris* supplied with phytate.



---

## Chapitre I Synthèse bibliographique

---

### I-1-Rhizosphère et communauté bactérienne rhizosphérique

#### I-1-1-Rhizosphère

Le terme rhizosphère a été introduit dès 1904 par le biologiste allemand Hiltner, il représente un compartiment d'intérêt majeur (Marilley *et al.*, 2007), qui peut être défini comme étant la zone du sol qui entoure les racines de la plante (figure 1) et qui est soumise directement ou indirectement à leur influence (Gobat *et al.*, 2004, Richardson *et al.*, 2009a). L'environnement de la rhizosphère n'est pas homogène, mais il constitue une mosaïque d'habitats avec, pour chacun, des populations bactériennes propres, cette zone est composée (Davet., 1996) :

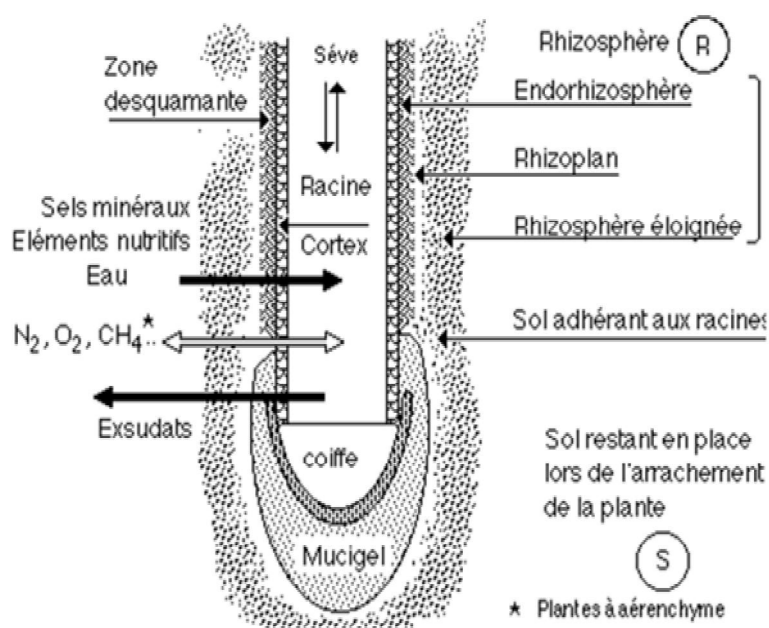


Figure. I. 1 schéma de la rhizosphère (Gobat *et al.*, 2004)

**Du rhizoplan** : considéré comme l'interface racine et sol, c'est la surface de la racine constituée des hyphes mycéliennes et des colonies bactériennes fortement adhérentes.



**De l'endorhizosphère :** le terme endorhizosphère désigne l'intérieure de la racine y compris cortex racinaire, épiderme et poils racinaires (Balandreau et Knowles, 1978). Il évoque le passage graduel du sol à l'intérieur de la racine : c'est l'introduction des champignons et bactéries dans les cellules du parenchyme cortical de la plante, utilisant ses exsudats sans provoquer de lyse cellulaire.

**De l'exorhizosphère :** c'est le sol adhérent à la partie racinaire de la plante.

### **I-1-2-Diversité bactérienne de la rhizosphère**

Un grand nombre d'organismes macroscopiques et microscopiques tels que les protozoaires, les algues, les bactéries et les champignons, coexistent dans la rhizosphère. La communauté la plus importante est la communauté bactérienne. Les exsudats racinaires relâchés dans le sol par les plantes attirent les bactéries (Lynch, 1990) en créant un environnement de diversité très sélectif (Marilley et Aragno, 1999; Lucas Gracia *et al.*, 2004 ; Barriuso *et al.*, 2005). Ainsi un gramme de sol sec peut contenir de  $10^7$  jusqu'à  $10^{10}$  de bactéries correspondant à des milliers de différentes espèces (Gobat *et al.*, 2004).

Les racines induisent des changements dans le sol environnant qui conduisent à l'adaptation des communautés bactériennes du sol et à la sélection de communautés spécifiques constituées par les populations de bactéries les plus compétentes (Gobat *et al.*, 2004).

D'une manière générale, une communauté bactérienne correspond à l'ensemble des populations bactériennes dans un habitat donné. Chaque membre de la communauté prend part à un système d'interaction complexe existant dans la rhizosphère entre le sol et les plantes. L'ensemble des espèces sera en mesure de réagir aux modifications environnementales biotiques et abiotiques en ajustant l'activité et l'abondance des populations différentes (proportions d'espèces), ou en modifiant leurs capacités (plasticité génétique) afin de préserver l'équilibre dynamique du système. L'importance de la rhizosphère est variable selon le sol, la plante et le stade de développement de la plante (Czarnes, 1998).

La composition de la communauté bactérienne dans la rhizosphère peut affecter la disponibilité du phosphore pour les plantes (Marschner *et al.*, 2006).



Toutefois, peu d'études démontrent l'efficacité des populations bactériennes liées à la rhizosphère en conditions de stress phosphaté.

### **I-1-3- Les PGPR (Plant Growth–Promoting Rhizobacteria)**

Dans la rhizosphère, sur ou aux environs des racines des plantes les bactéries sont le plus souvent organisées en colonies (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Certaines de ces bactéries ne se contentent pas seulement de vivre sur les sécrétions racinaires, elles ont une influence bénéfique sur les plantes pouvant se traduire par une stimulation de leur croissance (Curl et Truelove 1986; Bowen et Rovira 1999; Mukerji *et al.* 2006; Brimecombe *et al.* 2007) ce sont les PGPRs.

Les PGPRs (plant-growth-promoting rhizobacteria) sont des bactéries libres dans la rhizosphère (Kloepper *et al.*, 1989), ces bactéries peuvent induire une amélioration de la croissance par un mode d'action direct ou indirect (figure I.2). Certaines stimulent la croissance des plantes par un effet de bio fertilisation et/ou phytostimulation (mode d'action direct); ces augmentations de croissance s'expliquent généralement par une meilleure nutrition de la plante en augmentant les prélèvements et l'assimilation des éléments nutritifs par la plante, grâce à des voies de signalisation entre la plante et la PGPR, ainsi que par une production de phytohormones par les PGPR conduisant à une amélioration de la croissance de la plante (Beauchamp, 1993).

D'autres bactéries stimulent la croissance des plantes par un effet de bio-contrôle (mode d'action indirect) (figure I.2) (Bashan et Holguin 1998; Raaijmakers *et al.*, 2009; Harman *et al.*, 2004). Ces modes d'action indirects sont attribués généralement aux phénomènes de compétition, de résistance systémique induite et de production d'enzymes et d'antibiotiques qui participent à protéger la plante contre les microorganismes pathogènes, ce qui mène indirectement à une stimulation de la croissance de la plante (Beauchamp, 1993).





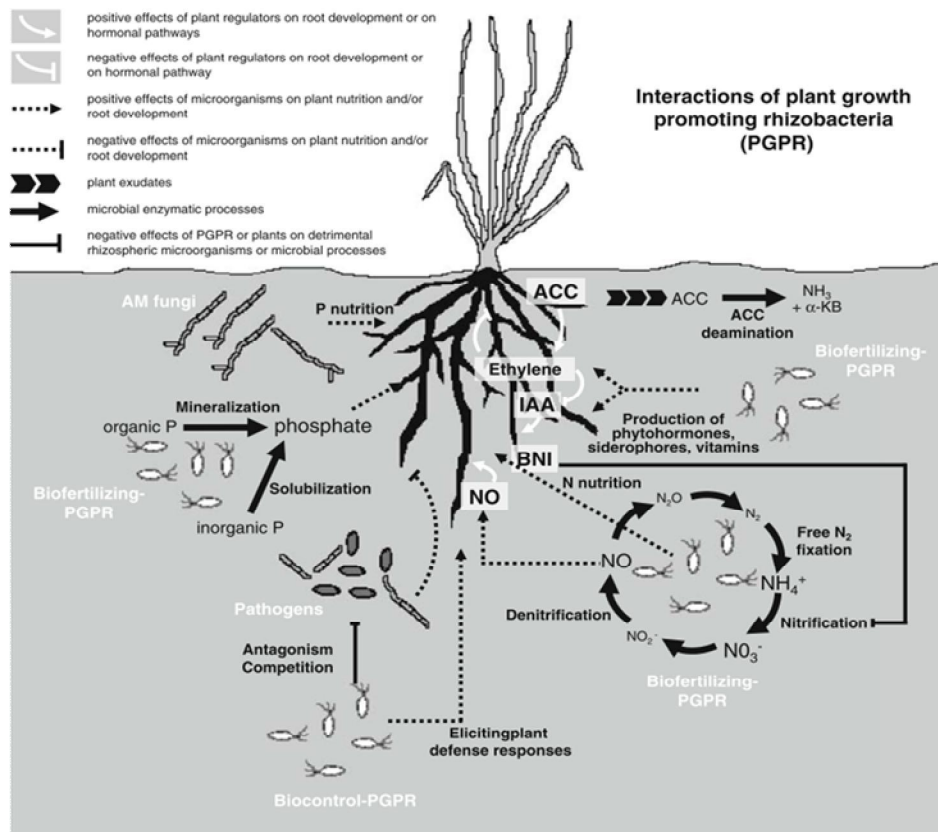


Figure. I. 2 : interaction des PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Richardson *et al.*, 2009a)

Les PGPRs comprennent des formes représentatives des différentes taxa bactériens (Vessey, 2003 ; Lucy *et al.*, 2004). Parmi ces formes on trouve les genres diazotrophiques tel que *Azospirillum*, les bacilli tel que *Bacillus*, les pseudomonads tel que *Pseudomonas* dont l'espèce *fluorescences* qui montre une activité phytase et libère 81% de Phosphore à partir de l'inositol hexaphosphate (Antoun et Prevost, 2005), et certaines souches des rhizobia, sont considérées comme des PGPRs lorsque elles ont la capacité à stimuler la croissance des plantes non légumineuses.

#### I-1-4- La rhizodéposition

La rhizodéposition consiste en une substance libérée dans le milieu extérieur de la plante par les racines après l'assimilation des composés photosynthésés dans les cellules de la plante. Elle constitue un complexe de composés organiques et inorganiques résultant du métabolisme cellulaire (Hinsinger, 1998).



Les exsudats racinaires (Figure I.3) sont majoritairement des acides organiques, des enzymes, des ions inorganiques, mais ce sont également des sucres, des acides aminés, des phénols, des vitamines, des purines, et des nucléosides. Ils vont avoir un effet direct ou indirect sur l'acquisition des éléments minéraux nutritifs nécessaires à la croissance de la plante et des microorganismes (Dakora et Phillips, 2002, Jones *et al.*, 2004 ; Bais *et al.*, 2006).

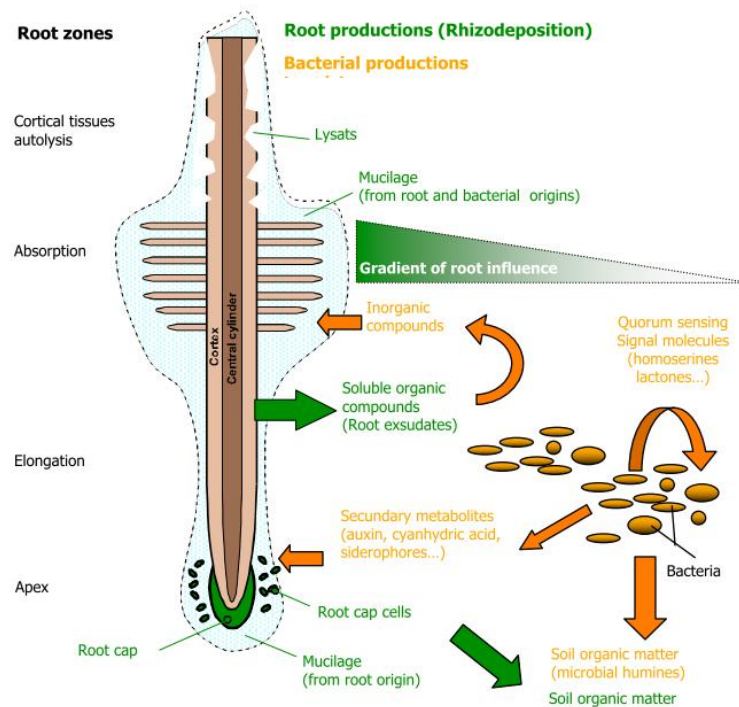


Figure. I. 3 : morphologie et production de la racine.

Morphologie de la racine, rhizodéposition (vert), principale production bactérienne (orange) impliquée dans la croissance et la résistance des plantes (Jossi, 2008)

Cet apport trophique des racines à la rhizosphère résulte des trois processus suivants (Davet., 1996) :

**L'exsudation** : qui est la diffusion passive hors des cellules de composés solubles de faibles poids moléculaires, tels que : les sucres ou les acides aminés.

**La sécrétion et l'excrétion** : qui est un processus actif, qui consomme de l'énergie et concerne les composés de poids moléculaires élevés, tels que les enzymes et le mucilage.



**La lyse** : qui est la dégénérescence rapide des cellules de la coiffe et des poils absorbants donnant ainsi une quantité importante de matière organique.

La nature et l'abondance de la rhizodéposition dépendent du génome de la plante et de son stade de développement, et sont de ce fait affectées par tous les événements susceptibles de modifier le fonctionnement de la plante : modification de la luminosité, température, disponibilité de l'eau, carences minérales, potentiel d'oxydo-réduction. Ainsi, lorsque la température du sol est portée à 37°C, l'exsudation racinaire augmente dans les racines du haricot tandis qu'elle diminue dans les racines du pois (Davet., 1996)

Les rôles fonctionnels des exsudats racinaires dans la rhizosphère ont été étudiés (Jones *et al.*, 2004). Les hydrates de carbonnes, les acides organiques, les acides aminés et les purines procurent nutriments, source d'énergie et une augmentation de la croissance des microorganismes (Deubel *et al.*, 2000). Ces substances organiques constituent non seulement une source d'énergie et de nutriments pour les microorganismes de la rhizosphère mais elles sont également responsables du chimiotactisme des organismes envers les racines (de Weert *et al.*, 2002 ; Bauer et Caetano-Anolles, 1990).

### **I-1-5-Effet rhizosphère**

Des études portant sur les communautés microbiennes montrent une augmentation de l'effectif des microorganismes présents dans la rhizosphère, a proximité des racines. Ce phénomène est communément désigné sous le terme «d'effet rhizosphère» (Lynch et Whipps, 1990 ; Merbach *et al.*, 1999).

Une grande quantité de composés organiques est libérée par les racines dans le sol environnant, ces composés peuvent être utilisés par des microorganismes comme source de carbone et d'énergie. En plus de l'effet sélectif dû à l'enrichissement du sol en composés organiques par des exsudats racinaires, les plantes exercent un autre effet sélectif sur la communauté bactérienne par la sécrétion de composés spécifiques inhibant la croissance bactérienne (Latour *et al.*, 1996; Lemanceau *et al.*, 1995).



Des études ont reporté que l'effet rhizosphère augmente la densité bactérienne, et réduit la diversité des bactéries dans la rhizosphère par rapport à la masse du sol (Marilley *et al.*, 1998, Kuzyakov, 2002; Tarnawski *et al.*, 2003).

#### **I-1-6- Conséquences de l'effet rhizosphère sur les microorganismes**

L'effet rhizosphère est déterminé en grande partie par la libération de rhizodéposition (Stengel et Gelin, 1998) ; En conséquence les sources organiques d'azote, de carbone, de phosphore disponible stimulent le développement de la communauté bactérienne (Latour *et al.*, 1996). Néanmoins, la compétition pour les minéraux solubles est intense, et les richesses de la rhizosphère ne sont pas réparties équitablement entre tous les microorganismes du sol. Malgré cela ces microorganismes ont une activité métabolique élevée et se multiplient rapidement. (Davet., 1996)

#### **I-1-7- Conséquences de l'effet rhizosphère sur les plantes**

L'activité rhizosphérique entraîne une meilleure assimilation des éléments minéraux par les plantes. Ainsi, l'énergie fournie par la rhizodéposition permet l'accroissement de la biomasse microbienne, puis la prolifération des prédateurs. Ce qui induit une activité enzymatique qui facilite la lyse des cellules desquamées des racines et la biodégradation de la matière organique du sol, en composées assimilables par la plante après minéralisation des éléments tels que le phosphore. (Davet., 1996)

### **I-2- le phosphore, un élément essentiel dans la nutrition des plantes**

Le Phosphore (P) est un élément essentiel à tous les organismes vivants. Chez les végétaux il joue un rôle indispensable dans de nombreux processus biologiques comme la croissance, la photosynthèse et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Marschner, 1995). Il entre dans la composition de l'ADN ainsi que dans celle de l'ARN. Il est également impliqué dans les transferts d'énergie à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de molécules telles que l'ATP. Enfin, il entre dans la composition des phospholipides qui contrôlent la stabilité et les propriétés





des membranes cellulaires (Marschner, 1995). En agronomie le phosphore est l'élément le plus important après l'azote.

### **I-2-1-Le phosphore dans la nature**

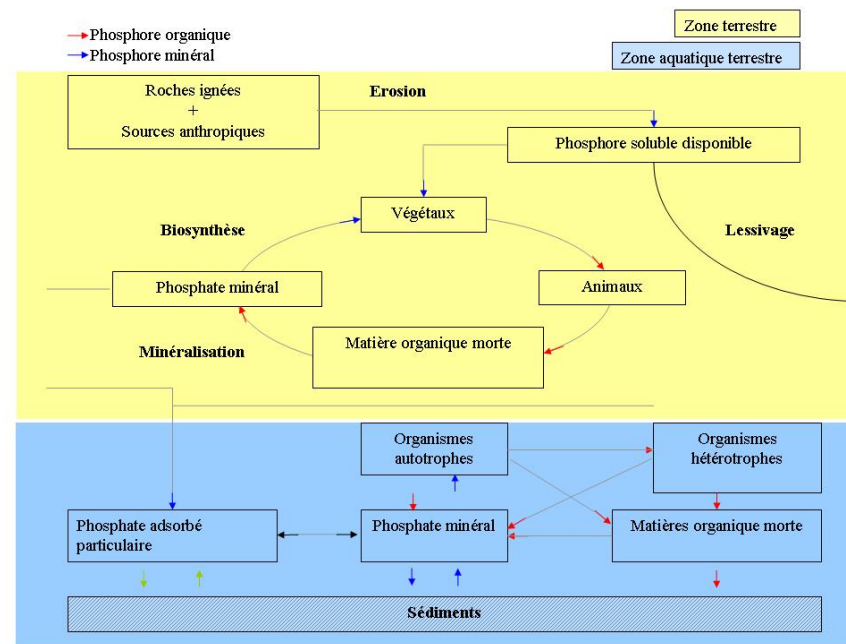
Le phosphore est un constituant des roches. Les teneurs habituelles sont de 3 à 10% de  $P_2O_5$  dans les roches éruptives et de 0.5 à 3 % dans les roches sédimentaires. Sur 1 à 2 m de profondeur, le sol contient plusieurs tonnes à l'hectare de  $P_2O_5$  sous forme d'orthophosphates ( $PO_4^{3-}$ ), qui sont soit cristallisés (avec Ca, Fe, Al), soit liés aux argiles ou la matière organique (Frossard *et al.*, 2004)

Les teneurs en phosphore sont exprimées en  $P_2O_5$  et non en P. certains auteurs anglophones utilisent « P » comme unité bien que traditionnellement l'usage est de  $P_2O_5$ , et que cette forme n'existe ni dans les engrais, ni dans le sol, ni dans la plante.

Les plantes absorbent l'ion  $PO_4^{3-}$  à partir de la solution du sol, qui en contient une quantité très faible mais qui se renouvelle rapidement, par solubilisation des autres formes et par minéralisation de la matière organique. Les racines peuvent augmenter la solubilisation dans la rhizosphère, en modifiant le pH ou en excréant des acides organiques (Guivarch, 2001, Morel, 2002). Les racines fines et les poils absorbants, qui offrent une surface de contact importante avec le sol, permettent une absorption plus efficace du phosphore (Li *et al.*, 2003 ; Ström *et al.*, 2005).

Le cycle du P comprend des compartiments permettant de représenter la dynamique du P (Figure I.4)





**Figure. I. 4 cycle du phosphore (anonyme 2013)**

Le P est présent en faibles concentrations dans la plupart des sols (Bielecki 1973; Hinsinger 2001; Raghothama 1999; Vance *et al.* 2003). Il est le moins mobile des éléments nutritifs dans le sol (Hinsinger, 2001), ceci est dû à la réactivité des ions phosphate vis à vis de nombreux constituants du sol et à la rétention du phosphore par les phases solides du sol (Hinsinger 2001).

### **I-2-2-Réponse de la plante à une déficience en P**

La réponse de la plante à une carence en P est complexe. Des modifications moléculaires, biochimiques, physiologiques et morphologiques lui permettent de s'adapter à une faible disponibilité de Pi dans le sol et d'augmenter son efficacité d'utilisation (Raghothama, 1999).

La carence en P entraîne une diminution de la photosynthèse et une augmentation de la teneur en amidon des chloroplastes, liée à la diminution du transfert de triose phosphate du chloroplaste vers le cytoplasme (Rausch et Bucher, 2002). La diminution de la photosynthèse s'accompagne aussi de la production d'anthocyanes dans le chloroplaste qui piègent les radicaux libres résultant de la dispersion de l'énergie inutilisée par la photosynthèse peu efficace.



L'augmentation des sécrétions racinaires est une réaction connue des plantes à une carence en Pi. Par exemple le lupin blanc développe des racines protéoïdes avec une grande surface d'absorption et exsudant d'importants flux d'acide citrique et de phosphatase dans la rhizosphère (Neumann et Martinola, 2002 ; Stade-Miller *et al.*, 2001). Ainsi L'acide citrique dissout les phosphates de calcium insolubles, donnant du citrate complexe de Ca et du Pi et les phosphatases permettent l'hydrolyse des formes organiques de phosphate du sol entraînant la libération de Pi. Ces formes solubles seront prélevées par les racines.

L'acidification du sol est également une réaction des plantes à la carence en Pi ; cette acidification est due à une sécrétion de protons dans la rhizosphère et a été observée chez le colza (Hinsinger, 2001)

### **I-2-3-Nature et formes du phosphore dans le sol**

Les sols contiennent 100 à 3000 mg P Kg sol<sup>-1</sup> presque uniquement sous deux formes, le phosphore organique et le phosphore inorganique. Sont définies comme formes organiques (Po), les formes de P liées directement à un squelette carboné et les formes minérales présentes à l'intérieur de structures biologiques vivantes ou mortes (Pi, polyphosphate, pyrophosphate).

La forme assimilable (biodisponible) est la forme soluble, et selon le pH du sol on le trouvera dans le sol sous les trois formes suivantes : (Fardeau, 1993).

- dissout dans les solutions ;
- adsorbé (faisant partie des constituants minéraux ou organiques) ;
- engagé dans des combinaisons moléculaires stables.

La figure I.5 montre ces différents états : la réserve générale (1), inutilisable par la plante ; La matière organique en (2) contient des quantités importantes de phosphore, à ce stade on observe une minéralisation rapide et une autre plus lente; Le P peu soluble en (3): plus le sol est acide ou calcaire moins le P est mobile; il précipite alors en phosphate de fer ou calcique. En (4) nous trouvons le P adsorbé; il est chargé électro-négativement ( $PO_4^{3-}$ ) et peut se fixer sur le complexe argilo- humique grâce à un pont calcique entre le P et l'argile. Enfin en (5) nous avons le P soluble qui est la fraction la plus faible dans le sol mais la plus importante pour la plante (Gros, 1979)



Le P en solution et le P adsorbé constituent le «pool alimentaire» et la plante va assimiler uniquement le P en solution.

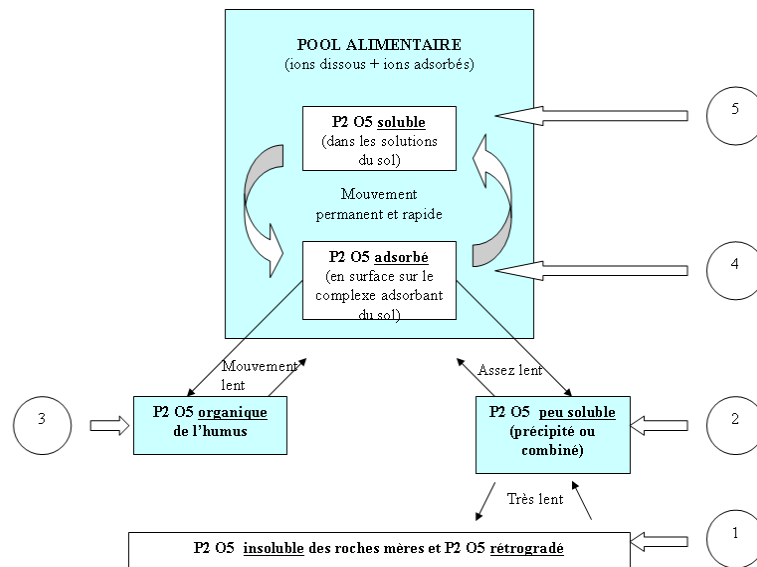


Figure. I. 5 la dynamique du phosphore dans le sol (d'après Gros, 1979)

#### I-2-2-1-le P minéral

La majeure partie du P prélevée par les plantes supérieures se fait, essentiellement sous la forme d'ions d'orthophosphate ( $P_i$ ) (présent sous deux formes dans la solution du sol:  $H_2PO_4^-$  et  $HPO_4^{2-}$ ), à partir de la solution du sol et par voie racinaire. Or la présence de ces ions orthophosphate ( $H_2PO_4^-$  et  $HPO_4^{2-}$ ) ainsi que leur concentration relative dans la solution du sol est contrôlée par le pH du sol. Ainsi comme le montre la figure I.6 (Mengel et Kirkby, 1987), la marge du pH correspondant au P assimilable le plus élevé se situe entre 5,5 et 7.

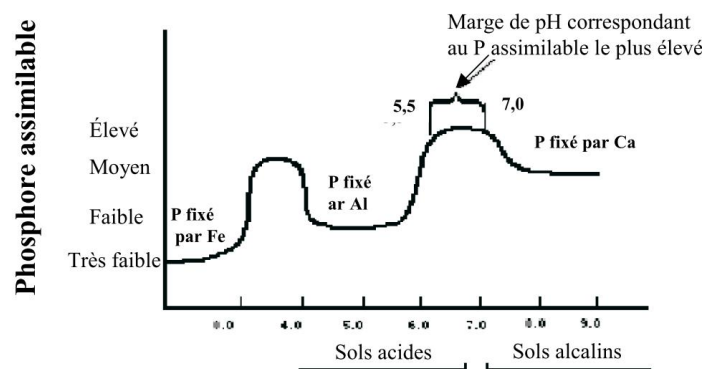


Figure. I. 6 influence du pH sur la solubilité du P dans le sol (Parent *et al.*, 2002)





Cependant, les racines n'exploitant que 10 à 20% de l'horizon cultivé, et les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  ne diffusant que sur une très courte distance (estimée de  $10^{-12}$  à  $10^{-15}$   $\text{m}^2 \text{S}^{-1}$ ) résultant de sa forte réactivité avec les constituants du sol (Schachtman *et al.*, 1998), la plante peut rapidement épuiser son horizon rhizosphérique en P disponible.

### I-2-3- Le P organique, une solution d'avenir pour la nutrition des plantes ?

Les sols contiennent des formes très variées de Po (Tableau 1). On distingue, en fonction des liaisons existant entre atomes de P et de O ou C, des monoesters-P, des diesters-P, et en plus faible proportion des phosphonates et des polyphosphates et des pyrophosphates.

Etant donnée la complexité du sol, l'identification des formes de Po est très délicate. Parmi les monoesters-P Turner *et al.* (2002a) montrent que les concentrations en différents isomères des inositols phosphates peuvent atteindre  $1000 \text{ mg P kg}^{-1}$  de sol et que ces composés représentent jusqu'à 50% du Po des sols. Parmi les diesters-P, on retrouve l'ADN, l'ARN, les phospholipides, l'acide techoïque, etc. Les phosphonates, caractérisés par une liaison C-P [formule générale :  $\text{R-C-PO}_3\text{H}_2$ ], ne sont retrouvés qu'en faibles concentrations dans les sols et dans des situations où l'activité de la microflore est réduite (milieu froid et humide) (Newman et Tate, 1980). Les pyrophosphates et polyphosphates  $[(\text{PO}_3)_n]$  sont synthétisés par les microorganismes et sont des formes de stockage de P. On retrouve aussi la liaison pyrophosphate dans l'ATP qui est présent chez tous les organismes vivants.



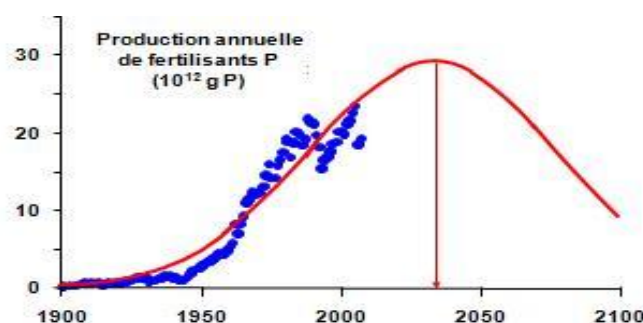
Tableau I.1. Tableau récapitulatif des principaux composés naturels de P organiques pouvant être présents dans l'environnement (d'après Turner *et al.*, 2005b)

composé	Formule chimique	classe	commentaire
Acide désoxyribonucléique	$C_2H_8NO_4P$	diester	
Acide ribonucléique		diester	
<i>myo</i> -inositol hexakisphosphate (acide phytique)	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Principal source de Po chez les plantes
D-chiro-inositol hexakisphosphate	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Origine microbienne
$\alpha$ -Glucose 1-phosphate	$C_6H_{13}O_9P$	monoester	Sucre répandu chez les plantes
Adénosine monophosphate	5' $C_{10}H_{14}N_5O_7P$	monoester	
Adénosine 5'-diphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	polyphosphate	
Adénosine 5'-triphosphate	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	Phospho-anhydride	
$\beta$ -Glycérophosphate	$C_3H_9O_6P$	monoester	Synthétisé par le clivage enzymatique de la choline
Phosphoénolpyruvate	$C_3H_5O_6P$	monoester	Commun chez les plantes
L- $\alpha$ -phosphatidyl ethanolamine	$C_7H_{12}NO_8P(2R)$	diester	Phospholipide chez les microorganismes
L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-sérine	$C_8H_{12}NO_{10}P(2R)$	diester	Phospholipides chez les mammifères
Polyphosphate (linéaire)	$H_2nO_{3n+1}P_n$	Phospho-anhydride	Origine microbienne
Pyrophosphate	$H_4O_7P_2$	Phospho-anhydride	
Phosphocreatine	$C_4H_{10}N_3O_5P$	monoester	Commun chez les muscles des vertébrés



On considère que la moitié du P organique des sols est encore non identifiée. Des méthodes d'extraction et de purification de Po spécifiques comme les inositols phosphates sont utilisées depuis les années 60. La RMN au  $^{31}\text{P}$  en milieu liquide est utilisée depuis les années 80 pour caractériser les formes de Po dans des extraits alcalins de sols (Condrón *et al.*, 1990; Makarov *et al.*, 2002; Cade-Menun *et al.*, 2002). Depuis peu, on caractérise les formes de Po après leur mise en solution en fonction de leur degré d'hydrolyse par des phosphatases plus ou moins spécifiques (Turner *et al.*, 2002b; He et Honeycutt, 2001). Enfin, récemment, une méthode basée sur la séparation de phosphates organiques solubles dans l'eau par ultrafiltration et leur passage en spectrométrie de masse a été proposée (Llewelyn *et al.*, 2002). Cependant, comme souvent en chimie ou en biochimie du sol, aucune méthode n'est parfaite et ces méthodes doivent toujours être utilisées avec précaution. La caractérisation des formes de Po dans les sols représente donc, un des plus gros obstacles à une compréhension complète du cycle du P dans les écosystèmes terrestres.

Les formes organiques de P ne sont pas disponibles pour les racines. Elles doivent d'abord être hydrolysées par des enzymes de la famille des phosphatases, produites par les racines, les bactéries et les champignons, pour libérer du  $\text{P}_i$  qui peut être prélevé (Richardson *et al.*, 2001; Zimmermann, 2003). De plus la fertilisation en  $\text{P}_i$  n'est pas une voie d'avenir, compte tenu à la fois de l'épuisement futur des stocks (Figure I.8) et des problèmes environnementaux qu'elle procure (eutrophisation).



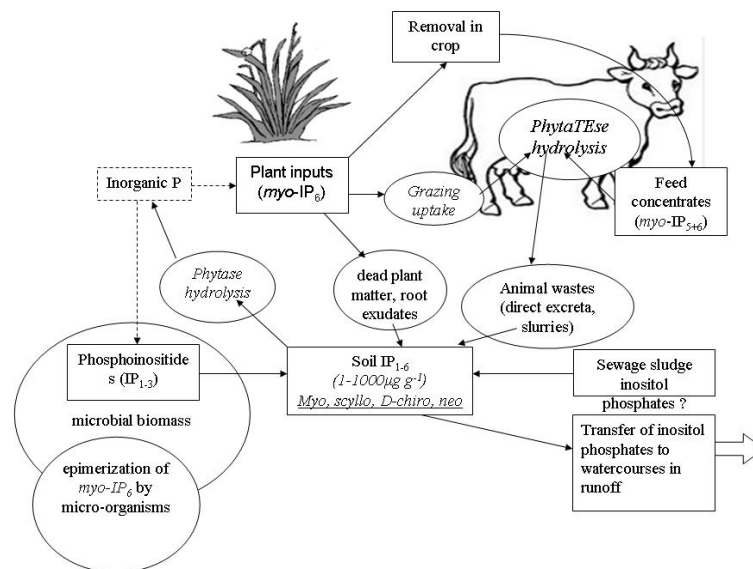
**Figure. I. 7 évolution de la production de fertilisants phosphatés depuis 20e siècle, et stimulation de l'évolution future prévoyant un pic de production lié à l'épuisement rapide des gisements de phosphates naturels (Cordell *et al.*, 2009)**



Une des voies alternatives possible serait une optimisation de l'utilisation du P organique présent dans les sols et les amendements organiques (fumier, compost etc...). En effet, 20 à 80% du P total de la couche superficielle du sol se trouve sous forme de P organique (Dalal, 1977 ; Richardson, 1994 ; Condrón et Tiessen, 2005). Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) (Mengel et Kirby, 1987).

#### I-2-4 Le phytate

Les Inositol phosphates sont la classe dominante des composés organiques du phosphore (P) des sols. Ces composés ubiquitaires sont dérivés principalement à partir de plantes comme le hexakisphosphate *myo*-inositol (Figure I.7), qui fonctionne comme un composé de stockage dans les graines. Le *myo*-inositol hexakisphosphate, également connu sous le nom d'acide phytique, est aussi le plus abondant de l'inositol phosphate dans les sols (Turner *et al.*, 2002a). Les inositol phosphates représentent moins de 50% du P organique du sol (Anderson, 1967; Williams et Anderson, 1968), bien qu'ils peuvent constituer des quasi-totalité des P organique dans certains des sols calcaires (Jencks *et al.*, 1964).



**Figure. I. 8 cycle biogéochimique de l'inositol phosphate dans le système terrestre (modifié de Turner *et al.*, 2002a)**





L'acide phytique (*myo*-inositol hexakisphosphate) est un substrat d'intérêt actuel tant du point de vue industriel qu'environnemental. Dans sa forme basique, le phytate, est la plus abondante source de phosphates chez les plantes, constituant plus de 80 % du total du phosphore dans les céréales et les légumineuses.

### I-2-5- Nomenclature et terminologie du phytate

Le tableau I.2 présente la nomenclature des différents phytates (Shears et Turner, 2007)

Tableau I.2. le *myo*-inositol phosphates et ces abbreviations les plus courantes

Nom complet	Nombre de groupements P	de	Abbréviation IUPAC	abbréviation courante
<i>myo</i> -Inositol	0		Ins	Ins
<i>myo</i> -Inositol monophosphate	1		InsP1	IP1
<i>myo</i> -Inositol bisphosphate	2		InsP2	IP2
<i>myo</i> -Inositol trisphosphate	3		InsP3	IP3
<i>myo</i> -Inositol tetrakisphosphate	4		InsP4	IP4
<i>myo</i> -Inositol pentakisphosphate	5		InsP5	IP5
<i>myo</i> -Inositol hexakisphosphate	6		InsP6	IP6
Diphospho- <i>myo</i> -Inositol tetrakisphosphate	6		PP-InsP4	PP-IP4
Diphospho- <i>myo</i> -Inositol pentakisphosphate	7		PP-InsP5	IP7
Bis-diphospho- <i>myo</i> -Inositol tetrakisphosphate	8		[PP]2-InsP4	IP8

### I-2-6-Le phytate dans les sols :

L'inositol phosphate est abondant dans le sol, actuellement son origine, sa dynamique et sa fonction écologique restent largement inconnus (Turner 2007). Les premières études de l'inositol phosphate dans le sol remontent à plus de 60 ans (Dyer *et al.*, 1941; Yoshida, 1940)



L'abondance de la plupart des phosphates d'inositol dans les sols signifie qu'il y a actuellement beaucoup d'intérêt dans leur comportement, la disponibilité pour les plantes, et leur devenir dans l'environnement (Celi *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2001b; Turner *et al.*, 2002b). Cependant, une telle information est limitée, principalement parce que l'extraction, la séparation et la détection des phosphates d'inositol dans les échantillons de l'environnement reste un processus complexe et une procédure problématique. Les inositol phosphates sont extraits classiquement à partir des solutions de sols en milieu alcalin, qui sont ensuite nettoyées et les phosphates sont séparés par chromatographie (Mc-Kercher et Anderson, 1968). Toutefois, de telles techniques sont coûteuses en temps et compromises par des recouvrements d'inositol phosphates pauvres de les sols et les colonnes de chromatographie.

### **I-3- Phytate et communauté microbienne rhizosphérique**

La dégradation et l'utilisation du phytate sont très liées à la capacité de certaines enzymes qui ont la propriété de le minéraliser. C'est enzymes sont des phytases, elles constituent une famille particulière de phosphatases hydrolysant l'acide phytique en Pi et en inositol.

Les bactéries capables de solubiliser le P organiques et d'avoir des propriétés favorisant la croissance végétale se sont révélés être favorisée à la proximité des racines (Rodriguez et Fraga, 1999; Roesti, 2005), des études ont montré que la proportion des souches productrices de phosphatases alcalines et acides est plus importante dans la rhizosphère par rapport au sol non rhizosphérique (Johansen et Binnerup, 2002).

#### **I-3-1-les phytases : enzymes clefs du cycle de P ?**

La dégradation du phosphore dans le sol à partir de phosphore organique peut se faire grâce à l'action de trois groupes d'enzymes spécialisées (Rodriguez *et al.*, 2006) :

**Des phosphatases non spécifiques** qui déphosphoryle les phospho-ester ou le phospho-anhydre en matière organique :



**Des phosphonatasases et C-P lyases**, ces enzymes sont responsables de la rupture de la liaison C-P dans les organophosphonates.

**Des phytases** qui relâchent spécifiquement du phosphore à partir de l'acide phytique.

Les enzymes de dégradation du phytate ont été étudiés de manière intensive ces dernières années en raison de l'intérêt suscité par ces enzymes pour réduire la teneur en phytates dans les aliments pour animaux et des denrées alimentaires pour la consommation humaine. Ces enzymes ont été initialement proposées comme additif alimentaire pour animaux afin d'améliorer la valeur de la matière végétale dans l'alimentation animale par orthophosphate (Mitchell *et al.*, 1997). Plus récemment, l'ajout d'enzymes de dégradation du phytate a également été considéré comme un moyen de réduire le niveau de pollution de phosphate. Des études ont déjà montré que l'ajout d'enzymes de dégradation du phytate améliore l'utilisation du phosphate à partir du phytate (Cromwell *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1990).

### **I-3-2-caractéristiques des phytases**

Les phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases) appartiennent à la classe des phosphatases de haut poids moléculaire (Rodríguez *et al.*, 2006).

- dosage: l'activité phytase est généralement mesurée par la quantité de phosphate inorganique libéré par min à un certain pH et à une certaine température à partir d'un substrat sélectionné. Tout comme d'autres enzymes, l'activité ou la fonction phytase est affectée par les propriétés intrinsèques de l'enzyme et les conditions d'action.

Certaines propriétés des phytases ont une importance pratique: Il y a eu des recherches intensives sur la spécificité du substrat et l'affinité des différentes phytases (Greiner *et al.* 2002, Ullah et Phillippy 1994, Wyss *et al.*, 1999). Les phytases microbiennes (*A. Niger*, *E. coli*, *Bacillus sp.*) semblent avoir une grande affinité pour l'acide phytique, alors que les phytases végétales et celles des enzymes fongiques, telles que celle de *A. fumigatus*, ont une spécificité plus large en matière de substrat (Wyss *et al.* 1999) et sont capables de dégrader les phosphates d'inositol inférieures.



### **- le pH et la température optimale**

Les phytases les plus isolées ont leur pH optimal dans la gamme de 4,5 à 6. Celles isolées de *Bacillus sp.* ont un pH optimal neutre ou alcalin (Choi *et al.* 2001, Kim *et al.*, 1998). Le profil de pH de la phytase de *A. Niger* (phyA) se caractérise par deux valeurs optimales de pH, de 2,5 et de 5,5, et par une baisse de l'activité entre ces deux points (Han et Lei, 1999).

La température optimale d'action de la plupart des phytases des plantes et des phytases microbiennes varie de 45° à 60° C.

### **- La thermostabilité**

La thermostabilité d'une phytase donnée, tout comme celle d'autres protéines, est décidée par sa capacité à résister à la dénaturation thermique comme dans le cas des organismes hyperthermophiles et (ou) par sa capacité à se replier correctement après dénaturation par la chaleur (Wyss *et al.*, 1998). Cette caractéristique peut être affectée par des conditions environnementales telles que la spécificité du tampon (Rodriguez *et al.* 2000a).

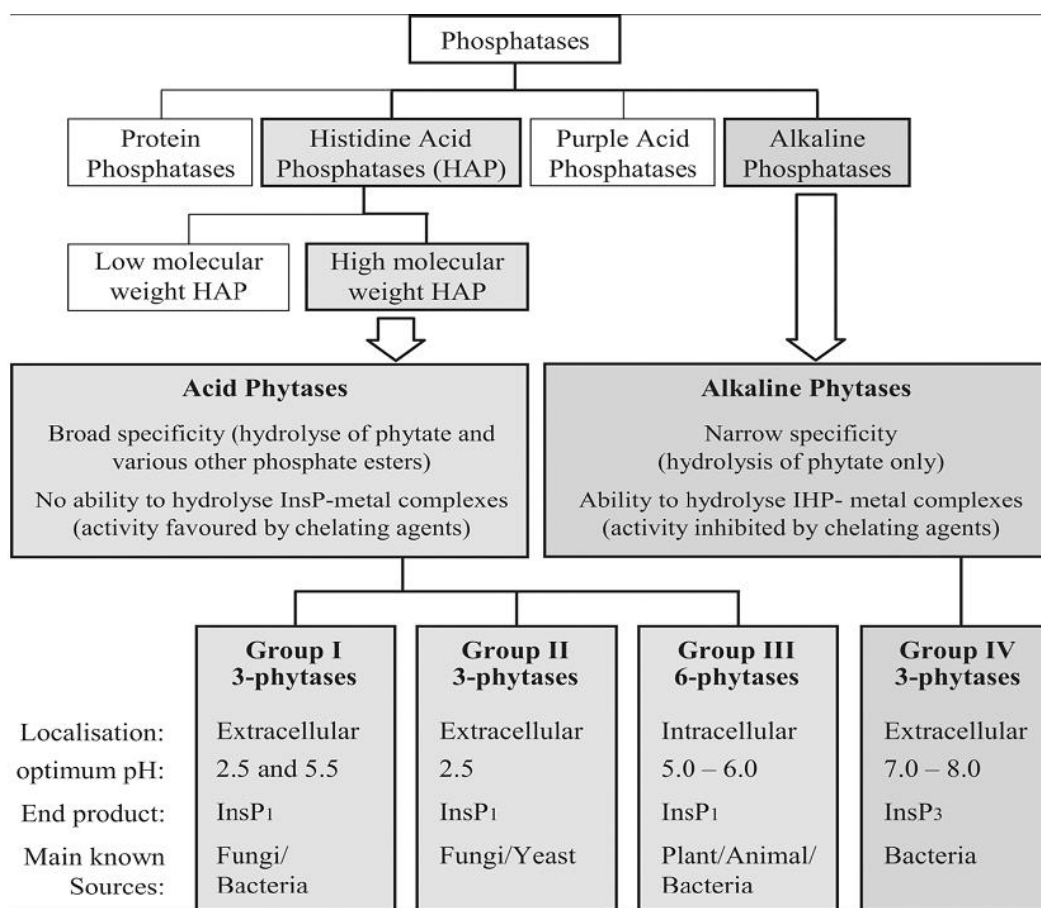
Un inconvénient majeur des enzymes thermostables est habituellement leur faible activité spécifique à température ambiante, associée à une grande rigidité ce qui diminue la flexibilité de la protéine.

### **I-3-3-Nomenclature et classification des phytases**

La nomenclature internationale reconnaît deux principales classes de phytases : la classe I qui est celle des phytases acides qu'on appelle Histidine acid phytases (HAP), opposée à la classe II, celle des phytases alcalines, dont la plus connue est la phytase  $\beta$ -hélicoïdale ou «  $\beta$ -propeller phytase » (BPP). Cette classification est basée sur l'homologie des séquences protéiques de phytases de diverses origines, la structure tridimensionnelle et les propriétés biochimiques et catalytiques. Deux autres groupes de phytases ont été également caractérisés : ce sont les cystéine phytases (CPhy) et les phosphatase acides pourpres (PAPs) (Mullaney et Ullah, 2003; Chu *et al.*, 2004 ; Lim *et al.*, 2007) (Figure I.9).







**Figure.I. 9: catégories de phytases : Classification, spécificité et produit final de différentes phytases (d'après Oh et al., 2004; Vats et Banerjee, 2004).**

La première phytase d'*Aspergillus Niger* caractérisé PhyA est codée par un fragment de 1,4 kb d'ADN et a une masse moléculaire de 80 kDa, avec 10 sites N-glycosylation (Han et Lei, 1999, Van Hartingveldt et al., 1993). Les masses moléculaires des phytases bactériennes sont en moyenne plus petites que celles des phytases fongiques (40-55 vs 80-120 kDa), principalement en raison des différences de glycosylation (Choi et al. 2001, Golovan et al. 2000, Han et Lei, 1999, et Kerovuo al. 1998, Rodriguez et al. 2000b, Ullah et al. 2000, Van Hartingveldt et al., 1993). Les masses moléculaires des phytases végétales isolées à partir du maïs, du blé, du lupin, de l'avoine, l'orge sont de 47 à 76 kDa (Greiner 2002, Greiner et al., 2000a, b, Greiner et Larsson Alminger 1999).

Les phytases peuvent être divisés en deux groupes en fonction de l'hydrolyse du site d'initiation de phosphate dans le cycle du carbone de l'inositol. Les phytases



des microorganismes, en particulier ceux d'origine fongique divisent le plus souvent le groupement phosphate au carbone C1 ou C3 de l'anneau inositol (D-et L-configuration), et sont appelés 3-phytases. Les phytases végétales agissent préférentiellement au niveau du carbone C6, et sont appelés les 6-phytases.

I-3-3-1- la classe des Histidines acides phosphatases (HAPs) :

La classe des HAPs regrouperait la plupart des phytases (bactériennes, fongiques et végétales) ces enzymes ne sont pas très spécifiques au substrat : elles peuvent catalyser l'hydrolyse d'autres phospho-esters que les phytates.

Catalytiquement, la plupart des phytases appartiennent à la famille des histidines phosphatases acides qui se caractérise par un site actif conservé RHGXRXP, un motif hepta-peptide et l'activité catalytique dipeptide HD. Ce groupe d'enzymes catalysent l'hydrolyse acide phytique en deux étapes: une attaque nucléophile de l'histidine du site actif de l'enzyme de la liaison phosphoester scissile de l'acide phytique (Ostanin *et al* 1992, Van Etten 1982, Vincent *et al.* 1992) et la protonation du groupe partant par le résidu acide aspartique du motif HD (Ostanin et Van Etten 1993).

I-3-3-2- la classe des  $\beta$ -propeller phytase (BPP) :

La phytase  $\beta$ -hélicoïdale ou  $\beta$ -propeller phytase (BPP) est le principal exemple de phytase alcaline relativement bien étudiée, surtout chez les bactéries du genre *Bacillus* ; elle semble exclusivement exister chez les bactéries.

Le sol contient une très grande diversité de micro-organismes pouvant synthétiser ces enzymes, spécialement dans la rhizosphère. (Cosgrove, 1977). Il est estimé que 70 à 80% des phosphatases sécrétées dans la rhizosphère sont d'origine bactérienne (Plante, 2007).

Plusieurs études ont caractérisé des phytases à partir de différentes espèces de microorganismes (Konietzny et Greiner, 2002 ; Vohra et Satyanarayana, 2003). Comme les bactéries telles que *Bacillus sp.* (Choi *et al.*, 2001; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Powar et Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992), *Pseudomonas sp.* (Irving et Cosgrove, 1971; Richardson et Hadobas, 1997), *Escherichia coli* (Golovan



*et al.*, 2000; Greiner *et al.*, 1993), *Enterobacter* (Yoon *et al.*, 1996), *Klebsiella sp.* (Greiner *et al.*, 1997; Sajidan *et al.*, 2004; Shah et Parekh, 1990; Tambe *et al.*, 1994), *Citrobacter braakii* (Kim *et al.*, 2003), *Lactobacillus sanfranciscensis* (De Angelis *et al.*, 2003).

### **I-3-4-Rôle des phytases**

Les phytases sont très répandues dans la nature, tant chez les micro-organismes, que chez les plante et dans certains tissus des animaux. Le rôle des phytases dans chacun de ces organismes est différent.

Chez les plantes, les phytases sont responsables de la libération de phosphore inorganique (Pi) pendant la germination des semences (les réserves de phosphore dans les semences sont sous forme de phytate)(Hatzack *et al.*.,2001) ainsi que de la production du *myo*-inositol libre (non phosphaté) qui est un important facteur de croissance ( La plante peut également avoir un impact sur la biodisponibilité en P Ainsi (i) les quantités de P prélevées en un temps donné par une racine sont proportionnelles à la concentration des ions  $PO_4^{3-}$  aux abords de la zone active de la racine (ii) les besoins de la plante au cours de son cycle végétatif ne sont pas constants. Il y a des périodes surtout pour les plantes à forts prélèvements (comme chez les légumineuses) où les besoins instantanés sont élevés.

Chez les micro-organismes, les phytases sont plutôt synthétisées comme réponse à un manque de phosphate ; ainsi la déphosphorylation du phytate devient une source riche en phosphore inorganique.

Pour le cas des cellules animales, le rôle des phytases reste encore obscur ; toutefois, une enzyme similaire la multiple inositol polyphosphate phosphatase (MIPP), a la capacité de réguler les activités cellulaires des acides phytiques et les Ins (1, 3, 4, 5,6) P. (Craxton *et al.*., 1997).



## I-4-plante modèle : *phaseolus vulgaris*, le haricot commun

### I-4-1-taxonomie du haricot et description morphologique:

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotyledones
- Ordre : Fabales
- Famille : Fabaceae
- Genre : *Phaseolus*
- Espèce : *Phaseolus vulgaris*

Le genre *Phaseolus* appartient à la tribu des Phaseolées et a la famille des Fabaceae ou Papilionaceae qui fait partie de la grande famille des leguminosae. Le genre *Phaseolus* regroupe les espèces de haricot au sens strict, soit environ 55 espèces (Martínez-Romero, 2003), même si la distinction entre les espèces n'est pas toujours facile et que il est probable que certaines ne soient pas des espèces à part entière (Debouck, 1999) cinq d'entre elles ont été domestiquées, et sont les plus importantes ; ce sont *P. acutifolus*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. polyanthus* et *P. vulgaris*, (Debouck, 1999 ; Martínez-Romero, 2003). Cette dernière, la plus connue, est communément appelée haricot commun.

Les espèces du genre *Phaseolus* présentent l'avantage d'avoir un cycle de développement relativement court (3 mois). Plantes herbacées, lianescentes, à croissance indéterminée ; Leur appareil végétatif comprend une tige angulaire et rameuse, leurs feuilles sont alternes en trois folioles ovales, acuminées aigues. Les fleurs sont de deux centimètres de longueur, blanchâtres, jaunâtre ou lilas et les fruits sont des gousses allongées déhiscentes, contenant 5 à 12 graines de taille et de couleur très variable selon les espèces et variétés.





#### **I-4-2- importance du haricot**

Le haricot commun est cultivé comme légume dans toutes les régions tempérées et chaudes du globe, il fait partie de la chaîne trophique humaine surtout en Amérique latine et en Afrique, où il représente la nourriture de base et fournit plus de 70% de la ration protéique aux populations pauvres (Singh, 1999).

C'est une légumineuse grande consommatrice de phosphore car en plus de fixer l'azote, elle va l'immobiliser dans la membrane plasmique ainsi que dans les acides nucléiques des rhizobies qui vivent en symbiose dans ses racines.

Le haricot commun est une culture traditionnelle originaire de l'Amérique latine. C'est une plante qui est également cultivée couramment en Afrique et en Chine (Vadez *et al.*, 1999). Son adaptabilité liée à la diversité des sites de son acclimatation (Gepts *et al.*, 1986) permet sa culture dans de nombreuses conditions pédoclimatiques et dans des agrosystèmes variés. C'est une plante propre aux climats chauds (tropicaux tempérés) et aux régimes d'humidité relativement bas mais qui supportent mal les températures excessives. Le pH du sol optimal pour la croissance de cette espèce est compris entre 5,5 et 7.

#### **I-4-3-Déficiência en P et haricot :**

En comparaison avec les autres légumineuses, le potentiel de fixation symbiotique du haricot est considéré comme étant bas (Pereira et Bliss, 1987 ; Isoi and Yoshida, 1991) et serait probablement dû à la courte phase végétative, ce qui augmente ses exigences en azote. De plus la FSN chez le haricot est plus affectée par la déficience en P (Vadez, 1996) comparativement aux autres plantes telles que le soja (Israel, 1987); Graham (1981) a montré que sous déficience en P, le haricot a une faible capacité de nodulation et donc une faible FSN.

Des études ont montré l'effet de la déficience en P sur les différentes parties des légumineuses et de façon générale sur les racines. La structure racinaire en est modifiée de manière à augmenter la surface d'absorption et d'exploration (Hammond *et al.*, 2004), alors que la croissance nodulaire est ralentie (Ribet et Drevon, 1995). Des études ont montré que la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité du P chez le trèfle (Hellsten et Huss-danell, 2001), que la nodulation est



fortement réduite sous déficience en P (Gunawardena *et al.*, 1992 ; Mandri *et al.*, 2012) et que cette réduction s'observe principalement sur la taille et le nombre de nodules ( Ribet et Drevon, 1995). De même qu'une forte carence en P semble empêcher la nodulation de la croissance ultérieure de nodosités déjà présentes (Almeida *et al.* 2000, Gentili et Huss-Danell, 2003)

Le P a un effet positif sur l'activité fixatrice des nodosités (Van Kessel et Roskoski 1983, O'Toole *et al.* 1991, Ribet et Drevon 1995). Des données de plusieurs études laissent à supposer qu'il pourrait avoir un effet sur le taux de fixation de l'azote à des doses plus ou moins forte,

## I-5-References

- Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Luscher A (2000) Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J Exp Bot* 51: 1289–1297.
- Anderson G (1967) Nucleic acids, derivatives, and organic phosphorus. In: McLaren, A.D., Peterson, G.H. (Eds) *Soil Biochem. Vol.1*. New York: Marcel Dekker. USA, pp. 67-90.
- Anonyme (2013) page web :[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema\\_cycle\\_du\\_phosphore.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema_cycle_du_phosphore.png). consulté le 12/3/2013.
- Antoun H and Prevost, 2005, ecology of plant growth promoting rhizobacteria. in: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 1–38. Z. A. Siddiqui eds
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 234–266.
- Balandreau J and Knowles R (1978) The rhizosphere. in: *Interactions between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Dommergues YR. and Krupa SV, eds. Elsevier, Amsterdam. Pp. 243-268
- Barriuso Maicas J, Pereyra de la Iglesia MT, Lucas García JA, Megías M, Gutierrez Mañero FJ, Ramos Solano B (2005) Screening for PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. 1 50: 82–89.



- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30: 1225-1228.
- Bauer WD and Caetano-Anolles G (1990). Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 45-52.
- Beauchamp CJ (1993) Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. *Phytoprotection* 71:19-27.
- Bieleski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Ann Rev Plant Physiol.* 24:225-252.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 44, 343– 350.
- Bowen GD, Rovira AD (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66, 1–102.
- Brimecombe MJ, De Leij FAAM, Lynch JM (2007) Rhizodeposition and microbial populations. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 73 – 109
- Cade-menun BJ; Liu CW; Nunlist R, Mccoll GJ (2002) Soil and litter phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: extractants, metals, and phosphorus relaxation times. *J Environ Qual* 31, 457-465.
- Celi LS, Lamacchia F, Ajmone-Marsan, E Barberis (1999) Interaction of inositol hexaphosphate on clays: adsorption and charging phenomena. *Soil Sci.* 164:574-585.
- Choi YM, Suh HJ, Kim JM (2001) Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp KHU-10. *J Prot Chem* 20, 287–292.
- Chu H, Guo R, Lin T, Chou C, Shr H, Lai H, Tang T, Cheng K, Selinger B, Wang A (2004) Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure* 12: 2015 – 2024.



- Condrón LM, H Tiessen (2005) Interactions of organic phosphorus in terrestrial ecosystems. In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D. (Eds) *Organic Phosphorus in the Environment*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 295-307.
- Condrón LM, Frossard E, Tiessen H, Newman RH, Stewart JWB (1990) Chemical nature of organic phosphorus in cultivated and uncultivated soils under different environmental conditions. *J Soil Sci* 41:41 – 50
- Cordell D, Drangert J-O, White S (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob Environ Chang* 19:292 – 305
- Cosgrove DJ (1977) Microbial transformations in the phosphorus cycle. In: M. Alexander, (eds) *Advances in Microbial Ecology*. New York: Plenum Press.
- Craxton A, Caffrey J, Burkhart W, Safrany S, Shears S (1997) Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase; *Biochemistry*. 328:75-81.
- Cromwell GI, Coffey RD, Parker GR, Monegue HJ, Randolph JH (1995) Efficacy of a recombinant derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *J Animal Sci* 71: 1831–1840.
- Curl EA, Truelove B (1986) *The rhizosphere*. Advanced Series in Agricultural Sciences 15. Springer-Verlag, Heidelberg
- Czarnes S (1998) *Adhésion sol:racine et biophysique de la rhizosphère du maïs*. université Nancy. Thèse.
- Dakora FD, Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments *Plant Soil* 245: 35-47.
- Dalal RC.(1977) Soil organic phosphorus. *Adv Agronomy* 29: 83-117.
- Davet P (1996) *Vie microbienne du sol et production végétale*. Institut national de la Recherche Agronomique, INRA, 75338 Paris Cedex 07, ISBN 2-7380-0648-5, 383 pp.
- De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PLH, Faccia M, Giovine M, Gobbetti M (2003) Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and





- characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Int J Food Microbiol 87:259–270.
- de Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ. Flagella-driven (2002) Chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* Mol Plant Microbe Int 15: 1173-1180.
- Debouck DG (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In Common Bean Improvement in the 21st Century. Ed. S R Singh. pp. 25–52. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Deubel A, Gransee A, Merbach W (2000) Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. J Plant Nut Soil Sci 163: 387-392.
- Dyer WJ, Wrenshall CL (1941) Organic phosphorus in soils. III the decomposition of some organic phosphorus compounds in soil cultures. Soil Sci 51:323–329
- Fardeau JC (1993) Le phosphore biodisponible des sols: sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. Agronomie. 13 : 317-331.
- Frossard E, Julien P, Neyroud JA, Sinaj S (2004). Le phosphore dans les sols. Etat de la situation en Suisse. Cahier de l'environnement n° 368. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage, Berne. 180p.
- Gentili F, Huss-Danell K (2003) Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. J Exp Bot 54: 2757-2767.
- Gepts P, Osborn TC, Rashka K, Bliss FA (1986) Phaseolin protein variability in wildforms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. Econ. Bot. 40, 451-468.
- Guivarch A (2001) Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de station d'épuration urbaine. Thèse de Doctorat, INPL, EDRPRE. 309p.
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W, Sarma VAK. (2004). The Living Soil: Fund Soil Scie Soil Biol Scie Pub Inc.



- Golovan S, GR Wang J, Zhang, CW Forsberg (2000) Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* and acid phosphatase activities. Can. J. Microbiol. 46:59-71.
- Graham PH (1981) Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. Field Crop Res. 493–112.
- Greiner R, Konietzny U, Jany KL.-D (1993) Purification and characterization of tow phytases from *E.coli*. Archives biochem biophys 303:107-113.
- Greiner R, E Haller, U Konietzny, K-D. Jany (1997) Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Arch. Biochem. Biophys. 341: 201-206.
- Greiner R, Larsson Alminger M (1999) Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*). J. Sci. Food Agric. 79: 1453–1460.
- Greiner R, Carlsson NG, Larsson Alminger M (2000a) Stereospecificity of *myo* inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. J. Biotechnol.84: 53–62.
- Greiner R, Jany K-D, Larsson Alminger M (2000b) Identification and properties of *myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). J. Cer. Sci. 31:127–139.
- Greiner R, Farouk A, Alminger ML, Carlsson NG (2002) The pathway of dephosphorylation of *myo*- inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. Can J Microbiol 48:986-997.
- Gros A (1979) Guide pratique des relations entre alimentation phosphatée des cultures et les valeurs E et l'INRA p : 205-215.
- Gunawardena SFBN, Danso SKA, Zapata F (1992) Phosphorous requirement and nitrogen accumulation by three mungbean (*Vigna radiata* (L.) Welzek) cultivars, Plant Soil 147: 267–274.
- Hammond JP, Broadley MR, White PJ (2004) Genetic responses to phosphorus deficiency. Ann Bot (Lond). 94: 323-332.



- Han Y, Lei XG (1999) Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. Arch Biochem Biophys 364: 83-90.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature microbiol Rev 2: 43-56.
- Hatzack F, Hübel F, Zhang W, Hansen P, Rasmussen S (2001), Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR Biochemistry.354: 473-480.
- He Z, Honeycutt CW (2001) Enzymatic characterization of organic phosphorus in animal manure. J Environ Qual 30: 1685– 1692.
- Hellsten A, Huss-Danell K (2001) Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). Acta Agriculturae Scandinavica 50,135-142.
- Hinsinger P (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil. 237:173-195.
- Hinsinger P (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. Adv Agro 64: 225-265.
- Irving GCJ, Cosgrove DJ (1971) Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. Aust J Biol Sci 24:547–557.
- Isoi T, Yoshida S (1991) Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris*), Soil Sci. Plant Nutr. 37 559–563.
- Israel DW (1987). Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. Plant Physiol. 84: 835-842.
- Jencks EM, JT Raese, CD Reese (1964) Organic phosphorus content of some West Virginia soils. Bull. West Va. Univ. Agric. Exp. Stn. 489:3-16.
- Johansen JE, Binnerup SJ (2002) Contribution of Cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) Microbial Ecol 43: 298-306.



- Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition New Phytol 163: 459-480.
- Jossi M (2008) Rhizosphere bacterial communities associated with *Lolium perenne* structuration and plant-mediated influences. Thèse d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkinen N, Apajalahti J (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol 64:2079–2085
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK (1998) Cloning of thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 162:185–191
- Kim HW, Kim YO, Lee JH, KIM KK, Kim YJ ( 2003) Isolation and characterisation of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. Biotechnol. Lett., 25
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity, Trends Biotechnol. 7:39-44.
- Konietzny U, Greiner R (2004) Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian J Microbiol 35:11–18
- Kuzyakov Y (2002) Review: Factors affecting rhizosphere priming effects J Plant Nutri Soil Sci 165: 382-396.
- Latour X, Corberand TS, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. Appl Environ Microbiol 62: 2449-2456.
- Lemanceau P, Corberand T, Gardan L, Latour X, Laguerre G, Boeufgras JM, Alabouvette C (1995) Effect of 2 plant species, flax (*Linum usitassinum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* mill), on the diversity of soilborne population of fluorescent *Pseudomonas*. Appl Environ Microbiol 61: 1004-1012.





- Li CJ, Pang X, Zhang FS (2003) Comparison on responses of different phosphorus efficient wheat varieties to phosphorus deficiency stress. *Acta Botanica Sinica* 45: 936-94
- Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J* 1: 321–330.
- Llewelyn JM, Landing WM, Marshall AG, Cooper WT (2002) Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of dissolved organic phosphorus species in a treatment wetland after selective isolation and concentration. *Anal Chem* 74, 600–606.
- Lucas Garcia JA, Probanza A, Ramos B, Barriuso J, Gutierrez Menero FJ (2004) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. *Plant Soil* 267:143-153.
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 1-10.
- Makarov MI, Haumaier L, Zech W (2002) Nature of soil organic phosphorus: an assessment of peak assignments in the diester region of <sup>31</sup>P NMR spectra. *Soil Biol Biochem* 34, 1467-1477.
- Mandri B, Drevon JJ, Bargaz A, Oufdou K, Plassard C, Payre H, Ghoulam C (2012) Interactions between common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes and rhizobia strains isolated from Moroccan soils for growth, phosphatase and phytase activities under phosphorus deficiency conditions. *Plant Nutr.* 35
- Marilley L, Aragno M (1999) Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol* 13: 127–13
- Marilley M, Milani P, Thimonier J, Rocca-Serra J, Baldacci G (2007) Atomic force microscopy of DNA in solution and DNA modelling show that structural properties specify the eukaryotic replication initiation site. *Nucleic Acids Res* 35:6832-6845.



- Marilley L, Vogt G, Blanc M, Aragno M (1998) Bacterial diversity in the bulk soil and rhizospheric fraction of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR profile analysis of 16s rDNA. *Plant Soil* 198: 219-224.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd eds. London Academic Press. 889.
- Marschner P, Solaiman Z, Rengel Z (2006) Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant Soil* 283, 11-24.
- Martinez-Romero E (2003) Diversity of rhizobium-*Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252: 11-23
- McKercher RB, G Anderson (1968) Content of inositol penta- and hexaphosphates in some Canadian soils. *J. Soil Sci.* 19:47-55.
- Mengel K, EA Kirkby (1987) Principles of plant nutrition, 4th eds, International Potash Institute, Bern, Switzerland.
- Merbach W, Mirus E, Knof G, Remus R, Ruppel S, Russow R, Gransee A, Schulze J (1999) Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *J Plant Nutr Soil Sci* 162: 373–383
- Mitchell DB, Vogel K, Weimann BJ, Pasamontes L, van Loon (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, 245–252.
- Morel C (2002) Caractérisation de la phytodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphatés entre le sol et la solution. Thèse d'habilitation INRA Bordeaux, 80p.
- Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (2006) Microbial activity in the rhizosphere. *Soil Biology* Vol 7. Springer, Heidelberg
- Mullaney EJ, Ullah AHJ (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Research Communication* 312, 179-184.
- Neumann G, Martinola E (2002) Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* 7:162-167.



- Newman RH, Tate KR (1980) Soil phosphorus characterization by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *Communication Soil Sci Plant Analysis*, 11:835-842.
- O'Toole P, Cahalane DG, Farrell EP (1991) Effects of phosphate fertilizer on biomass production and  $\text{N}_2$  ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) fixation by pot-grown *Ulex gallii* Planchon in a forest soil. *Biol. Fertil. Soils* 12: 177-181.
- Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Technol* 63: 362-372.
- Ostanin K, van Etten RL (1993) Asp304 of *Escherichia coli* acid phosphatase is involved in leaving group protonation. *J Biol Chem.* 267:20778–70784.
- Ostanin K, Harms EH, Stevis PE, Kuciel R, Zhou M, Van Etten RL (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267: 22830–22836.
- Pereira PAA, Bliss FA (1987). Nitrogen fixation and plant growth of common bean *Phaseolus vulgaris* (L) at different levels of phosphorus availability. *Plant soil* 104: 79-84.
- Parent LE, Pellerin A, Khiari L (2002) Le flux et la dynamique du phosphore dans les sols agricoles québécois. Communication scientifique. Colloque sur le phosphore. Ordre des agromones du Quebec. Auberge Universelle, 6 novembre 2002 .27p.
- Plante AF (2007) Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: Paul E. A. (eds.), *Soil Microbiol Biochem.* Elsevier Academic Press, Burlington, UDA. pp. 391-398.
- Powar VK, Jagannathan V (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatases from *Bacillus subtilis*. *J biotech* 151:1102-1108.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial micro-organisms. *Plant Soil* 321:341–361.
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693.



- Rausch C, Bucher M (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*. 216, 23-37.
- Ribet J, Drevon JJ (1995) Phosphorus deficiency increases the acetylene- induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Exp. Bot.* 46, 1479-1486.
- Richardson AE (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil biota management in sustainable farming systems'*. (Eds CE Pankhurst, BM Doube, VVSR Gupta and PR Grace) pp. 50–62. (CSIRO Publishing: Melbourne)
- Richardson AE, Hadobas PA (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43: 509-516.
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* 28: 897–906.
- Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE. (2001a) Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J* 25: 641-649.
- Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE, O'Hara CP, Simpson RJ (2001b) Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with *myo*- inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant Soil* 229:47-56.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009a) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305–339
- Richardson AE, Hocking PJ, Simpson RJ, George TS (2009b) Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop Pasture Sci* 60: 124–143
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotech adv.* 17: 319-339.
- Rodriguez E, Mullaney E, Lei XG (2000a) Expression of the *Aspergillus fumigatus* gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 268:373–378.
- Rodriguez E, Wood ZA, Karplus PA, Lei XG (2000b) Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5





acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys. 382: 105–112.

- Roesti D (2005) Bacterial community associated with the rhizosphere of wheat: interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and selection of plant growth promoting rhizobacteria for the increase of wheat growth and soil health in Indian marginal rainfed fields. PhD thesis, University of Neuchâtel, Switzerland.
- Rodriguez H, R Fraga, T Gonzalez, Y Bashan (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant Soil. 287:15-21.
- Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Muller EC, Borris R (2004) Molecular and physiological characterization of a 3-phytase from the rhizobacterium *Klebsiella pneumoniae* ASRI. Appl Microbiol Biotechnol 65:110–118
- Schachtman DP, RJ Reid, SM Ayling (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol. 116:447-453.
- Shears SB and Turner BL (2007) Nomenclature and Terminology of Inositol Phosphates: Clarification and a Glossary of Terms, in Inositol Phosphates. linking agriculture and the environment.288p.
- Shah V, Parekh LJ (1990) Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2 purification and properties. Ind J Biochem Biophys 27:98–102
- Shimizu M (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci Biotechnol Biochem 56:1266–1269
- Simons PCM, Versteegh HAI, Jongbloed AW, Kemme PA, Slum P, Bos KD, Wolters GE, Beudeker RF, Verschoor GJ (1990) Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. Br. J. Nutr, 64: 525-540.
- Singh SP (1999) Improvement of small-seeded race Mesoamerica cultivars. In: Singh, S.P.ed. Common bean improvement in the twenty-first century. Kluwer Academic Publishers. growing on freely drained soils of pH 6.5 in northern Tanzania. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 23, 787-792.



- Stade-Miller S, Liu J, Allan DL, Menhuber CJ, Fedorova M, Vance CP (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus stressed white lupin. *Plant Physiol Plant Mol Biol.* 127,594-606.
- Stengel P, Gelin S (1998) *sol: interface fragile*. INRA, Paris. ISBN: 2-7380-0786-4
- Ström L, Owen AG, Godbold DL, Jones DL (2005) Organic acid behaviour in calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biol. Biochem.* 1-9.
- Tambe SM, Kaklij GS, Keklar SM, Parekh LJ (1994). Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J Ferment Bioeng* 77:23–27
- Tarnawski S, Hamelin J, Locatelli L, Aragno M, Fromin N (2003) Examination of Gould's modified S1 (mS1) selective medium and Angle's non-selective medium for collecting diversity of *Pseudomonas* spp. in soil and root environments. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 97-104.
- Turner BL, Papházy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID (2002a) Inositol phosphates in the environment. *Philos. T. Roy. Soc. B* 357, 449–469.
- Turner BL, ID McKelvie, PM Haygarth (2002b) Characterization of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. *Soil Biol Biochem* 34, 27-35.
- Turner BL, Baxter R, Whitton BA (2002c) Seasonal phosphatase activity in three characteristic soils of the English uplands polluted by long-term atmospheric nitrogen deposition *Environ Pollution* 120: 313-317.
- Turner BL, BJ Cade-Menun, LM Condon, S Newman (2005a). Extraction of soil organic phosphorus. *Talanta* 66:249-306.
- Turner BL, Frossard E, DS Baldwin (2005b) *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Cambridge, USA, pp. 399.
- Ullah AHJ, Phillippy BQ (1994) Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using *myo*-inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.* 42: 423–425.



- Ullah AJ, Sethumadhavan K, Lei XG, Mullaney EJ (2000) Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Bioch Bioph Res Comm* 275: 279-285.
- Vadez V, Lasso JH, Beck DP, Drevon JJ (1999) Variability of N<sub>2</sub> -fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica* 106: 231-242.
- Vadez V, Rodier F, Payre H, Drevon J.J (1996) Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 871-878.
- Van Etten RL (1982) Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Ann. NY Acad. Sci.* 390: 27–51
- Van Hartingsveldt W, Van Zeijl CMJ, Harteveld M, Gouka RJ, Suykerbuyk MEG, Luiten RGM, Van paridon PA, Selten GCM, Veenstra AE, Van Gorcom RFM, Van den Hondel CAMJJ (1993) Cloning, characterization and overexpression of the phytase encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127: 87–94.
- van Kessel C and Roskoski JP (1983) Fertilizer and soil shading effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. *Plant Soil* 72: 95-105.
- Vance CP, C Uhde-Stone, DL Allan (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157:423-447.
- Vats P, Banerjee UC (2004) Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb Technol* 35: 3-14.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil* 255:571-586.
- Vincent JB, Crowder MW, Averill BA (1992) Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* 17: 105–110.



- Vohra A, Satyanarayana T (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 23, 29-60.
- Williams CH, Anderson G (1968) Inositol phosphates in some Australian soils. *Austra J Soil Res* 6, 121–130.
- Woodcock EA, Mitchell CJ, Biden TJ (2003) Phospholipase C $\delta$ 1 does not mediate Ca<sup>2+</sup> responses in neonatal rat cardiomyocytes. *FEBS Let* 546, 325–328.
- Wyss M, Pasamontes L, Rémy R, Kohler J, Kuszniir E, Gadiant M, Müller F, van Loon APGM (1998) Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Appl Environ Microbiol* 64:4446–4451.
- Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A et al. (1999) Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* 65: 359-366.
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, Cho KK, Kim JW, Lee SC, Jung YH (1996) Isolation and identification of phytase- producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb Technol* 18, 449–454.
- Yoshida RK (1940) Studies on organic phosphorus compounds in soil; isolation of inositol. *Soil science*, 50, 81-89.
- Yoshida K-I, Aoyama D, Ishio I, Shibuyama T, Fujita Y (1997) Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 179, 4591–4598.
- Zimmermann P, Zardi G, Lehmann M, Zelder C, Amrhein N, Frossard E, Bucher M (2003) Engineering the root–soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnol J* 1: 353–36





## Chapitre 2

### Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean

Chapitre 1 : revue bibliographique

Chapitre 3 La faible disponibilité en P stimule les des activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif

Introduction générale



Chapitre 4

Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.

Conclusion générale et perspectives



---

## Chapitre 2

### **Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency**

---

Il est reconnu que la faible disponibilité du phosphore (P) dans les sols constitue un problème majeur pour la production des plantes (Deng *et al.*, 1998; Cassman *et al.*, 1981; Itoh, 1987) et spécialement les légumineuses (CIAT, 1987), grandes consommatrices de P. Cependant, les organismes du sol tels que les bactéries ont développé de nombreuses stratégies pour l'amélioration de la disponibilité en P. La sécrétion d'enzymes spécifiques (phytases) est une de ces stratégies.

Les objectifs de ce deuxième chapitre sont donc les suivants :

- a) Caractériser la communauté bactérienne cultivable minéralisant le phytate dans la rhizosphère du haricot sous conditions de déficience en Pi.
- b) Evaluer les propriétés des phytases secrétées par ces bactéries rhizosphériques et particulièrement leur efficacité à libérer du Pi en minéralisant le phytate.
- c) Ajuster le dosage de la phytase pour les bactéries de la rhizosphère.

Pour répondre à notre premier objectif, le haricot a été cultivé sous serre en pots, nous avons utilisé un sol brun échantillonné dans de la station expérimentale de l'INRA Montpellier (France). Deux parcelles ont été choisies pour leurs concentrations contrastées en P inorganique. Les bactéries ont été isolées, dénombrées et caractérisées par séquençage.

Pour répondre à notre deuxième objectif, les bactéries isolées sur milieu sélectif ont tout d'abord été cultivées dans un milieu liquide contenant du phytate comme seule source de P afin de stimuler la sécrétion des phytases puis nous avons dosé le Pi libéré dans le milieu.

Pour répondre à notre troisième objectif nous avons ajusté le dosage de la phytase afin de valider l'utilisation de ce dosage pour la détection de cette enzyme libéré par les bactéries de la rhizosphère.



L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un premier article intitulé : "Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency" **publié dans European Journal of soil biology** (Maougal *et al.*,2014)

## Références

- Cassman KG, Whiteny AS, Fox RL (1981) Phosphorus requirements of soybean and cow pea as affected by mode of Nnutrition. J agro 73: 17–22.
- CIAT (1987). CIAT annual report, 1986.CIAT, Cali, Colombia.
- Deng S, Kahn ML, McDermott TR (1998) Characterisation and transposon mutagenesis of a non specific acid phosphatase cloned from *Rhizobium meliloti*. Archives Microbiology 170: 18-26.
- Duff MG, Sarath G and Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Physiol Plant 90: 791-800.
- Itoh HS (1987) Characteristics of phosphorus uptake of chickpea in comparison with pigeon pea, soybean and maize.Soil Scie Pla Nut 33: 417–422.



---

## **Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency**

---

Maougal, R.T.<sup>1,2</sup>, Brauman, A.<sup>3</sup>, Plassard, C.<sup>1</sup>, Abadie, J.<sup>1</sup>, Djakoun, A.<sup>2</sup> and Drevon, J-J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR Eco&Sols, 2, Place Pierre Viala, F-3406-Montpellier, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biologie et d'Ecologie, Université Constantine 1, Route de Ain el Bey, Constantine, Algeria.

<sup>3</sup>IRD, UMR Eco&Sols, Land Department development, Bangkok, Thailand

Address E mail of all authors:

Rim Tinhinen Maougal: maougalr@gmail.com

Alain Brauman: alain.brauman@ird.fr

Claude Plassard: plassard@supagro.inra.fr

Josinae Abadi : abadie@supagro.inra.fr

Abdelhamid Djakoun: djakoun@umc.edu.dz

Jean-Jacques Drevon: drevonjj@supagro.inra.fr

### **Abstract**

Phytate (a form of Inositol phosphate), which is one of the most abundant sources of organic phosphorus (Po) in soils, needs to be mineralized by microbial phosphatases to become available for plants. Phytases are the most active phosphatases for the dephosphorylation of phytate but the ecology of the phytate mineralising bacteria (PMB) remains poorly understood. The aim of this work was to determine if PMB represent an important component of the rhizosphere of legumes and if their density and their activities depend upon the soil-P availability. In this work the density, activity and phylogenetic affiliation of the PMB were characterized in the nodulated rhizosphere of a legume (*Phaseolus vulgaris*) grown in two soils with contrasting





Low-P or P-sufficient content. Screened on solid medium, the density of PMB was higher in the rhizosphere of common bean than in the bulk soil only when plants were cultured on the low-P soil. In liquid culture, half of the rhizosphere isolates were able to use phytate as the sole P source and to release free inorganic P in the medium at rates much higher when bacterial strains were isolated from low-P than from P-sufficient soil. Enzymatic activity confirmed the ability of these rhizosphere isolates to mineralize phytate. Whatever the soil P level, the PMB belonged to the same genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* and *Salmonella*, but not *Bacillus*. Our work demonstrates that low soil P availability increases both PMB density in the rhizosphere compared to the bulk soil and the activities of PMB populations through different growth patterns.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, phytase activity, phosphorus, rhizosphere, soil bacteria

## II.1.Introduction

In the natural calcareous soils of the Mediterranean region, symbiotic nitrogen fixation (SNF) is frequently limited due to low phosphorus (P) nutrient availability [1]. P deficiency affects legumes more than other crops since SNF is an energetically expensive process requiring more inorganic P (Pi) than mineral nitrogen (N) [2]. This advocates the greater need of P for legumes than for nitrate-supplied plants [3]. Approximately 60% of beans in Latin America [4] and 44% of beans in Africa [5] are grown on severely P-deficient soils. Low phosphorus availability is thus a primary constraint to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production.

An important soil P reservoir is the organic P (Po) pool, which may account for 29-65% of total soil P [6]. To become an available P source, organic P must be mineralized through the activity of phosphatase enzymes that have been shown to be enhanced by P deficiency in the rhizosphere of a range of species [7, 8]. The soil organic P pool is composed of several different forms of phosphate mono- or di-esters. Nevertheless, the predominant form of Po in most soils is myo-inositol hexakisphosphate, also known as phytic acid or phytate [9, 6].

Plants may utilise phytate after hydrolysis of C-O-P ester bonds by a special group of phosphatases, known as phytases that are capable of hydrolysing phytate to a series of lower phosphate esters of myo-inositol and phosphate [10, 6]. On the basis of



variations in structure and catalytic mechanisms, phytases can be divided into cysteine phytases (CPhy), purple acid phosphatase (PAP), histidine acid phosphatases (HAP) and  $\beta$ -propeller phytases (BPP) [11, 12, 13]. Thanks to endogenous phytases, plants are able to mobilize P from phytate in the seeds during germination [14]. However, experimental data obtained so far indicate that the roots have a very low capacity to use phytate as the sole P source when grown in axenic conditions [15, 16, 17].

Several reports have evaluated the phytase activities of bacteria isolated from soil such as *Bacillus* sp. [18, 19, 20, 21, 22], *Pseudomonas* sp. [23, 24], and *Enterobacter* sp. [25]. A study [26] showed that the rhizosphere soil of plants grown in volcanic soils with adequate available P contents (ranging from 30 to 48 mg kg<sup>-1</sup> soil of bicarbonate extractable Pi) contained both phosphate-solubilizing bacteria (PSB) able to solubilize mineral P and phytate-mineralizing bacteria (PMB) able to mineralize phytate in vitro. The relative proportion of PMB vs PSB was higher in the pasture rhizosphere of perennial ryegrass and white clover, than in such crop plants as oat and wheat [26], suggesting that phytate mineralization may be more important in pastures independently of soil P availability. The same authors showed also that Gram-positive bacterial populations isolated from volcanic soils with contrasting P contents (ranging from 5 to 30 mg kg<sup>-1</sup> soil of bicarbonate extractable Pi) contained variable proportions of PSP and PMP cultivable bacteria bacterial populations [27]. However, these proportions were not clearly related with soil P status. In a recent study [28], the same authors quantified the presence of *Bacillus* BPP gene in rhizosphere soil samples from volcanic soils using quantitative PCR. The highest abundance of the BPP gene ( $\sim 1.2 \times 10^6$  cells g<sup>-1</sup> of soil) was found in the natural pasture with the lowest P-level (5 mg P kg<sup>-1</sup> soil) whereas the lowest one ( $3.6 \times 10^4$  cells g<sup>-1</sup> of soil) was detected in pasture soil from an experimental station with the highest P-level (45 mg P kg<sup>-1</sup> soil) [28]. These results therefore suggest that soil P deficiency may increase the abundance of *Bacillus* populations harbouring the phytase BPP gene. However, the impact of low-P soil conditions on the rhizospheric PMB communities' remains poorly understood and constitutes the aim of this study.

In this study, we hypothesized that common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) will cope with low-P soil conditions by stimulating the activity and density of their rhizospheric PMB. We tested this hypothesis by growing beans in two soil samples from the same



**Planche 1 : photos du dispositif expérimental sous serre  
Culture en pot du haricot**

area with low-P and sufficient-P contents, respectively, according to their levels of bicarbonate-extractable mineral P.

## **II.2. Materials and methods**

### **II.2.1. Plant growth conditions and soil sampling**

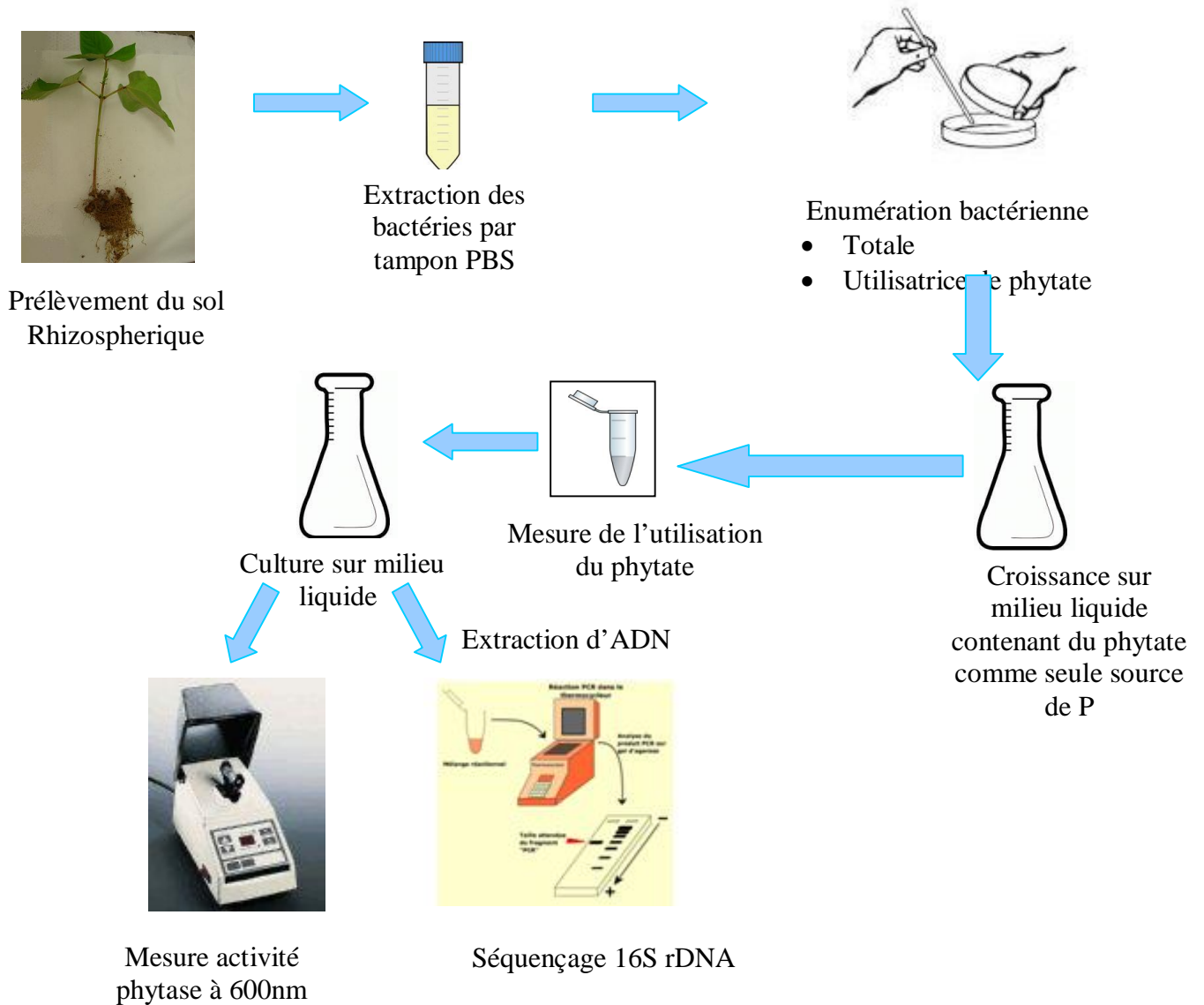
The common bean P-deficiency-sensitive recombinant inbred line 147, originating from the cross between BAT477 and DOR364 [29] was used as model plant. Seeds were surface sterilised and pre-germinated during 4 days. Plants were grown in a glasshouse, into 1 L pots filled with a brown calcareous soil (haplic soil, WRB) containing either 15 mg of bicarbonate extractable P kg<sup>-1</sup> soil, subsequently denominated “Low-P” soil, or 50 mg of bicarbonate extractable P kg<sup>-1</sup> soil, subsequently denominated “Suff-P” soil. The soil originated from a cultivated field in the experimental station of Institut National de la Recherche Agronomique at Maugio, Montpellier, France. The pH measured in KCl was 8. For the growth of beans, three replicated pots per treatment, containing 3 plants in each pot, were transferred under glasshouse, and received distilled water in order to maintain soil water capacity.

Rhizosphere and bulk soil samples were randomly collected 3 weeks after germination, at the development stage corresponding to nodulation. Samples from pot were separated into root systems and their adhering soil, considered as the rhizosphere of which 10 g were suspended in 90 ml of phosphate buffered saline (PBS) buffer 0.1 M (138 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0). The flasks were placed on shaker one hour at 150 rpm to prepare rhizosphere soil solution. Simultaneously, soil bulk was sampled and homogenised (10 g were suspended in 90 ml of PBS) for bacterial counts.

### **II.2.2. Enumeration and isolation of total cultivable bacteria and phytate-utilising bacteria**

Serial dilutions of the soil suspension were plated on Luria Bertani broth (LB) agar [26] to obtain the number of total cultivable bacteria after 2 days incubation at 28°C. The same dilutions were also plated on Angle medium [30], as modified by Richardson and Hadobas (1997) [23] to obtain the number of cultivable bacteria with ability to utilize phytate after 5 days at 28°C as indicated by the development of a clearing zone around the colonies.

## Chapitre 2 Capacités des bactéries à minéraliser le phytate augmente dans la rhizosphère du haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous P déficient



All the isolates from rhizosphere soil dilutions that showed clearing zones in the Angle medium were subsequently inoculated in liquid phytate-specific medium containing: 1 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 4 mM CaSO<sub>4</sub>, 50 mM MOPS (3-[N-morpholino]propane-sulfonic acid, Sigma ref M-1254) pH 7, 55 mM glucose, 50 µg/L thiamine-HCl, 0.5 ml/L Fe-citrate 1% (W/V), and 0.2 ml/L micro-nutrient solution (containing per liter: 2.82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 98 mg CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 3.08 g MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 0.29 g NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 4.41 g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O [31]). Phytate was prepared in ultrapure water by dissolving Na-phytate (Sigma, ref P0109) in order to obtain a final concentration of 6 mM Na-phytate. The pH of this solution was adjusted to 7 with HCl 6N and was sterilized by filtration (0.2 µm pore size). The nutritive solution was autoclaved at 120°C, during 20 min, and cooled to 50-55°C before addition of phytate. During the culture, 2 ml broth samples were regularly taken (each 24h until 96h) in sterile conditions to measure bacterial density at 630 nm. The remaining sample was centrifuged at 10,000 g for 2 min, and free Pi concentration was measured in the supernatant using the malachite green method [32]. As a phytase producing bacteria control, we used a strain of *Bacillus subtilis* previously isolated from *Pinus pinaster* roots [33]. We select for further studies only the isolates able to release a net amount of Pi as they should have a significant phytase activity.

### **II.2.3. DNA extraction and sequence analysis of 16S rDNA gene**

Every freshly grown colony on LB agar plates was suspended in 30 µl of sterile water in a sterile microtube. Bacteria were then boiled for 20 min. The suspension was then centrifuged at 10,000 g for 2min, and the supernatant was used as the template for PCR amplification of 16S rDNA gene. Amplification was run with Taq polymerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) using the primer pair: GC-341F forward (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') and 518R reverse (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') from Eurogentec SA (Liège, Belgium). The thermo cycling pattern used was 94°C for 2 min (one cycle); 94°C for 30 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s (25 cycles, with a decrease of 0.5°C / cycle), 55°C for 30 s and 72°C for 30 s (10 cycles) and 72°C for 10 min (one cycle). After checking the presence of one single band of circa 180 bp on gel electrophoresis, PCR products were sequenced by Cogenics (<https://www.cogenicsonline.com>) using the GC-341F





primer. The presence of the GC clamp in the sequence indicated the end of the amplicon. Bacteria were identified at least at the genus level by launching a query through blast of NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **II.2.4. Phytase assays**

After the stationary phase was reached in the broth described above, 200 ml of bacterial culture were centrifuged at 11,000 g for 15 min. The supernatants (190 ml) were loaded onto Amicon filter units (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, with a cutoff of 10 kDa) and spun at 10,000 g for 20 min. The filter was washed with ultrapure water giving an enzyme extract concentrated about 50 times compared to the initial culture medium. The pellets were washed with sterile distilled water and re-suspended in a volume of water to obtain a bacterial extract concentrated approximately 50 times, as for culture medium. The two concentrates were then used for measurement of phytase activity.

The phytase activity was measured as described by Shimizu (1992) [21] with the following modifications: 100  $\mu$ l (instead of 150  $\mu$ l) of the concentrate was mixed with 100  $\mu$ l of 10 mM (instead of 2 mM) Na-phytate (pH adjusted to 7) as a substrate and 300  $\mu$ l assay buffer consisting of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7 and 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (instead of 600  $\mu$ l of 0.1 M Tris HCl supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Phytase activity was determined from the net increase of inorganic P in the reaction medium. Preliminary experiments were run with *B. subtilis* concentrated cultures to check the linearity of  $\text{P}_i$  release, which was found detectable and linear over incubation periods ranging from 2 up to 10 hours (data not shown). To be sure to get a measurable activity, we incubated the samples for 4 h at 37°C (instead of 15-30 min in [21]). For each bacterial isolate, and each concentrate, 4 replicates were run for one measurement. In one replicate, the reaction was stopped immediately by addition of 500  $\mu$ l of 5% trichloroacetic acid to measure the residual  $\text{P}_i$  in the assay. The remaining replicates were incubated 4 h at 37°C before stopping the reaction. The solutions were centrifuged at 11,000 g for 10 min. The  $\text{P}_i$  concentration of the supernatant was measured with the malachite-green method as described by Ohno and Zibilske (1991) [32].



## II.2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed analysed using Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The normality of our data was checked using the test of Kolmogorov Smirnov. When data followed a normal distribution, as in the case of total bacterial counts, the differences between soil treatments were analyzed using one-way ANOVA. When the data did not follow a normal distribution, differences between soil types or between bacterial species were analysed using non-parametric comparisons of Mann-Whitney and Kolmogorov-Smirnov for two samples and Kruskal-Vallis for multiple comparisons. Mean values were considered different at  $p < 0.05$ .

## II.3. Results

### II.3.1. Isolation of total cultivable bacteria and phytate-utilising bacteria

In rich medium (LB) colonies appeared after 24 h of incubation while in phytate-specific medium (Angle medium), they were visible after 72 h incubation. The density ( $10^4$  CFU  $g^{-1}$  dry soil) of culturable phytate-utilising bacteria from rhizosphere soil corresponded to 1% of the density of total cultivable bacteria ( $10^6$  CFU  $g^{-1}$  dry soil) (Fig. 1).

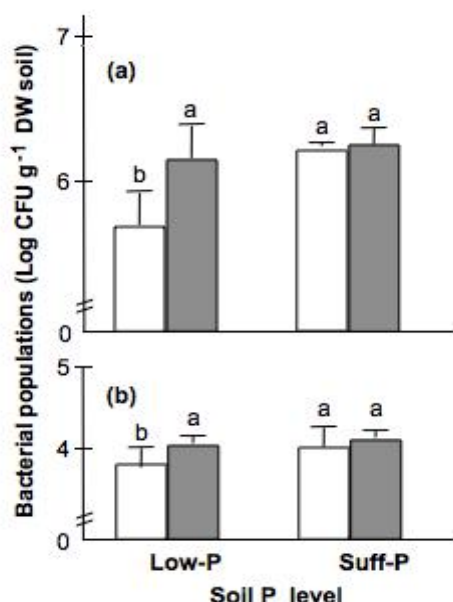


Fig. II.1. Enumeration of bacterial CFU per gram dry weight from bulk soil (white bars) or rhizosphere soil (grey bars) from *Phaseolus vulgaris* on LB medium (a) and Angle medium (b). Plants were grown for three weeks in soil samples of low-P or sufficient P levels,



corresponding to 15 and 50 mg of bicarbonate-extractable inorganic P per kg of dry soil, respectively. Bars are means  $\pm$  sd (n=3) and for each P level, different letters denote significant differences between bulk and rhizosphere soil (one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Bacterial densities were significantly higher in rhizosphere than in bulk soil only in low-P soil (Fig. 1) and this increase was greater in rich medium (LB medium, Fig. 1a) than in specific medium (Angle medium, Fig. 1b). Overall, 57 rhizosphere bacterial isolates were able to grow and to produce a clearing zone on Angle medium, suggesting a bacterial mineralization of phytate.

### **II.3.2. Identification of true phytate–mineralizing bacterial isolates**

All the 57 isolates able to grow on Angle medium were then grown in liquid medium with phytate as sole source of P. Only half (26 isolates) were able to grow in liquid medium and displayed a significant accumulation of free Pi in the culture medium (data not shown).

In order to verify whether these isolates belong to *Bacillus* known as the major genus of bacteria hydrolysing Ca-phytate, we amplified 16S rDNA using a primer pair targeting the V3 region, known as the most discriminating [34]. Data in Table 1 indicate that all the 26 strains were Gram negative and belonged to the beta-subdivision of the proteobacteria; 11 strains showed high level of similarity with *Pseudomonas*, 7 strains with *Pantoea*, 6 strains with *Enterobacter*, and only 2 strains with *Salmonella*. The same genera were found in both soils.



**Table 1. Description of bacterial isolates able to grow in liquid medium containing phytate as the sole source of P.**

The bacterial strains were isolated from rhizosphere soil collected around bean roots grown in soil containing a low-P or sufficient-P (suff-P) level using Angle's solid medium. These culture conditions provided 57 isolates able to give a clearing zone and of these 57 strains, only 26 were able to grow in liquid medium (designed as isolate n°); each of them was identified from 16S rDNA sequencing to get the closest species deduced from the identity level that was always close to 99%. Phytase activity was measured either in culture medium (extracellular) and bacterial pellet (cell-associated) concentrated 50 times each. Values are the means of three phytase activity measurements. The variation coefficients of means were on average 5%.

Soil type	Isolate n°	Closest species	Phytase activity (nmol Pi. min <sup>-1</sup> . ml <sup>-1</sup> concentrate)		
			Extracellular	Cell-associated	
Low-P	23	<i>Enterobacter</i> sp.	0.65	0	
	3	<i>Enterobacter</i> sp.	0.5	0	
	14	<i>Enterobacter</i> sp.	0	1.4	
	12	<i>Enterobacter</i> sp.	0	1.2	
	1	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	
	22	<i>Pantoea</i> sp.	0	0.5	
	2	<i>Pantoea</i> sp.	0.58	0	
	13	<i>Pantoea</i> sp.	0.5	0	
	9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.45		0
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>			0.3
	20	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.9	0.5	
	18	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0.55	
	17	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.9	0.6	
	16	<i>Salmonella enterica</i>	0	0.6	





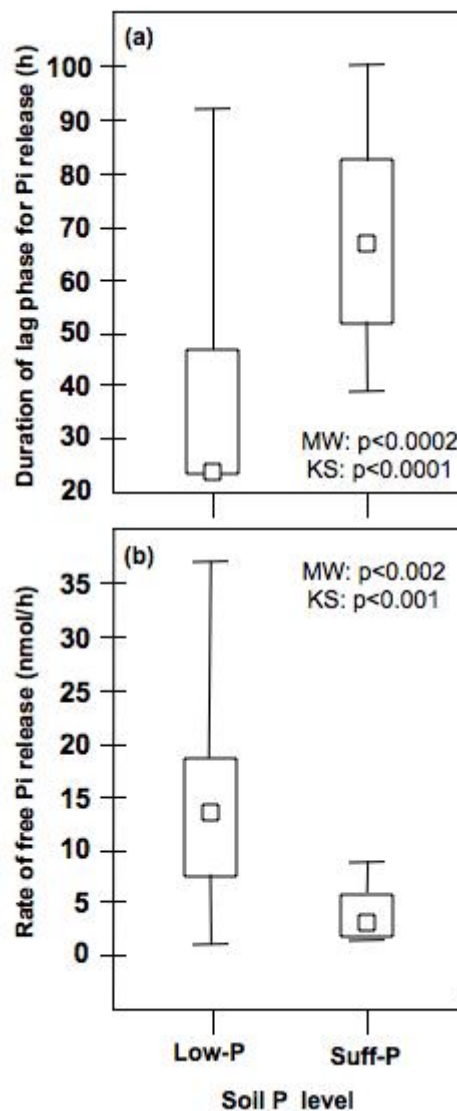
**Table 1. Description of bacterial isolates able to grow in liquid medium containing phytate as the sole source of P.**

Soil type	Isolate n°	Closest species	Phytase activity (nmol Pi. min <sup>-1</sup> . ml <sup>-1</sup> concentrate)	
			Extracellular	Cell-associated
Suff-P	47	<i>Enterobacter</i> sp.	1.2	0
	52	<i>Enterobacter</i> sp.	0.8	0
	48	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.17	0
	38	<i>Pantoea</i> sp.	0.95	0.6
	34	<i>Pantoea</i> sp.	0	0.4
	43	<i>Pseudomonas cedrina</i>	0.65	0
	59	<i>Pseudomonas cedrina</i>	0.8	1.4
	42	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.63	1.15
	44	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.78	0
	40	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	1.5
	36	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0.45
	31	<i>Salmonella enterica</i>	0.75	0

### II.3.3. Physiology of isolates in liquid medium

Each isolate displayed a specific growth curve that could be characterized by two parameters that are the duration of the lag phase to release free Pi expressed in hours, and the rate of free Pi release, expressed in nmol Pi per hour. As shown in Fig. 2, the bacterial strains isolated from rhizosphere of plants grown in low-P or sufficient-P soil displayed opposite trends for these two parameters.



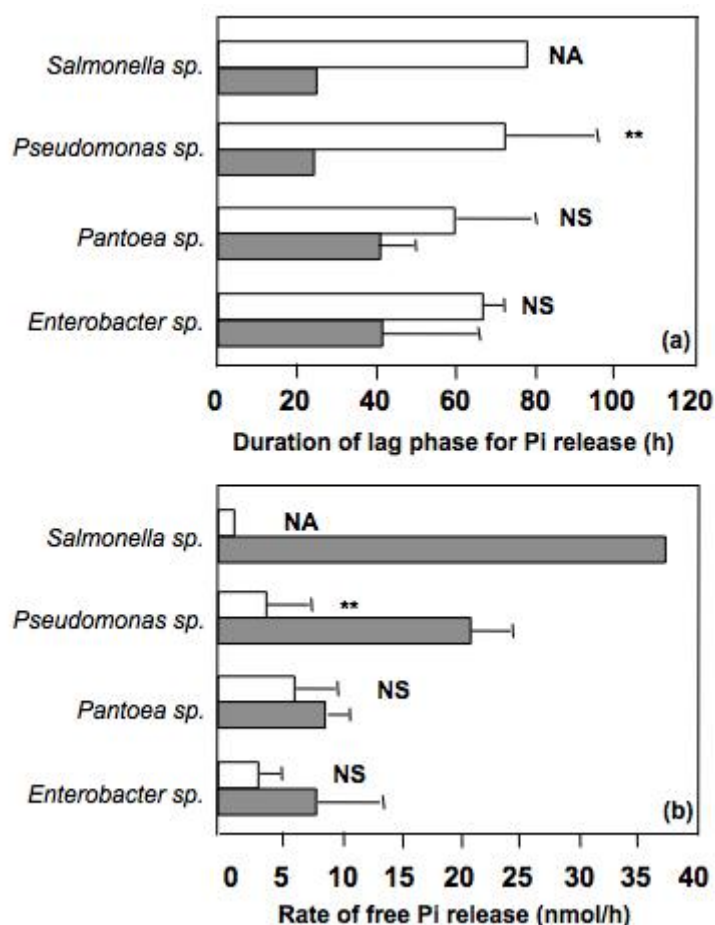


**Fig.II. 2. Duration of lag phase for Pi release (a) and rate (b) of Pi release by bacteria grown in liquid medium containing phytate as the sole source of P.** The bacteria were isolated from *Phaseolus vulgaris* rhizosphere soil grown in soil samples of low-P or sufficient P levels (see Fig. 1 for details). Each box-plot represents the median ( $\square$ ), the first and the third quartiles ( $\square$ ) and the minimal-maximal values ( $\text{T}$ ) of 14 (Low-P) and 12 (Suff-P) bacterial isolates, each bacterial culture was replicated 3 times. Differences between soil P levels were analyzed using non-parametric comparisons of Mann-Whitney (MW) and Kolmogorov-Smirnov (KS).

Also, the duration of lag phase was much shorter in low-P than in sufficient-P soil ( $p < 0.02$  Mann-Whitney test,  $p < 0.01$ , Kolmogorov-Smirnov test, Fig. 2a). On average, the lag phase lasted from 25 to 70 h for bacteria isolated from low-P and sufficient-P rhizosphere soil, respectively. However, only *Pseudomonas* sp. displayed



a lag phase significantly lower in low-P than in sufficient-P soil ( $p < 0.01$ , Kolmogorov-Smirnov test) (Fig. 3a).



**Fig.II. 3. Duration of lag phase for Pi release (a) and rate (b) of Pi release for each bacterial genus grown in liquid medium containing phytate as the sole source of P given in Table 1.** The bacteria were isolated from *Phaseolus vulgaris* rhizosphere soil grown in soil samples of low-P (white bars) or sufficient P (grey bars) levels (see Fig. 1 for details). For each genus, differences between soil P levels were analyzed using non-parametric comparison of Kolmogorov-Smirnov, with NS: no significant difference, \*\*: significant difference at  $p < 0.01$  and NA: no test applicable ( $n=1$ ).

Regarding the rates of free Pi release, the bacterial strains from low-P soil released free Pi into the medium at rates significantly greater (3 times on average) than bacterial strains isolated from sufficient-P soil ( $p < 0.02$  Mann-Whitney test,  $p < 0.01$  Kolmogorov-Smirnov test, Fig. 2b). The values of Pi release by bacteria isolated from low-P soil displayed a much higher variability than those measured for sufficient-P soil. This large variation of free Pi release rate in low-P soil was mainly



due to contrasted specific abilities of bacterial species (Fig. 3b), with *Salmonella* sp. releasing the greatest amount of Pi ( $>35 \text{ nmol Pi h}^{-1}$ ), followed by *Pseudomonas* sp. ( $20 \text{ nmol Pi h}^{-1}$ ), *Pantoea* sp. ( $10 \text{ nmol Pi h}^{-1}$ ) and *Enterobacter* sp. ( $7 \text{ nmol Pi h}^{-1}$ ). In contrast, the values of Pi released by bacteria of the same genera, isolated from sufficient-P soil displayed a low level of variability (Fig. 2b). The comparison of means between low-P and sufficient-P for each group of species (Fig. 3b) showed that only bacteria belonging to *Pseudomonas* sp. displayed a rate significantly higher in low-P than in sufficient-P soil ( $p < 0.01$ , Kolmogorov-Smirnov test). Although the bacteria belonging to *Salmonella* sp. displayed a huge difference between the two P conditions, a statistical analysis was not possible since there was only one replicate per P condition (Table 1).

#### **II.3.4. Phytase activity**

In order to check whether the Pi production was related to a phytase activity, a phytase assay was performed during maximal growth on the 26 isolates able to grow in phytate liquid medium. Most of isolated bacteria displayed a measurable phytase activity (Table 1), either extracellular (69% of the isolates) or cell-associated (54% of the isolates). The level of phytase activities of the isolates were of the same order of magnitude as those measured with our control *B. subtilis* strain that produced an extracellular activity of  $0.9 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ ml}$  of concentrated extract. Except some *Pseudomonas* ( $n^{\circ} 17, 18, 20, 42$  and  $59$ ) and *Pantoea* ( $n^{\circ} 38$ ) strains, all the strains produced only one type of phytase, either in the medium or associated with the cell (Table. 1). There was no significant effect of soil P level on the extracellular, the cell-associated phytase or the sum of both activities either analyzed at the level of all bacterial genera or only at the level of *Pseudomonas* sp. (data not shown).

#### **II.4. Discussion**

The main objective of our work was to assess to what extent soil of contrasting bicarbonate extractable P levels changed the density and physiological activities of the culturable phytate mineralizing bacteria isolated in the rhizosphere of nodulated beans. Thus we screened first the isolates on solid medium following the Angle's *et al* method used by several authors [28, 35]. Our observation that only 26 among 57 rhizosphere isolates presenting a clearing zone, were able to grow in liquid medium





with phytate as the sole source of P also agrees with that of Patel *et al* (2010) [6]. This confirms that the screening of bacterial community on solid media containing phytate through the production of a clearing zone is not specific of the phytate-mineralizing bacterial community. Indeed, a clearing zone found in the medium could be due the solubilization of Ca-phytate following medium acidification due to the release of organic anions, as shown for bacteria isolated from the pigeon pea rhizosphere [6]. In contrast, the culture in liquid medium, together with measurement of free Pi release, appears to be the best methodology to confirm phytate-mineralizing bacteria [6] as confirmed in this work. Finally, we found that the proportion of isolates able to use phytate in liquid medium represented only 1% of the total cultivable bacteria, which is in agreement with previous values of 0.5% [23]. and 1.9% [35] found in other plant rhizosphere soils.

The phylogenetic affiliation demonstrated a higher proportion of *Pseudomonas* spp than the other genera (Table 1) whatever the P soil availability. With 38% of total isolates, they constitute the most frequent genus associated with the rhizosphere of common bean. This result is in accordance with previous studies that reported the presence of *Pseudomonas* sp. in the rhizosphere of numerous plant species [33, 36, 26, 27, 28 ], some of these strains displaying an ability to mineralize phytate [8, 26] as well as *Pantoea*, and *Enterobacter* [26, 6]. In most of the studies aiming at identifying PMB bacteria in the rhizosphere of crop plants, *Bacillus* species were the most important bacterial community able to mineralize phytate [37, 38, 39]. However, our results did not follow the same trend as no *Bacillus* or *Klebsiella* species [6] were found in the rhizosphere of the nodulated beans. Moreover, no significant difference was noticed between the bacterial structure of the low-P and sufficient-P soils, suggesting that this structure is not P dependant.

Previous study [28], demonstrated that  $\beta$  propeller (BPP) levels of gene expression from *Bacillus* species were induced in phytate enriched soil. In contrast, our study revealed that PMB isolates from *P. vulgaris* rhizosphere were more active (shorter lag phase, higher rates of Pi production) in P deficient soil than in P sufficient one. Especially, *Pseudomonas* strains could be an important component of the adaptation of legume in P deficient soil as they are abundant, the faster growing species and the most active in terms and Pi production rate when isolated from low-P rhizosphere soil. These results are in good agreement with those already reported



[40], suggesting that, thanks to their phytate-mineralization abilities, the rhizospheric *Pseudomonas* communities play a key role in the improvement of plant P availability. In our study, it is interesting to notice that the higher capacities of *Pseudomonas* strains to use phytate in liquid culture is not due to higher phytase activities when bacteria are isolated from low-P than from P-sufficient rhizosphere soil, but to different growth curves according to soil P levels. We can hypothesize that genetic differences, either occurring at the species level, or at the regulation of gene expression, may explain these functional differences between the populations of *Pseudomonas* strains isolated from the two rhizosphere soils. Taken as a whole, our data suggest strongly that the nodulated bean plants were able to adapt their microbial community as a function of P availability by selecting bacteria with greater ability to mineralize phytate in P deficient than in P sufficient conditions. This capacity, if specific of nodulated legumes, could be an efficient strategy to mobilize inorganic Pi from soil phytate and could participate to the increase of P availability observed in intercropped cultures between cereals and legumes [41].

The measurement of phytase activity showed that all the bacteria able to grow on liquid medium with phytate as sole source of P displayed a phytase activity (Table 1) whose values were not significantly different in bacteria isolated from low-P or P-sufficient rhizosphere soil. A majority of them produced extra-cellular enzymes, this result matches those of Hussin *et al.* (2007) [42] for species such as *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovorus* and *Enterobacter* sp 4 [10, 42] found in the rhizosphere of maize. However, the simultaneous presence of cell-associated and extracellular enzymes in some bacteria as shown previously [6] suggests different mechanisms to hydrolyse inositol phosphates in the external environment or within the periplasm. Indeed, the search for phytase-like genes [43] or proteins in public databases showed that all classes of phytases have been reported in different bacterial strains isolated from various environments [13]. In particular, HAP-like and BPP-like proteins were the most frequently found, especially in proteobacteria for HAP and in all bacterial groups for BPP, except in  $\beta$ -proteobacteria and acidobacteria [13]. *Enterobacter*, whose extracellular phytase activity was maximal at pH values from 6.0 to 8.0 [25] and *Salmonella* were reported to possess HAP-like genes only whereas *Pseudomonas* was reported to have cysteine-phytase, HAP-like and BPP-like genes and corresponding proteins [13]. However, HAP phytases are acid



phosphatases displaying a maximal activity at acidic pH and a very low activity at pH above 6 [37, 38]. In contrast, BPP phytases are neutral to alkaline phosphatases requiring calcium to be active [11]. In our work, we detected phytase activities at pH 5 but they were very low compared to those measured at pH 7 (data not shown). Therefore, the conditions of our phytase assay (with calcium and buffered at pH 7) are much more favourable to the activity of BPP phytases than to HAP phytase, even if they do not exclude activity arising from HAP phytase. Our results suggest that all the bacteria displaying a phytase activity in our conditions may possess a BPP phytase that could be more appropriate than HAP phytase to actively mineralize phytate in calcareous soils of Mediterranean basin. Our experimental data suggest therefore that bacteria belonging to *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Pantoea* could mineralize phytate in the rhizosphere of a legume plant through the production of BPP enzymes either released into the soil or associated with the cells.

Overall our results indicate that bean plants grown under P deficiency increased the bacterial phytase activities in their rhizosphere. This may indicate a positive selection by root of strains presenting this function under P deficiency. The similarity of the BMP bacterial density between rhizosphere and bulk in sufficient-P soil suggest that there is no selection of PMB in the rhizosphere of common bean under P sufficiency. Further work can now be considered to assess the impact of these populations on mineralisation of Po especially as phytate, found in Mediterranean soil, in order to use phytate-mineralizing bacteria as inoculants for P nutrition.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a Great Federative FABATROPIMED Project (2011–2015) and AVERROES scholarship programme provided by the EU for the stay of Rim Tinhinen Maougal in Montpellier. The authors thank Sarah Acherar and Catherine Pernot (INRA Montpellier, France) for their technical assistance.



## References

- [1] W. J. Broughton, G. Hernandez, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, J. Vanderleyden, Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil*. 252 (2003) 55–128.
- [2] V Vadez, J.J Drevon, Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie*. 21 (2001) 691-699.
- [3] D.W Israel, Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol*. 84 (1987) 835-842.
- [4] CIAT Standard system for the evaluation of bean germplasm. Cali, Colombia. 1987. 53 P.
- [5] C.S. Wortmann, D.J. Allen, African bean production environments; their definition, characteristics and constraints. Network on Bean Research in Africa. Occasional paper Series No. 11 (1994). Dar es Salaam. Tanzania.
- [6] K.J. Patel, A.K. Singh, G. Nareshkumar, Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Appl Soil Ecol*. 44 (2010) 252–261.
- [7] A.E. Richardson, R.J. Simpson, Soil microorganisms mediating phosphorus availability: update on microbial phosphorus. *Plant Physiol*. 156 (2011) 989–996.
- [8] A.E. Richardson, T.S. George, M. Hens, R.J. Simpson, Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, UK, 2005, pp 165 – 184.
- [9] B.L. Turner, M.J. Papházy, P.M. Haygarth, I.D. McKelvie, Inositol phosphates in the environment. *Philos T Roy Soc B*. 357 (2002) 449–469.
- [10] A. Vohra, T. Satyanarayana, Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological application. *Crit Rev Biotechnol*. 23 (2003) 29-60.
- [11] E.J. Mullaney, A.H. Ullah, The term phytase comprise several different classes of enzymes. *Biochem Bioph Res Co*. 312 (2003) 179-184.
- [12] H.M. Chu, R.T. Guo, T.W Lin, C.C. Chou, H.L. Shr, H.L. Lai, T.Y. Tang, K.J. Cheng, B.L. Selinger, A.H.J. Wang, Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 12 (2004) 2015–2024.





- [13] M. Jorquera, O. Martinez, F. Maruyama, P. Marschner, M.L. Mora, Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microb Environ.* 23 (2008b) 182–191.
- [14] V. Raboy, Seed phosphorus and the development of low-phytate crops. In: B.L. Turner, A.E. Richardson, E.J. Mullaney (eds) *Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment*. CAB International, Wallingford, UK, 2007, pp. 111-132.
- [15] J.E. Hayes, R.J. Simpson, A.E. Richardson, The growth and phosphorus utilization of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil.* 220 (2000) 165-174.
- [16] A.E. Richardson, P.A. Hadobas, J.E. Hayes, Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ.* 23 (2000) 397-405.
- [17] A.E. Richardson, P.A. Hadobas, J.E. Hayes, C.P. O'Hara, R.J. Simpson, Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositolhexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant Soil.* 229 (2001) 45-56.
- [18] Y.M. Choi, H.J. Suh, J.M. Kim, Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp KHU- 10. *J Protein Chem.* 20 (2001) 287–292.
- [19] J. Kerovuo, M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkinen, J. Apajalahti, Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 64 (1998) 2079–2085.
- [20] Y.O. Kim, H.K. Kim, K.S. Bae, J.H. Yu, T.K. Oh, Cloning of thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its over expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 162 (1998) 185–191.
- [21] M. Shimizu, Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56 (1992) 1266–1269.
- [22] V.K. Powar, V. Jagannathan, Purification and properties of phytate specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 151 (1982) 1102–1108.
- [23] A.E. Richardson, P.A. Hadobas, Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol.* 43 (1997) 509–516.



- [24] G.C.J. Irving, D.J. Cosgrove, Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust J Biol Sci.* 24 (1971) 547–557.
- [25] S.J. Yoon, Y.J. Choi, H.K. Min, K.K. Cho, J.W. Kim, S.C. Lee, Y.H. Jung, Isolation and identification of phytase producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbiol Technol.* 18 (1996) 449–454.
- [26] M.A. Jorquera, M.T. Hernández, Z. Rengel, P. Marschner, M.L. Mora, Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol Fertil Soils.* 44 (2008) 1025–1034.
- [27] M.A. Jorquera, D.E. Crowley, P. Marschner, R. Greiner, M.T. Fernandez, D. Romero, D. Menezes-Blackburn, M.L. Mora, Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 75 (2011) 163 – 172.
- [28] M. A. Jorquera, N. Saavedra, F. Maruyama, A.E. Richardson, D.E. Crowley, R. Catrilaf, E. J. Henriquez, M. L Mora, Phytate addition to soil induces changes in the abundance and expression of *Bacillus*  $\beta$ -propeller phytase genes in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 83 (2013) 352 – 360.
- [29], J.J. Drevon, N. Alkama, A.P. Araujo, S. Beebe, M.W. Blair, H. Hamza, B. Jaillard, A. Lopez, E. Martinez-Romero, P. Rodino, F. Tajini, M. Zaman-Allah, Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Proc Environ Sci.* 9 (2011) 40-46.
- [30] J.S. Angle, S.P. McGrath, R.L. Chaney, New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol.* 57 (1991) 3674–3676.
- [31] S. Morizet, M. Mingeau, Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique (étude effectuée sur Tomate décapitée en exudation). I. Facteurs nutritionnels. *Annales Agronomiques.* 27 (1976) 183–205.
- [32] T. Ohno, L.M. Zibilske, Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Soc Am J.* 55 (1991) 892–895.



- [33] U. Irshad, A. Brauman, C. Villenave, C. Plassard, Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant Soil*. 358 (2012) 155–168.
- [34] S.Fall, J.Hamelin, F. Ndiaye, K. Assigbetse, M. Aragno, J.L.Chott, A.Brauman, Differences between bacterial communities in the gut of a Soil-Feeding Termite (*Cubitermes niokoloensis*) and Its Mounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007): 5199-5208.
- [35] M. Jossi, Rhizosphere bacterial communities associated with *Lolium perenne* structuration and plant-mediated influences. Thèse d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse. 2008.
- [36] O. A. Martínez, M. A. Jorquera, D. E. Crowley, M. L. Mora, Influence of nitrogen fertilisation on pasture culturable rhizobacteria occurrence and the role of environmental factors on their potential PGPR activities. *Biol Fertil Soils*. 47 (2011) 875 – 885.
- [37] J. R. De Freitas, M. R. Banerjee, J.J. Germida, Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils*. 24 (1997):358-364.
- [38] M. A. Jorquera, M. L. Mora, *Bacillus*-like phosphobacteria in agronomic volcanic soils from Chile. 19 th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. 1 – 6 August (2010) Brisbane, Australia.
- [39] V. Kumar, P. Singh, M. A. Jorquera, P. Sangwan, P. Kumar, A. K. Verma, S. Agrawal, Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J Microbiol Biotechnol.* 29(2013)1361–1369.
- [40] A.E. Richardson, J.M Barea, A.M McNeill, C. Prigent-Combaret, Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321 (2009) 305 – 339.
- [41] P. Hinsinger, E. Betencourt, L. Bernard, A. Brauman, C. Plassard, J. Shen, X. Tang, F. Zhang, P for Two, Sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology*. 156 (2011)1078–1086.



- [42] A.S.M. Hussin, A.E. Farouk, R. Greiner, H.M. Salleh, A.F. Ismail, Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *W J Microbiol Biotechnol.* 23 (2007) 1653-1660.
- [43] B.L. Lim, P. Yeung, C. Cheng, J.E. Hill, Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J.* 1 (2007) 321–330.





# Chapitre 3 La faible disponibilité en P stimule les activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif

Chapitre 2  
Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency



Chapitre 4  
Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.

Chapitre 1 : revue bibliographique

Conclusion générale et perspectives

Introduction générale



---

## CHAPITRE 3

### **La faible disponibilité en P stimule les activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif**

---

Dans les deux chapitres précédents, nous avons décrit le comportement des plantes sous conditions de cultures contrôlées, l'installation et la conduite des essais en plein champ représente une partie déterminante de la présente thèse surtout que les sols de la région étudiée se trouvant dans le bassin méditerranéen présentent les conditions nutritionnelles recherchées.

L'utilisation des légumineuses s'est montrée bénéfique pour le maintien de la productivité des agro systèmes (Graham et Vance, 2000) et ces espèces interviennent également dans le contrôle des insectes nuisibles, des maladies et des mauvaises herbes lorsqu'elles sont utilisées en assolement. Toutefois, cette culture est notamment entravée sous déficience des sols en P (Graham *et al.*, 2003) affectant jusqu'à 40% de la surface cultivable mondiale (Vance, 2001). Cette contrainte cause des pertes qui peuvent atteindre 15% du rendement maximal (Shenoy et Kalagudi, 2005).

Une forte relation entre l'activité phytase et l'épuisement du P organique du sol a été évoqué avec une variabilité importante dans l'activité rhizosphérique qui diffère selon les plantes. Ainsi cette activité était plus importante dans la rhizosphère des légumineuses que dans celle du millet (Yadav et Tarafdar, 2004). Sous déficit en P, ces enzymes constituent l'une des adaptations biochimiques qui interviennent dans l'amélioration de l'acquisition du P, son efficacité d'utilisation et sa remobilisation intracellulaire optimale (Raghothama, 1999 ; Vance *et al.*, 2003).

Vu l'importance de cette famille en faveur des systèmes de production et son influence positive sur la fertilité des sols, la culture des légumineuses est de plus en plus pratiquée en Algérie.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- a) Caractériser la communauté bactérienne minéralisant le phytate dans deux sols contrastants vis-à-vis de la déficience en P.



- b) Comparer l'évolution de cette communauté rhizosphérique pour deux RILs de haricot contrastant en utilisation de P pour la FSN.

Dans cette étude, deux génotypes de haricot ont été testés dans deux parcelles présentant, en plus de leurs propriétés physico-chimiques différentes, deux niveaux en P assimilable. La croissance des plantes, la nodulation et différents paramètres liés aux graines et la rhizosphère ont été analysés en relation avec l'efficacité d'utilisation du N (EUN) et du P (EUP). Les activités phytases ont été déterminées dans le sol des deux génotypes de haricot testés. La communauté bactérienne rhizosphérique totale et fonctionnelle a été mesurée également.

Les résultats de ce Chapitre ont été **Soumis à Canadian journal of microbiology**

### Référence

- Graham PH, Rosas, JC ; de Jensen, CE; Peralta, E; Tlusty, B; Acosta-Gallegos, J (Acosta-Gallegos, J); Pereira, PAA (Pereira, PAA).2003. Addressing edaphic constraints to bean production: the Bean/Cowpea CRSP project in perspective. *Field cro res.*23 : 179-192.
- Graham PH. et Vance CP .2000. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* 31: 872-877
- Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693.
- Shenoy VV et Kalagudi GM. 2005. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances* 23: 501-513.
- Vance CP, Stone CU. et Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytolo* 157: 423-447.
- Vance CP. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiol* 127: 390-397.
- Yadav BK. et Tarafdar JC. 2004. Phytase activity in the rhizosphere of crops, trees and grasses under arid environment. *J Arid Environ* 58: 285-293.



## **La faible disponibilité en P stimule les activités phytases de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans un agro-écosystème sous climat méditerranéen**

Maougal, R.T.<sup>1,2,3</sup> Baziz, K.<sup>2,4</sup>, Lazali, M.<sup>1,5</sup>, Drevon, J-J.<sup>1</sup> and Djekoun, A<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroécosystèmes, 2 Place Pierre Viala, F34060, Montpellier, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biologie et d'Ecologie, Université Constantine 1, Route de Ain el Bey, Constantine, Algérie.

<sup>3</sup> Département de biotechnologies, Institut de Nutrition Alimentation et Technologies Agro Alimentaires. Constantine1.

<sup>4</sup> Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Hadj Lakhdar. Route de Tazoult, Batna, Algérie.

<sup>5</sup> Université de Khemis Miliana, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie & des Sciences de la Terre. Route Theniet El Had, Soufay 44225 Ain Defla, Algérie.

### **Soumis à Canadian journal of microbiology**

Adresses E mail des auteurs:

Rim Tinhinen Maougal: [maougalr@gmail.com](mailto:maougalr@gmail.com)

Karim Baziz: [bazizkarim@gmail.com](mailto:bazizkarim@gmail.com)

Mohamed Lazali: [m.lazali@yahoo.fr](mailto:m.lazali@yahoo.fr)

Jean-Jacques Drevon: [drevonjj@supagro.inra.fr](mailto:drevonjj@supagro.inra.fr)

Abdelhamid Djekoun: [djakoun@umc.edu.dz](mailto:djakoun@umc.edu.dz)

Auteur correspondant.

MAOUGAL Rim Tinhinen, Route de Ain el Bey, Constantine, Algérie, 0021331  
[maougalr@gmail.com](mailto:maougalr@gmail.com)





## Résumé

Le phosphore (P) est un élément essentiel pour la croissance des plantes. La production agricole du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) est souvent limitée par la faible biodisponibilité du P dans le sol. Les phytates sont la forme dominante du phosphore organique dans le sol. Leur minéralisation par des phytases libère du phosphore inorganique disponible pour les plantes. La source principale des phytases est d'origine microbienne. Leurs activités augmentent considérablement dans la rhizosphère. Dans cette étude, nous avons caractérisé la communauté bactérienne minéralisant le phytate dans le sol rhizosphérique et dans le sol non rhizosphérique et cela dans un sol pauvre et un autre riche en P et chez deux RILs de *P. vulgaris* contrastantes vis-à-vis de la déficience en P. La structure de la communauté bactérienne a été suivie par culture sur une gélose non sélective. Toutes ces souches étaient capables de croître sur un milieu ne contenant que le phytate comme seule source de phosphore. Cette étude a révélé que les populations bactériennes phytasiques sont plus présentes dans le sol rhizosphérique du sol pauvre en P de la plante *P. vulgaris*.

Mots clefs :

Bactéries, rhizosphère, phytate, phytase, *Phaseolus vulgaris*.

### III.1.Introduction

Le phosphore (P) est un nutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes (Harrison *et al.*, 2002). Sa forme orthophosphate (Pi) est la seule source de P disponible pour les plantes et les microorganismes (Jossi, 2008). Bien que la teneur totale en P (Pt) du sol soit généralement élevée, la biodisponibilité de P est souvent limitée en raison de la lente diffusion et de la forte adsorption du Pi (Shen *et al.*, 2002 ; Yang et Finnegan, 2010). En conséquence, la déficience en P est souvent un facteur limitant la croissance et la productivité des plantes (Yang et Finnegan, 2010). C'est, en particulier, le cas des légumineuses chez lesquelles la nutrition azotée dépend largement de la symbiose rhizobienne. Le besoin important de P dans le fonctionnement des nodosités est démontré par leur teneur en P plus



élevée que dans les autres organes de la plante, en particulier dans des conditions de déficience en P. (Tang *et al.*, 2001).

L'application des engrais phosphatés peut compenser la faible disponibilité de P dans les systèmes culturaux. Mais l'apport excessif de P peut causer de graves complications environnementales comme l'eutrophisation. En outre, la source mondiale de roche P est non renouvelable. Les réserves mondiales en P facilement accessible, seraient épuisées dans 50 à 100 ans (Cordell *et al.*, 2009). Le phosphore organique (Po) est présent en grande quantité dans les sols, pouvant représenter 25 à 80 % du Pt (Antoni, 2009 ; Condrón et Tiessen, 2005). Les inositols phosphate représentent entre 10 et 50% du Po dont le plus abondant est l'inositol 6P, aussi dénommé phytate. Ils sont synthétisés essentiellement par les plantes dans les écosystèmes terrestres (Turner *et al.*, 2007 ; Lim *et al.*, 2007; Yadav et Verma, 2012). Ils sont fortement complexés dans les sols. L'hydrolyse du phytate des sols peut fournir du Pi disponibles pour les végétaux (Richardson *et al.*, 2001). Elle est catalysée par des enzymes appelées phytases. Tarafdar et Junk (1987) ont prouvé que l'activité des phytases augmente considérablement dans la rhizosphère où la biomasse et l'activité des micro-organismes sont augmentées en raison des composés exsudés par les racines (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Certains genres bactériens tels que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Burkholderia* sont déjà connus pour être des producteurs de phytases efficaces. Mais l'importance et la diversité des bactéries productrices de phytase dans la rhizosphère sont encore largement inconnus ((Hill et Richardson, 2007 ; Jossi, 2008). Comprendre la contribution de micro-organismes dans la nutrition P des plantes et les possibilités de leur utilisation pour améliorer la disponibilité du P dans le sol a donc un intérêt considérable, en particulier pour une agriculture plus durable (Sanchez, 2010).

L'objectif de notre étude a été de caractériser la communauté bactérienne minéralisatrice du phytate dans deux sols contrastants vis-à-vis de la déficience en P, et de comparer l'évolution de cette communauté bactérienne fonctionnelle pour deux RILs de haricot commun contrastant en utilisation de P pour la fixation symbiotique d'azote (FSN).



**Planche 2 : photos du dispositif cultural et de la récolte du haricot dans les placettes de la région de Sétif**

## III.2. Matériel et méthodes

### III.2.1. Matériel végétal et conditions de culture

Ce travail a consisté en tests multi-locaux dans des parcelles d'agriculteurs d'un agro-écosystème de référence sous un climat semi-aride dans la wilaya de Sétif (latitude, 36°11'N; longitude, 5°25'E; altitude, 1081 m), au nord-est de l'Algérie. Des tests ont été réalisés dans deux placettes de culture irriguée, appartenant à des agriculteurs (Figure 1), l'une dans la localité de l'Hamiat (placette 1) et l'autre dans la localité de Kasr el abtal (placette 6), durant la saison de culture de l'année 2011. Les deux lignées recombinantes (RIL) de haricot utilisées, i.e. RIL115 et RIL147, sont issues du croisement entre BAT477 et DOR364, respectivement efficace en utilisation du P pour la FSN et tolérant à la mosaïque dorée, (Drevon *et al.*, 2011).

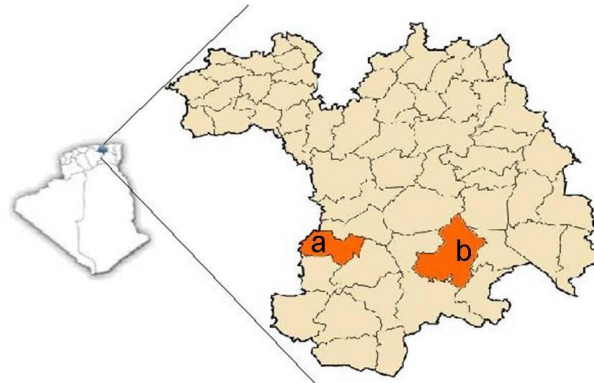


Figure III. 1 Carte géographique de la région de Sétif et position des placettes étudiées. La localité de Kasr el abtal (placette 6) (a) et la localité de l'Hamiat (placette 1) (b)

Les deux placettes utilisées ont été choisies selon leur teneur contrastant en P de 3,14 mg kg<sup>-1</sup> à Hamiat (placette 1) versus 26,6 à Kasr el abtal (placette 6). Dans chaque placette, le semis a été réalisé en avril en 3 rangs de 4 m de long espacés de 0,5 m par RIL. Les plantes ont été récoltées en juin.

### III.2.2. Dénombrement des bactéries totales et phytasiques

Le sol rhizosphérique (SR), à été prélevé de la surface des racines nodulées de chaque RIL. Les échantillons sont ensuite aliquotés et conservés à -20 °C, puis récupéré pour déterminer la teneur en phytase et P assimilable. Ces mesures ont été également effectuées dans le sol non rhizosphérique (SNR) proche des RILs en placettes.

**Chapitre 3 : La faible disponibilité en P stimule les des activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif**



Placette P suffisant



Placette P déficient

**RIL :** 115 147

115 147

**Plante :** sol rhizosphérique et non rhizosphérique

Séparation partie aérienne et racinaire

Extraction des bactéries par tampon PBS



Enumération bactérienne

- Totale
- Utilisatrice de phytate



Séchage



Mesure  $P_i$  libéré par les bactéries



Dosage et mesure :

- matière sèche
- dosage P assimilable
- analyse physico-chimique du sol

Le dénombrement des bactéries a été effectué sur boîte de Pétri. Pour chaque échantillon, SR et NSR en 3 répétitions, des suspensions dilutions ont été étalées sur milieu LB et sur milieu Angle (Angle *et al.*, 1991) (3 boîtes par dilution) et le nombre de CFU par gramme de sol de contrôle a été déterminé après 72 h d'incubation à 28 °C. Cette période d'incubation permet la stabilisation du nombre d'UFC. Tous les isolats ont été maintenus sur milieu Angle (à 4 °C) ou conservés dans une solution de glycérol 40% à -80° C.

### III.2.3. Analyses physico-chimiques des sols

Les sols étudiés montrent une variation dans les propriétés physiques et chimiques comme le montre le tableau 1. Le sol de la placette 6 montre des valeurs élevées en argile (41%). Les valeurs de pH varient entre 7,4 pour la placette 6 et 8,4 pour la placette 1. Le CaCO<sub>3</sub> contenu dans les sols présente des valeurs de 20,4% et 26,17% pour les placettes 6 et 1 respectivement. Les concentrations de N total dans les sols sont plus élevées dans la placette 6 (2,6 g kg<sup>-1</sup> sol) que dans la placette 1 (0,90 g kg<sup>-1</sup> sol). La matière organique est plus élevée dans la placette 6 (1,26%) que dans la placette 1 (1,14%). Les concentrations en P total dans la placette 6 sont plus élevées que dans la placette 1. Les concentrations en P Olsen dans les sols sont également plus élevées dans la placette 6 (26,6 mg kg<sup>-1</sup> sol) comparativement à la placette 1 (3.14 mg kg<sup>-1</sup> sol).

Tableau. III.1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol déficient en P (Placette 1) ou suffisant en P (Placette 6).

Caractéristiques	Placette 1	Placette 6
Argile (%)	41	38
Sable (%)	26	32
Limon (%)	33	30
pH	8.40	7.40
Matière organique (%)	1.14	1.26
CaCO <sub>3</sub> total (%)	26.17	20.4
P total (mg Kg <sup>-1</sup> )	104	451
P Olsen (mg Kg <sup>-1</sup> )	3.14	26.6
Azote (g Kg <sup>-1</sup> )	0.90	2.6





Les échantillons de sols ont été prélevés sur une profondeur de 0-30 cm. Ils ont été séchés et tamisés à 2mm. La détermination de la texture consiste à estimer le pourcentage des différentes fractions minérales constituant les agrégats contenus dans une prise d'essai de terre fine. Après digestion de la matière organique par l'eau oxygénée à 20% et défloculation des argiles par l'hexamétaphosphate de sodium à 50 g l<sup>-1</sup>, la fraction des sables a été déterminée par tamisage de la solution du sol à 50 µm. Les fractions argileuses et limoneuses ont été déterminées en utilisant la pipette de Robinson. Le pH de la solution du sol est mesuré par un pH mètre. La détermination du calcaire total a été réalisée par un calcimètre en utilisant une solution de l'acide chlorhydrique dilué de moitié et une prise d'essai de 1 g de sol (Drouineau, 1942). La matière organique a été déterminée par la méthode WALKLEY et BLACK. L'excès de bichromate de potassium est titré par une solution de sel de Mohr à 0.5N en présence de fluorure et de diphénylamine comme indicateur coloré. Le dosage de l'azote a été réalisé selon la méthode Kjeldahl.

#### **III.2.4. Dosage d'activité phytase**

Le substrat utilisé est l'hexaphosphate de sodium (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>Na<sub>12</sub>. sigma P 210) à une concentration finale de 10 mM. L'hydrolyse du phytate conduit à la libération d'orthophosphate et d'intermédiaires de phosphate d'inositol. La réaction enzymatique a été réalisée à 25 °C et est arrêtée après 90 min d'incubation en précipitant les protéines par addition d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. L'activité phytase a été mesurée par le dosage du Pi libéré à partir du phytate (Araújo *et al.*, 2008). Le blanc a été préparé en ajoutant le phytate au mélange réactionnel préalablement arrêté au TCA. Un aliquote de 0,25 ml de la solution réactionnelle est additionné de 1,25 ml du réactif MS et 1 ml d'eau distillée, puis porté à ébullition pendant 10 min. les échantillons ont été refroidis avant de procéder à la lecture au spectrophotomètre à 820 nm. Une gamme étalon a été préparée avec des concentrations en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de 0 à 20 mg l<sup>-1</sup>. L'activité phytase a été ensuite exprimée en mU par mg de protéines, 1 U correspondant à 1 µmole de P libéré par min.

Afin de confirmer la présence d'une activité phytase, les souches isolées sur milieu Angle et ayant formé un halo, sont mises en culture dans 200 ml d'un milieu



liquide spécifique contenant le phytate comme seule source de phosphore et contenant 1 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 4 mM CaSO<sub>4</sub>, MOPS 50 mM (3 - [N-morpholino] propane sulfonique Sigma réf M-1254) a pH 7, 55 mM de glucose, 50 mg / L de thiamine-HCl, 0,5 ml / L de Fe-citrate a 1% (P / V), et de 0,2 ml / L de solution oligoélément (contenant par litre: 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 98 mg CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 3,08 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0,29 g NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 4,41 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Morizet et Mingeau 1976). Le pH de la solution est ajusté à 7,0 avec HCl 6N. Pendant la période de la culture, 2 échantillons de 2 ml ont été régulièrement prélevés dans des conditions stériles pour mesurer la densité bactérienne à 630 nm et le Pi libéré dans le milieu. Ce dernier a été centrifugé à 10 000 g, pendant 2 min, et la concentration Pi libre a été mesurée dans le surnageant en utilisant la méthode au vert de malachite (Ohno et Zibilske 1991). Comme contrôle, nous avons utilisé une souche de *Bacillus subtilis* précédemment isolée des racines de *Pinus pinaster* (Irshad *et al.* 2012).

### III.2.5. dosage de P assimilable des sols

Le P Olsen est déterminé après dissolution du phosphore dans une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M) à pH 8,5 ± 0,1 additionné d'un volume adéquat de soude. La prise d'essai de 0,5 g de terre, tamisée à 2 mm, de chaque échantillon est introduite dans un tube de 20 ml, additionnée de 10 ml de la solution d'extraction (NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M) puis mise en agitation rotative pendant 30 min (Olsen *et al.*, 1954). Les tubes ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 15 min et les surnageants ont été transférés dans un second jeu de tubes de 10 ml. L'extrait (1,5 ml) a été additionné, en plusieurs fois, de 0,05 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré 34N, à l'aide de la micropipette de 50-200 µl, pour éliminer le gaz carbonique et laisser flocculer pendant 1 h la matière organique si nécessaire. L'extrait dégazé doit être parfaitement limpide, sinon une filtration est nécessaire avant de commencer le dosage du Pi. Pour ce dernier, 0,25ml d'extrait est additionné de 1,25 ml de réactif MS (molybdate de sodium (2.5%) et sulfate d'hydrazine (0.15%)) et de 1 ml d'eau distillée, puis porté au bain marie à ébullition pendant 10 min (Murphy et Riley 1962). Par la suite, les échantillons sont refroidis avant de procéder à la lecture au spectrophotomètre à 630 nm.



### **III.2.6. Récolte des plantes, paramètres mesurés et analyse statistique**

Les plantes ont été récoltées 45 jours après semis, coïncidant ainsi avec le stade floraison et apparition de gousses ne dépassant pas 2 cm de long. A ce stade la nodulation est optimale.

Les plantes ont été déracinées (à environ 20 cm de profondeur), le sol est prélevé sur et autour du système racinaire. Les parties aériennes et racinaires des plantes sont séparées. Les nodosités sont détachées des racines et comptées. Toutes ces parties sont ensuite séchées dans une étuve à 70 °C pendant 48 h. Les poids secs des différentes parties sont déterminés par pesée.

L'analyse statistique des données a été réalisée par le logiciel Statistica. Les valeurs de croissance et de nodulation sont les moyennes de 10 répétitions par RIL et de 3 répétitions par sol. Les valeurs des densités bactériennes sont les moyennes de 3 répétitions par sol.

## **III.3. Résultats**

### **III.3.1. Dénombrement bactérien et activités phytase des sols**

Le dénombrement des bactéries isolées de l'exo-rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* est présenté dans la figure 2 (a). Il indique que les valeurs moyennes de la densité de la communauté rhizosphérique cultivable sont significativement plus élevées dans le SR que dans le SNR. Le sol P déficient que représente la placette 1 présente une communauté bactérienne cultivable sur milieu LB plus importante que celle du sol P que représente la placette 6. En placette 6, sous RIL 115 le nombre de bactéries varie entre 6,93 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SNR et 7,03 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SR. Sous RIL 147 le nombre de bactéries varie entre 6,84 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SNR et 6,98 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SR.



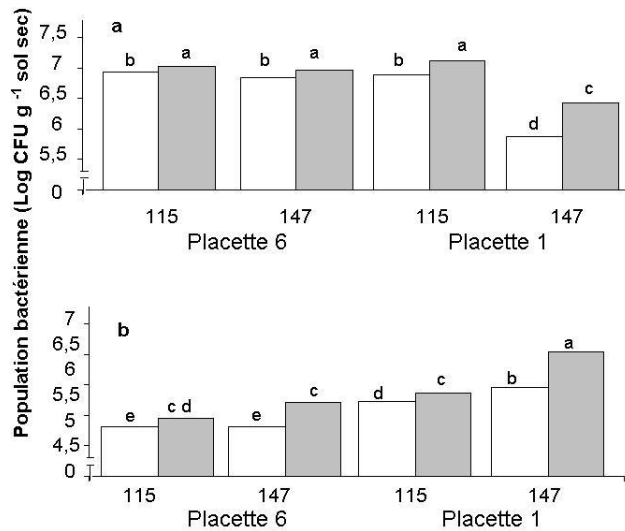


Figure.III 2 Densité des colonies bactériennes en UFC par g de sol sec au niveau du sol non rhizosphérique (□) et du sol rhizosphérique (■) pour les géotypes 115 et 147 de *Phaseolus vulgaris* sur milieu LB (a) et milieu Angle (b) en P suffisant (Placette 6) et P déficient (Placette 1). Les données sont les moyennes de trois répétitions récoltées au stade floraison des plantes.

Comparativement à la placette 1 où le nombre de bactéries sous couvert de la RIL 115 varie entre 6,89 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SNR et 7,11 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SR, et sous couvert de la RIL 147 le nombre varie entre 5,87 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SNR et 6,43 UFC g<sup>-1</sup> sol sec pour le SR (Fig. 1), il ressort de ces résultats qu'aucune différence significative de nombre de bactéries n'a pu être mise en évidence entre les deux RILs étudiées dans la placette 6, alors que dans la placette 1 une différence significative est mise en évidence entre les deux RILs étudiées.

Les dénombrements de bactéries à croissance positive sur milieu Angle sont présentés dans la figure 2 (b). La densité des bactéries décroît sur le milieu Angle, comparativement au milieu LB. Une différence significative est observée entre le SNR et le SR, indépendamment des RILs et des placettes, les bactéries sont plus présentes dans le sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique. La structure de la communauté bactérienne rhizosphérique fonctionnelle est plus importante dans la rhizosphère de la RIL 147 cultivée sous P déficient.

La Figure 3 représente les activités phytase des SRs. Les résultats montrent une variation significative entre la rhizosphère des RILs testés.





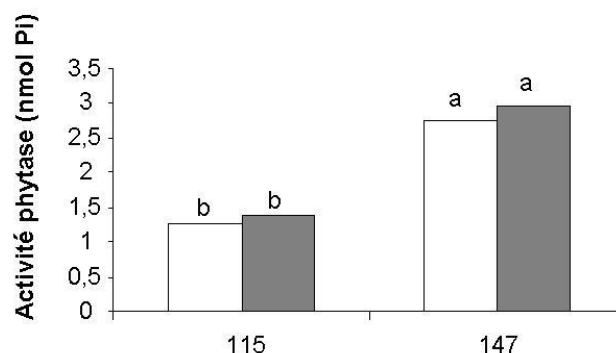


Figure III.3 Activités phytase des sols rhizosphériques de deux génotypes de haricot cultivés sous sol suffisant (□) en P ou sol déficient (■) en P. Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison des plantes.

Une plus grande activité phytase a été observée dans la rhizosphère de la RIL 147 par rapport à la RIL115 quelque soit le sol étudié. Par contre aucune différence significative n'est observée dans les RILs selon les placettes. Dans les placettes 1 et 6, cette activité est élevée dans le SR de 147, tandis que pour le SR de 115 cette activité est basse quel que soit le sol utilisé.

### III.3.2. Libération de Pi dans le milieu de culture

Afin de tester la capacité de la communauté bactérienne rhizosphérique à minéraliser le phytate, les isolats ont été cultivés sur le milieu liquide avec le phytate comme seule source de P, comme décrit en matériel et méthodes. La proportion des souches à croissance positive sur milieu Angle et positive à la libération de Pi sur milieu liquide a été calculée et présentée dans le tableau 2.



Tableau. III. 2: Fréquence des bactéries: nombre d'isolat positif (nbr bact +) et nombre total d'isolats testés (Total) et proportion d'isolat positif (%) pour la libération de Pi selon la RIL (115 versus 147) et la fraction du sol rhizosphérique (SR) versus sol non rhizosphérique (SNR)

RIL	fraction	nbr bact +	Total	% poss
115	SNR	14	30	46,7
	SR	25	34	73,5
Total		39	64	60,9
147	SNR	27	34	79,4
	SR	33	39	84,6
Total		60	73	82,2
TOTAL		99	137	72,3

Ces résultats montrent que Indépendamment du type de sol la proportion d'isolat positif pour la libération de Pi est plus grande sous couvert de la RIL 147 que sous couvert de la RIL115 ; En étudiant l'effet de du type de sol : sous couvert de la RIL 115 la proportion d'isolat positif la plus élevée est observée pour le SR comparativement au SNR, sous couvert de la RIL 147 la proportion la plus élevée est pour la libération de Pi est également observée dans le SR.

L'accumulation Pi pendant la phase de croissance exponentielle a été calculée pour chaque isolat et représentée dans la figure.4 et la figure 4 bis.



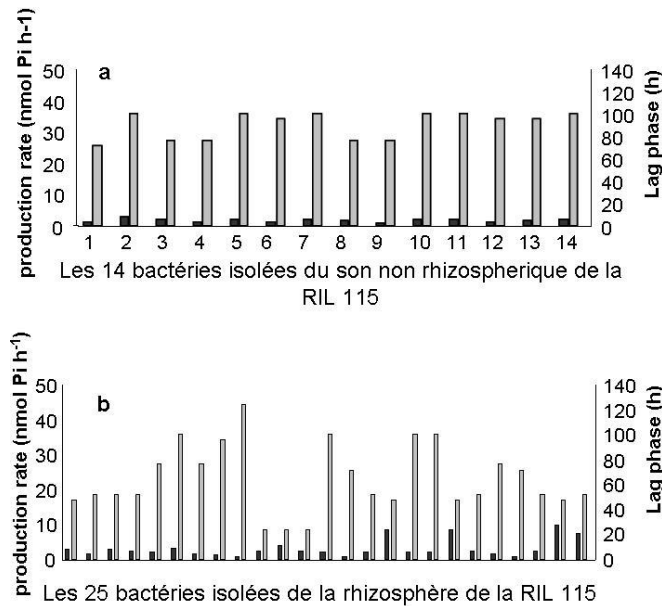


Figure III.4. Taux de Pi produit (■) durant le temps de croissance (□) des bactéries isolées du sol non rhizosphérique (a) et de la rhizosphère (b) du génotype 115 de *phaseolus vulgaris*. Les données sont les moyennes de trois répétitions.

Les bactéries extraites de la rhizosphère de la RIL 115 montrent une faible libération de Pi (moins de 3 nmol Pi h<sup>-1</sup>) qui a été concomitante avec une croissance élevée (plus de 72h). Cette faible accumulation de Pi se retrouve également dans les isolats extraits de la rhizosphère de 147 sous P suffisant pour lequel la production d'isolats de Pi n'a pas excédé 4 nmol Pi h<sup>-1</sup>, tandis que sous P déficient des isolats ont produits jusqu'à 39.2 nmol Pi h<sup>-1</sup> en un temps plus court (moins de 33h). Globalement, la production de Pi était plus élevée pour les isolats du sol déficient que du sol suffisant et la RIL 147 avait la production de Pi la plus élevée.



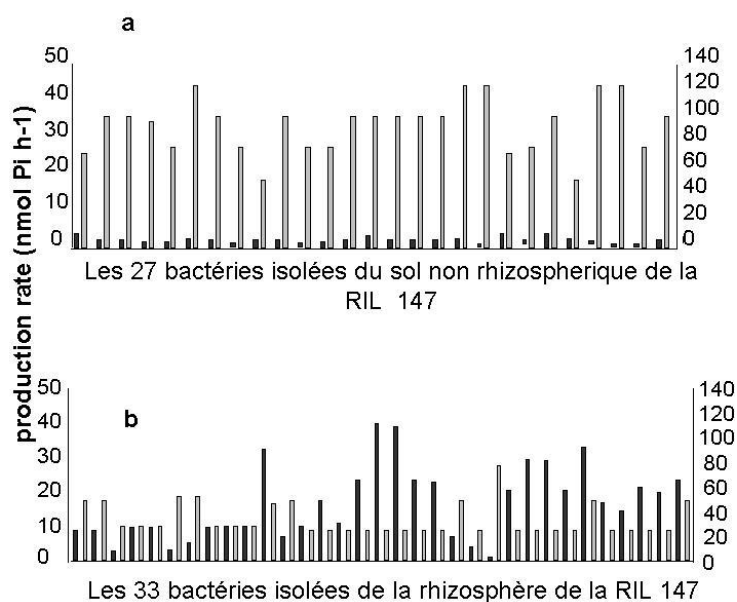


Figure III.4. bis. Taux de Pi produit (■) durant le temps de croissance (□) des bactéries isolées du sol non rhizosphérique (a) et de la rhizosphère (b) du génotype 147 de *phaseolus vulgaris*. Les données sont les moyennes de trois répétitions.

### III.3.3. Croissance des plantes et nodulation

Les biomasses aériennes, racinaires et nodulaires sont présentées dans la figure 5.

En sol déficient en P, des réductions importantes ont été notées pour les biomasses aériennes et nodulaires des deux RILs testés comparé aux biomasses du sol suffisant en P. Sous conditions de déficience en P, la croissance aérienne a significativement baissé pour les deux RILs, 115 et 147. Ce paramètre a varié de 30,3 g (biomasse la plus élevée) à 13,8 g par plante (biomasse la plus faible) respectivement, chez la lignée tolérante 115 et la lignée sensible 147 cultivées sous sols suffisant et pauvre en P. Ces dernières ont montré, sous conditions pauvres en P, une réduction importante en biomasse aérienne atteignant 65% et 63% respectivement, pour RIL115 et RIL147.





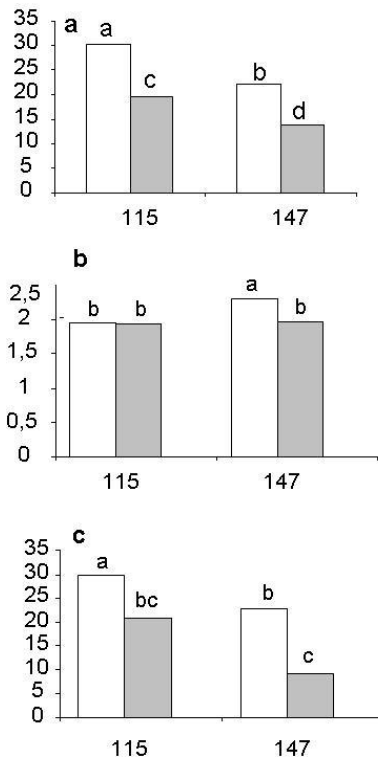


Figure III.5 Biomasse de la partie aérienne (a), racinaire (b) et nodulaire (c) des génotypes 115 et 147 de haricot cultivés sous sol suffisant (□) ou déficient (■) en P. Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison des plantes.

Les biomasses racinaires les plus élevées sont, contrairement aux biomasses aériennes, rencontrées chez la RIL 147 dans la placette 6 en condition de sol suffisant en P. Une faible biomasse est observée pour la RIL 147 cultivée dans la placette 1 sous conditions de déficience en P. Par contre pour la RIL tolérante 115, aucune différence n'est observée, selon qu'elle soit cultivée dans la placette 1 ou dans la placette 6.

Les résultats concernant la biomasse nodulaire varient largement en fonction de la RIL et du sol cultivé (Figure 5c). Quelque que soit le sol où les plantes ont été cultivées, les deux RILs, 147 et 115, ont présenté des diminutions significatives de la biomasse nodulaire de 31% et 60% respectivement. En général, les variations observées pour ce paramètre sont comparables à celles notées pour la biomasse aérienne des plantes particulièrement pour L115 (sous conditions suffisantes en P) et L147 (sous conditions pauvres en P).



### III.4. Discussion

La présente étude a eu pour but de rechercher des bactéries minéralisant le phytate dans deux sols contrastants en P d'un agro-écosystème méditerranéen et de comparer cette communauté bactérienne chez deux RILs contrastante en utilisation de P de *P vulgaris*. L'étude des isolats du sol afin d'évaluer la densité des bactéries fonctionnelles cultivables sur milieu solide selon la méthode de Angle *et al* utilisée par plusieurs auteurs (Angle *et al.* 1991; Jossi 2008) indiquent que ces bactéries, plus présentes dans la rhizosphère que dans le sol non rhizosphérique (Fig. 2), sont favorisées à proximité des racines et que seule une faible proportion (42 %) de ces bactéries sont capables de minéraliser le phytate. Cette observation conforte les résultats obtenus par Richardson et Hadobas (1997) qui ont trouvé que moins de 0,5 % de bactéries cultivables du sol sont capables d'utiliser le Phytate comme source de P et les résultats obtenus par Jossi (2008) qui a trouvé que 1,6% de bactéries dans la rhizosphère de *Lolium* sont capables de minéraliser le phytate. L'influence des RILs sur la communauté bactérienne fonctionnelle rhizosphérique et dans une moindre mesure sur la communauté totale (Fig.2), serait due au fait que l'activité métabolique de la plupart des populations dans la rhizosphère est fondée sur la consommation des exsudats racinaires. La communauté bactérienne fonctionnelle peut, ainsi, être plus affectée par les changements dans l'exsudation racinaire que la communauté totale, quelle que soit la source de la modification (le génotype de la plante, le stade de développement ou le changement climatique). Par ailleurs, d'autres études sur divers systèmes, y compris les prairies pérennes (Jossi *et al.*, 2006), ont rapporté des écarts similaires: Ce qui expliquerait que l'activité phytase soit plus importante chez la RIL 147 comparativement à la RIL 115 (Fig 3).

Parmi les bactéries isolées, 137 isolats rhizosphériques présentent un halo, dont seulement 99 (Tableau 2) ont été capables de croître dans un milieu liquide avec le phytate comme seule source de P (Fig.4 et 4 bis). En plus de leur croissance, tous les isolats ont été capables de libérer des quantités significatives de Pi libre dans le milieu (Fig. 4 et 4 bis). Ce qui confirme que la culture en milieu liquide, avec mesure de libération du Pi libre, semble être la meilleure méthode pour confirmer la minéralisation du phytate par les bactéries. Les figures 4 et 4 bis qui présentent la libération de Pi par les isolats montrent qu'il ya des différences significatives dans la capacité des isolats bactériens à libérer du Pi dans le milieu et dans la durée de la



phase de latence, entre les rhizosphères des deux sols, ce qui suggèrent que la communauté bactérienne fonctionnelle a été mobilisée sous faible disponibilité de P. Les haricots nodulés auraient adapté leur communauté microbienne en fonction de la disponibilité du P, en sélectionnant les bactéries ayant une plus grande capacité à minéraliser les phytates en condition de P déficient par rapport aux conditions de P suffisant. Cet accroissement de la communauté bactérienne spécifique en fonction de la disponibilité du P est également observé par la mesure de l'activité phytase dans la rhizosphère des plantes (Fig.3).

Nos résultats ont montré que la biomasse aériennes des plantes et la nodulation sont différentes entre les deux sols (Fig. 5) ; la nodulation des plantes de haricot était fortement affaiblies dans le sol déficient en P, la masse des nodosités étant 0,7 fois plus faible que dans le sol suffisant en P. dans des conditions de P déficient l'optimum de l'interaction entre la plante hôte et le rhizobia peut dépendre de l'utilisation du P disponible (Al-Niemi *et al.*, 1997), les mécanismes physiologiques mis en œuvre pour une meilleure utilisation du P peuvent varier selon la source de cet élément, la plante et les caractéristiques du sol, particulièrement l'acidification de la rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2003). Les exsudats des racines nodulées, tels que les phytases, contribuent activement dans l'équilibre physico-chimique de la rhizosphère au niveau de laquelle le P se trouve en fractions échangeables entre P organique et P minéral directement accessible aux racines des plantes (Manske *et al.*, 2001). En outre, les composés organiques sécrétés par les racines des plantes, stimuleraient l'activité microbienne de la rhizosphère, qui, à son tour, influencerait amplement la disponibilité du P dans le sol (Bowen et Rovira, 1999).

En conclusion, les résultats de cette étude indiquent que l'adaptation à une faible disponibilité en P était en partie attribuable à une forte mobilisation de la communauté bactérienne minéralisatrice de phytate dans la rhizosphère des plantes et particulièrement chez les RILs 147. A ce stade d'étude, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que l'influence des RILs de *P vulgaris* a un impact sur la richesse de la rhizosphère en population bactérienne. Néanmoins nos résultats montrent, que les RILs de *P. vulgaris* ont exercé une influence sur la communauté bactérienne rhizosphérique totale et affectent principalement l'activité et l'abondance des populations fonctionnelles.



## Remerciements

Ce présent travail a été financé en partie par le grand projet fédératif FABATROPIMED, financé par la fondation Agropolis sous la référence ID 1001-009 et en partie par le fond national de recherche (FNR). Les auteurs tiennent à remercier I Amine Khodja, M.N Belbekri et R Bouldje pour leur contribution technique.

## VI.5.Références

- Al-Niemi, T.S., Kahn, M.L., McDermott, T.R. 1997. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol.* 113: 1233–1242.
- Angle, J.S., McGrath, S.P., Chaney, R.L. 1991. New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol.* 57: 3674–3676.
- Antoni, V. 2009. Le phosphore dans les sols nécessité agronomique, préoccupation environnementale. Commissariat générale au développement durable N°14.
- Araújo, A.P., Plassard, C., et Drevon, JJ. 2008. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant Soil.* 312: 129-138.
- Bowen, GD., and Rovira, AD. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron.* 66: 1-102.
- Condon, L.M., and Tiessen, H. 2005. Interactions of organic phosphorus in terrestrial environments. dans Turner, B.L., Frossard, E. et Baldwin, D.S. Eds, *Organic Phosphorus in the Environment.* CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, p. 295-307.
- Cordell, D., Drangert, J.O., White, S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change.* 19: 292 -305.
- Drevon, J.J., Alkama, N., Araujo, A.P., *et al.* 2011. Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Proc Environ Sci.* 9 : 40 -46.
- Drouineau, G. 1942. Dosage rapide du calcaire actif des sols. Nouvelles données sur la répartition et la nature des fractions calcaires. *Ann Agron,* 441-450





- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*. 14: 2413–2429
- Hill, J.E., and Richardson, A.E. 2007. Isolation and assessment of microorganisms that utilise phytate. CAB international 2007. Inositol phosphates: linking agriculture and the environment (eds B.L. Turner, A.E. Richardson and E.J. Mullaney).
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*. 237: 173-195.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. 2003. Origins of roots mediated pH changes in the rhizosphere and their response to the environmental constraints. A review *Plant soil*. 248: 43-59.
- Irshad, U., Brauman, A., Villenave, C., Plassard, C. 2012. Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant Soil*. 358: 155–168.
- Jossi, M., Fromin, N., Tarnawski, S., Kohler, F., Gillet, F., Aragno, M., Hamelin, J. 2006. How elevated pCO<sub>2</sub> modifies total and metabolically active bacterial communities in the rhizosphere of two perennial grasses grown under field conditions *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*. 55 (3): 339-350.
- Jossi, M. 2008. Rhizosphere bacterial communities associated with *Lolium perenne* structuration and plant-mediated influences. Thèse de doctorat de la faculté de Neuchâtel, Suisse.
- Lim, B.L., Yeung, P., Cheng, C., Hill, J.E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J*. 1: 321–330.
- Manske, G.G.B., Ortiz-Monasterio, J.I., van Ginkel, M., Gonzalez, R.M., Fischer, R.A., Rajaram, S., Vlek, P.L.G. 2001. Importance of P uptake efficiency versus P utilization for wheat yield in acid and calcareous soils in Mexico. *European J Agron*. 14: 261-274.
- Murphy, J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
- Ohno, T., Zibilske, L.M. 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Sci Soc Am J*. 55:892–895.



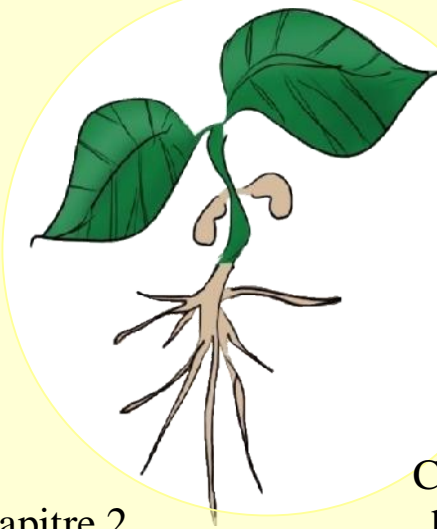
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. Circular n° 939, USDA, Washington, pp. 19.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321:341-361.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J*. 25: 641–649.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol*. 43:509–516.
- Sánchez, P.A. 2010. Tripling crop yields in tropical Africa. *Nat Geosci*. 3:299–300.
- Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S., Wang, X. 2002. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminium and iron-bound phosphates. *Environ. Exp. Bot*. 48: 1-9.
- Tang, C., Hinsinger, P., Jaillard, B., Rengel, Z., Drevon, J.J. 2001. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie*. 21: 683-689.
- Tarafdar, J.C., Jungk, A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol Fer Soils*. 3: 199-204.
- Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J. (eds). 2007. Inositol phosphates: linking agriculture and environment. CAB International, Wallingford
- Yadav, B.K., and Verma, A. 2012. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems, *The Functioning of Ecosystems*, Prof. Mahamane Ali (Ed.), ISBN: 978-953-51-0573-2, InTech.
- Yang, X.J., Finnegan, P.M. 2010. Regulation of phosphate-starvation responses in higher plants. *Ann Bot*. 105: 513-526.



## Chapitre 4

### Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with

Chapitre 3 La faible disponibilité en P stimule les activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif



Conclusion générale et perspectives

Introduction générale

Chapitre 2  
Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency

Chapitre 1 : revue bibliographique



---

## Chapitre 4

### Localization of the *Bacillus subtilis* beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.

---

Dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la composante bactérienne de la communauté fonctionnelle présente dans la rhizosphère du haricot. Cette première investigation, portant sur la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisatrice du phytate, a mis en évidence une corrélation positive entre l'activité phytase et la taille de la communauté cultivable, par ailleurs il ressort que certains microorganismes semblent spécifiques à la rhizosphère du haricot, nos résultats suggèrent que la plante, probablement par l'intermédiaire des exsudats racinaires, induit une stimulation de l'activité phytase et des modifications de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable, notamment pour l'augmentation de sa densité.

Dans cette optique nous nous sommes intéressés à l'hypothèse que l'inoculation d'une bactérie de la rhizosphère des légumineuses serait capable de minéraliser le phytate grâce à la libération de phytase BPP, permettrait d'améliorer la disponibilité du phosphore à la légumineuse.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants :

- a) Déterminer, en système de culture hydroaéroponique, l'effet de l'inoculation de *B subtilis* sur la nutrition phosphatée pour la croissance du haricot (*Phaseolus vulgaris*) cultivé avec du phytate comme seule source de P.
- b) Vérifier la colonisation des racines du haricot par *B subtilis*
- c) Evaluer si la colonisation a été associée à l'expression de la BPP dans la racine du haricot nodulé.

Dans la littérature, différentes souches de bactéries ont été caractérisées pour leur capacité à hydrolyser le phytate via l'activité phytase (De Freitas *et al.*, 1997,





Jorquera *et al.*,2010, Kumar *et al.*,2013) pour notre étude nous avons choisi d'inoculer notre plante avec la bactérie *Bacillus subtilis* qui est connue pour être le principal genre de bactéries minéralisant le phytate.

Pour déterminer l'effet de la bactérie sur la croissance du haricot, nous avons cultivé ces plantes soit avec du P minéral soit avec du phytate comme seule source de P. Nous avons effectué des mesures biologiques et chimiques afin de déterminer si l'inoculation de *B. subtilis* permettrait d'améliorer la nutrition de P pour la croissance N<sub>2</sub>-dépendante du haricot cultivé sous phytate.

Nous nous sommes concentrés sur l'expression du gène BPP de *B. subtilis* en utilisant RT-PCR *in situ* pour vérifier si la colonisation du haricot commun par *B. subtilis* a été associée à l'expression de la BPP dans les racines de la légumineuse nodulée.

Les résultats obtenus dans ce travail ont été **publié dans le journal « Planta »** (Maougal *et al* 2014).

## Référence

- J. R. De Freitas, M. R. Banerjee, J.J. Germida, Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fert. Soils*. 24 (1997):358-364.
- M. A. Jorquera, M. L. Mora, *Bacillus*-like phosphobacteria in agronomic volcanic soils from Chile. 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. 1 – 6 August (2010) Brisbane, Australia.
- V. Kumar, P. Singh, M. A. Jorquera, P. Sangwan, P. Kumar, A. K. Verma, S. Agrawal, Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J Microbiol Biotechnol*. 29(2013)1361–1369.



**Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.**

Rim Tinhinen Maougal<sup>1, 2</sup>, Adnane Bargaz<sup>3</sup>, Charaf Sahel<sup>1</sup>, Laurie Amenc<sup>1</sup>, Abdelhamid Djakoun<sup>2</sup>, Claude Plassard<sup>1</sup> and Jean-Jacques Drevon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroécosystèmes, 1 Place Pierre Viala, F34060, Montpellier, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biologie et d'Ecologie, Université Constantine 1, Route de Ain el Bey, Constantine, Algeria.

<sup>3</sup>Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Biosystems and Technology, PO Box 103, SE 23053 – Alnarp, Sweden.

**Published in planta**

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: drevonjj@supagro.inra.fr

Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1222 Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, 1 place Pierre Viala, F34060 Montpellier Cedex, France. Phone: +33 (0) 4 99 61 23 32 / FAX: +33 (0) 4 99 61 21 19

E mail addresses of all authors:

Rim Tinhinen Maougal: maougalr@gmail.com

Adnane Bargaz: adnane.bargaz@slu.se

Achraf Sahel: achrafstud@hotmail.com

Laurie Amenc: amenc@supagro.inra.fr

Abdelhamid Djakoun: djakoun@umc.edu.dz

Claude Plassard: plassard@supagro.inra.fr

Jean-Jacques Drevon : drevonjj@supagro.inra.fr



## Abstract

Soil organic phosphorus (Po) such as phytate, which comprises up to 80% of total Po, must be hydrolyzed by specific enzymes called phytases to be used by plants. In contrast to plants, bacteria, such as *Bacillus subtilis*, have the ability to use phytate as the sole source of P due to the excretion of a beta-propeller phytase (BPP). In order to assess whether the *B. subtilis* BPP could make P available from phytate for the benefit of a nodulated legume, the P sensitive recombinant inbred line RIL147 of *Phaseolus vulgaris* was grown under hydroaerobic conditions with either 12.5  $\mu\text{M}$  phytate ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ ) or 75  $\mu\text{mol Pi}$  ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), and inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 alone, or co-inoculated with both *B. subtilis* DSM 10 and CIAT899. The *in situ* RT-PCR of BPP genes displayed the most intense fluorescent BPP signal on root-tips. Some BPP signal was found inside the root cortex and the endorhizosphere of the root tip, suggesting endophytic bacteria expressing BPP. However, the co-inoculation with *B. subtilis* was associated with a decrease in plant P content, nodulation and the subsequent plant growth. Such a competitive effect of *B. subtilis* on P acquisition from phytate in symbiotic nitrogen fixation might be circumvented if the rate of inoculation were reasoned in order to avoid the inhibition of nodulation by excess *B. subtilis* proliferation. It is concluded that *B. subtilis* BPP gene is expressed in *P. vulgaris* rhizosphere.

Key words: P nutrition, inoculation, rhizobia, symbiosis, nodulation, hydroaerobic conditions, *in situ* RT-PCR.

Abbreviations: BPP, Beta propeller phytase; CFU, colony forming units; CIAT, International center of tropical agriculture; DAT, days after transplantation; DW, dry weight; PUE, phosphorus use efficiency; RIL, recombinant inbred line; SNF, Symbiotic nitrogen fixation

## VI.1.Introduction

Intensive agriculture since the green revolution has currently relied on a non-renewable resource because phosphate-rock mines are being depleted. As time passes, they are likely to yield lower P quality at higher price (Cordell *et al.* 2009). Total P (Pt) in soil is abundant, but is scarcely available (Liu *et al.* 1994). Limited P-



availability is therefore one of the most significant abiotic constraints of plant growth (Wang *et al.* 1998).

The production of acid phosphatases (APases) is a potential way for plants to enhance P availability by hydrolysing organic P compounds (Tarafdar and Claassen 2005; Kouas *et al.* 2009; Shen *et al.* 2011). Among the latter, phytate (myo-inositol hexakisphosphate) may account up to 80% of the soil Po (Turner *et al.* 2002) which after mineralization by phytases, may represent a potential source of P for plant growth (Richardson *et al.* 2004). Indeed, from the exploration of public databases, Jorquera *et al.* (2008) reported that various genera of bacteria, excepted rhizobiaceae, exhibited phytase-like proteins. These microbial phytases are predicted to belong to several classes that are cysteine-, histidine-acid-, purple-acid- and beta-propeller- phytases (BPP) (Mullaney and Ullah 2003). Among all these phytase-like proteins, the BPP enzyme from *Bacillus subtilis* has been shown to be released into the external medium and has been well characterized (Lim *et al.* 2007).

Common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important grain legume for human nutrition, representing 50% of the worldwide direct consumption of grain legumes (Broughton *et al.* 2003; Graham and Vance 2003). Through its symbiotic association with N<sub>2</sub>-fixing Rhizobia, the common-bean benefits from an unlimited source of atmospheric nitrogen for its N<sub>2</sub>-dependent growth (Hartwig and Nosberger 1994). This symbiotic N<sub>2</sub> fixation (SNF), as well as the ammonium assimilation into amino acids and ureides occurring respectively in the bacteroids and in the plant-cell fraction of nodules infected zone, depend on the ATP synthesis in the nodules (Sa and Israel 1991). Thus, P deficiency has been shown to reduce the nodule nitrogenase activity in common bean, soybean, lupin and alfalfa (Kouas *et al.* 2005; Qiao *et al.* 2007). P deficiency has also been reported to decrease nodule mass more than host growth in soybean and common bean (Drevon and Hartwig 1997; Kouas *et al.* 2005). Therefore, soil P deficiency may result in a dramatic decrease of SNF in common-bean and its subsequent grain production.

Under P deficiency, legumes secrete more phytase than cereals (Yadav and Tarafdar 2004). However, phytate supplied as the only source of P remained much less used than soluble P by leguminous plants grown in sterile conditions (Richardson *et al.* 2001). In contrast, inoculation of culture medium by bacteria able to release Pi from phytate in pure culture significantly enhanced plant P accumulation





**Planche 3 : photos du dispositif expérimental sous serre  
Culture hydro-aéroponique du haricot**

(Richardson *et al.* 2001). Thus, our hypothesis is that the inoculation of a legume rhizosphere with *B. subtilis*, a bacteria able to mineralize phytate thanks to the release of BPP, would enhance P availability to the legume. To assess this hypothesis we grew nodulated common bean in hydroaerobic conditions, either with mineral P or phytate, whether or not inoculated with *B. subtilis*. We focused on the expression of the BPP gene of *B. subtilis* using in situ RT-PCR to verify whether colonization of common bean by *B. subtilis* was associated with the expression of BPP in legumes nodulated-root. We performed biological and chemical measurements to assess whether *B. subtilis* inoculation would improve the P nutrition for N<sub>2</sub>-dependent growth of common-bean under phytate supply.

## **VI.2. Materials and methods**

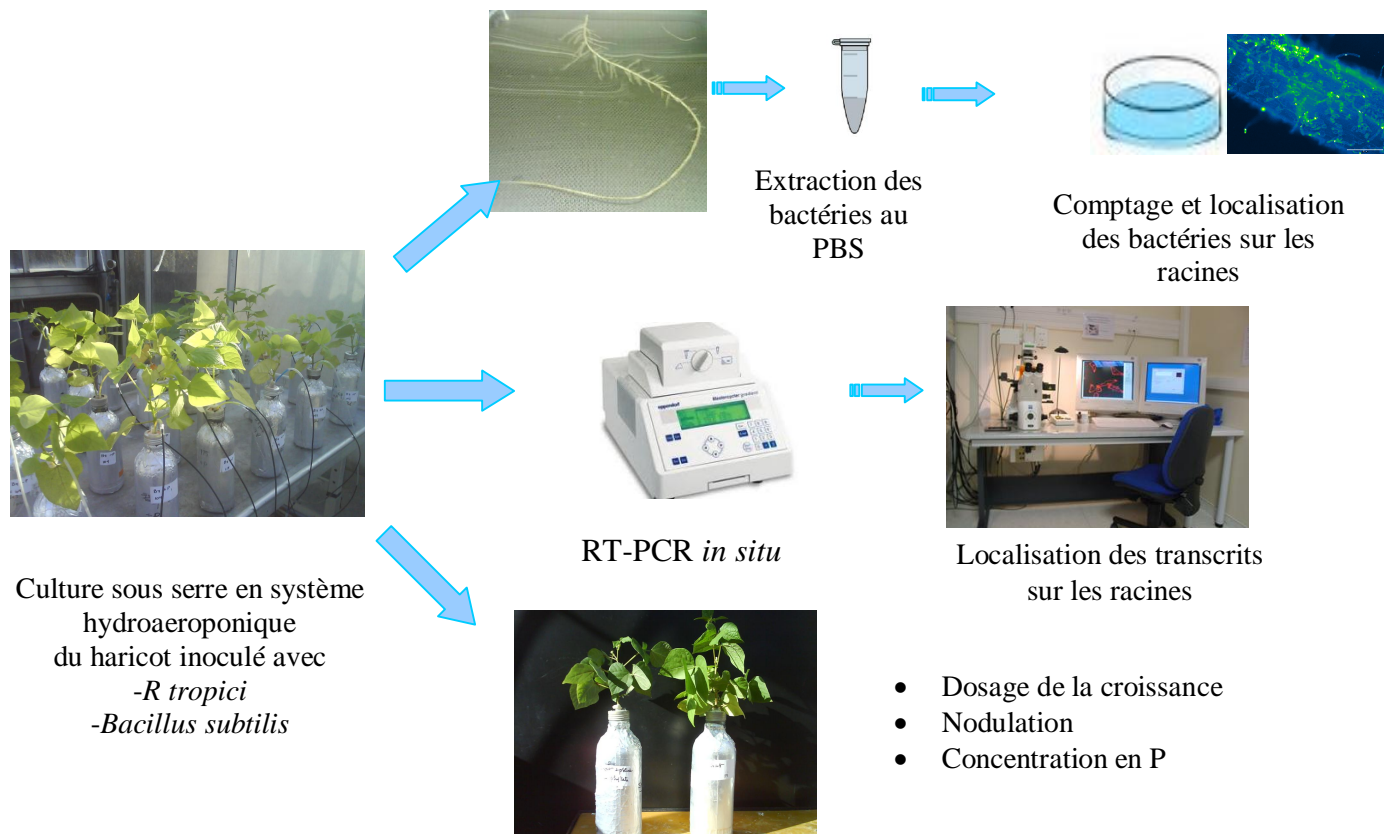
### **VI.2.1. Plant material and growth conditions**

The experiment was carried out on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using the P-deficiency sensitive recombinant inbred line (RIL) 147 resulting from the cross of parental lines BAT477 and DOR364 (Drevon *et al.* 2011). Plants were grown in a temperature-controlled glasshouse with day / night temperatures of 28 / 20 °C and 16 h photoperiod with an additional illumination of 400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and 70% relative humidity during the day. Seeds were surface sterilized with 3% calcium hypochlorite and rinsed thoroughly in five successive baths of sterile distilled water. Thereafter, seeds were germinated for 4 days at 28 °C in the dark in rolls of germination paper soaked with sterile distilled water.

Each inoculated-seedling was transferred to a 1 L serum bottle wrapped with aluminium foil to maintain darkness in the rooting environment, and refilled weekly with the nutrient solution of Vadez *et al.* (1996). In order to avoid N deficiency and ensure optimal nodulation, urea was supplied at 2 mmol per plant during the initial 15 days of growth (Hernandez and Drevon 1991). Thereafter the plants were grown in N-free solution. The nutrient solution was permanently aerated by an air-flow of 400 ml plant<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> provided by plastic tubes into the bottles. P was supplied either as 75 μmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> plant<sup>-1</sup> week<sup>-1</sup> (i.e. inorganic P or Pi) or 12.5 μmol phytate (C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>) plant<sup>-1</sup> week<sup>-1</sup> (Po) both providing potentially an equivalent amount of Pi.

The inoculation of the RIL147 was performed by two bacterial strains, the reference strain *R. tropici* CIAT899 (Cali Colombia), and *B. subtilis* DSM 10 (Leibniz

**Chapite 4: Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.**



Institute, DSMZ German Collection of Microorganisms and cell Cultures), The inoculants were prepared by growing the bacterial strains in yeast extract manitol broth for *R. tropici* and in Luria Bertani (LB) broth for *B. subtilis* during 4 days at 25 °C under 120 rpm. For inoculation, 4 days old seedlings were soaked for 30 min in liquid inoculants of an approximate cell density of  $10^9$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ . During the experiment, the inoculation of nodulated roots with *B. subtilis* DSM 10 was repeated at every change of the nutrient solution by adding 1 ml of inoculant. Plants were harvested 42 days after transfer (DAT).

### **VI.2.2. Root preparation for enumeration of bacteria and gene localization**

Intact roots of approximately the same size were carefully collected in a sterile plastic Petri dish and immediately cut into 2 cm fragments before incubation in a solution of GelGreen™ fluorochrome (Biotium, SF, USA) that was previously diluted 104 times in sterile distilled water following the manufacturer's instructions. Thereafter, the 2 cm root fragments were mounted between slide and cover slide and observed by epifluorescence microscopy.

The root-associated bacteria were isolated by placing root-fragments in 40 ml of sterile phosphate saline buffer (PBS) containing ( $\text{g l}^{-1}$ ): 1.2  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.18  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8.5 NaCl at pH 7.6 (Poonguzhali and Madhaiyan 2006).

After shaking at 120 rpm for 20 min, the bacterial suspension solution was serially diluted in PBS. Aliquots of  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  dilutions were plated on LB agar medium and incubated at 28 °C for 24 h. After incubation, the colony forming units (CFU) were counted.

### **VI.2.3. In situ RT-PCR of Beta Propeller phytase transcripts**

The method involves in situ amplification of gene transcripts using a first step of mRNA reverse transcription (RT) and a second step of amplification (PCR) of the produced specific nucleic acid sequences on root sections, followed by fluorescence detection of the localized PCR product using epifluorescence microscopy (Van Aarle *et al.* 2007). All solutions and glassware were rendered RNase free by diethyl pyrocarbonate (DEPC) treatment, prior to root sample preparation and fixation for the in situ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as described in Molina *et al.* (2011) and Bargaz *et al.* (2012). Plant roots were carefully detached at



42 days after transplantation (DAT) that corresponded to the flowering stage, and immediately washed with DEPC-treated water, and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde, 45% (v/v) ethanol and 5% (v/v) acetic acid, kept for 2 h under vacuum, and stored overnight at 4 °C. After rinsing with four baths of DEPC-water, fixed roots were included in 9% (w/v) low-melting-point agarose and cut a microtome (Micro-cut H1200 Vibrating Microtome; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) into transversal 50 µm thick sections. The latter were collected into small tubes containing 0.5 ml of DEPC-treated water, and freed from residual agarose by three washes with DEPC-treated water heated at 60 °C.

The first cDNA strand was synthesized from total RNA of either the intact root section or the 50 µm transversal sections of root, using Moloney marine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's recommendations. These samples were incubated in 40 µl reverse transcriptase mix containing the BPP gene-specific reverse primer BPPrev (5'-CAGGSCGCANRTCACRTRTT-3') (Huang *et al.* 2009). Negative controls were prepared by omitting the reverse transcriptase. For cDNA amplification 40 µl of PCR mix with BPPrev primers was added with 0.25 µM of the gene-specific BPPdir (5'-GACGCAGCCGAYGAYCCNGCNITNTGG-3') (Huang *et al.* 2009). Thermo-cycling was performed using 30 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, with extension at 72 °C for 2 min.

For detection of the amplified cDNA in the fixed tissue, the PCR mix was removed, and samples were washed in 100 µl of blocking solution under gentle agitation in the dark at 37 °C. The blocking solution was replaced by 100 µl of alkaline phosphatase conjugated anti-dioxygenin Fab fragment (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) diluted 1:1000 in 2% BSA. The samples were incubated at room temperature for 90 min and then washed three times to remove excess antibody. Detection of alkaline phosphatase was carried out using an ELF-97® endogenous phosphatase detection kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Observations were made with an Olympus BX61® microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with an epifluorescence condenser, a Hoechst/DAPI filter set configured with an excitation filter of 360-370 nm, a dichroic mirror of 400 nm and an emission of 420 nm.



#### **VI.2.4.Measurement of plant growth, nodulation, P concentration and statistical analysis**

Plants were divided into shoots, roots and nodules. The latter were counted. Thereafter, shoots, roots and nodules were dried at 70 °C for 3 days and dry weights (DW) were determined.

Dry samples were ground to a fine powder in a vibrating mill to determine the total P concentration in shoots, and 50 mg subsamples were digested in concentrated HNO<sub>3</sub> at 180 °C for 15 min in a microwave oven (ETHOS, Milestone). Total P was determined using the vanadomolybdate colorimetric method (AFNOR 1969) and the optical density was read by a spectrophotometer (Varian Cary IE) at 460 nm. Phosphorus use efficiency (PUE) was calculated as the ratio of dry biomass / P concentration of plants (Vadez *et al.* 2001).

Statistical analysis of data was performed in R software. Unless stated, data are means of 9 replicates. Subsequent comparison of means was performed by a Wilcoxon test. Data followed by the same letter were designated as not significantly different at the level of 5% probability.

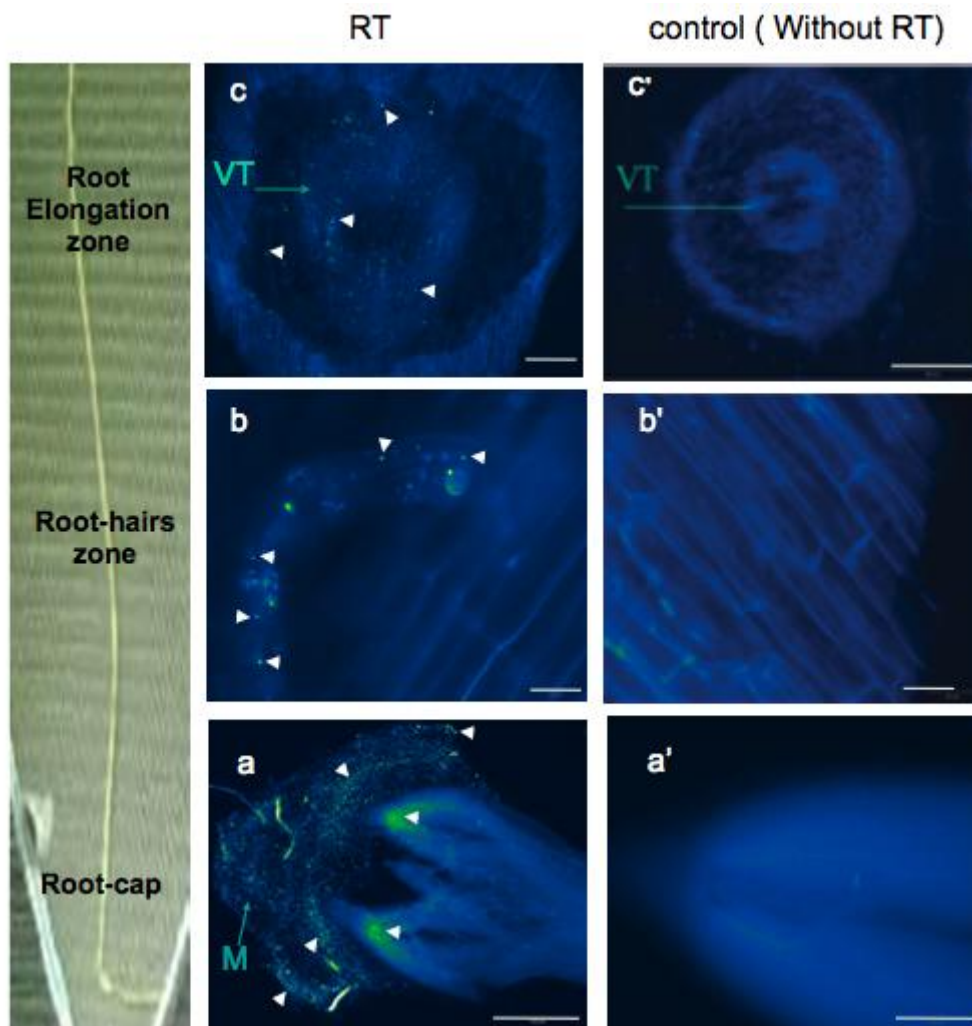
### **VI.3.Results**

#### **VI.3.1.Localization of the BPP transcripts**

We quantified the expression of the bacterial BPP genes using the *in situ* RT-PCR method. The roots not subjected to reverse transcription (control without RT, Fig. 1 a', b', c') displayed very low fluorescent signals compared to the same roots subjected to RT (Fig. 1 a, b, c) indicating that this method is suitable to quantify the level of gene transcripts in prokaryote cells, as demonstrated in eukaryotes (Van Aarle *et al.* 2007, Bargaz *et al.* 2012, Lazali *et al.* 2013). The BPP signal density was localized with the highest intensity in the root-cap (Fig.1a). Interestingly, the signal was observed outside the root tip, in the surrounding mucilage, but also inside the root (Fig. 1a), suggesting that *B. subtilis* may penetrate inside the root tissues. Some signal was also detected on root hairs (Fig. 1b) and the BPP signal was the least intense in the root elongation zone (Fig. 1c). Moreover in root cross sections, some BPP transcripts were found within the root pericycle and vascular traces (Fig.1c).







**Figure IV. 1** *In situ* localization of beta propeller phytase (BPP) transcripts (white arrowheads) in roots of common bean RIL147 inoculated with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium tropici* CIAT 899 grown under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phytate. In situ detection was performed in the three root zones indicated on the whole intact root (left panel) that are (a) root cap, (b) root-hairs, (c) root elongation. Images a'-b'-c' were negative control without reverse transcription (RT). VT, vascular trace; M, mucilage. Bars are 500  $\mu\text{m}$  in a; 200  $\mu\text{m}$  in a', c and c'; 20  $\mu\text{m}$  in b and b'.

### VI.3.2. Enumeration of *B. subtilis* on the root surface

In order to assess whether the BPP signal corresponds to the presence of bacteria on the root surface, GelGreen™ fluorochrome was applied for detection of DNA, whether from plant or bacterial origin. The corresponding images in Fig. 2 do confirm root colonization by bacteria for both inoculants. Again, the intensity of the fluorochrome signal was higher with than without *B. subtilis* co-inoculation. Also, the root tip displayed a high level of fluorescence (Fig. 2a').



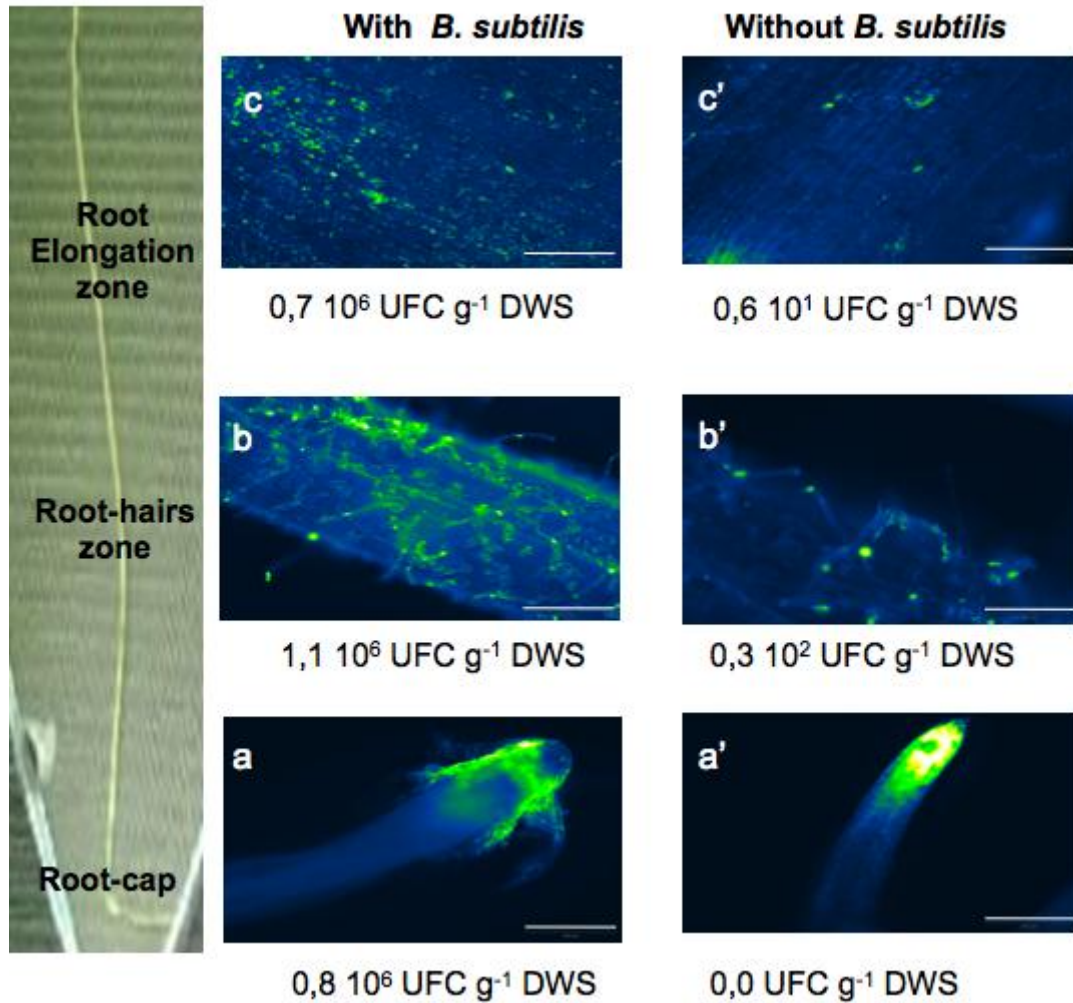


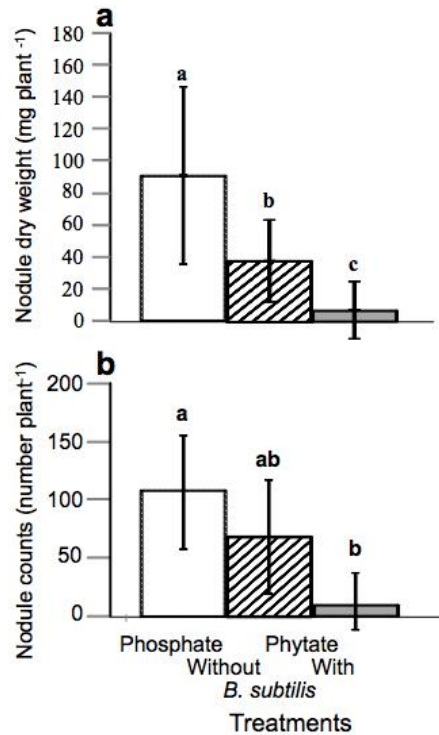
Figure IV. 2 Intensity of bacterial colonization in the different root parts (left panel) of common bean RIL147 grown under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phytate inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899 and with (a, b, c) or without (a', b', c') *Bacillus subtilis*. Bacterial populations were revealed in situ using the GelGreen™ for DNA and using bacteria counting expressed as the colony forming units per g root dry weights. Bars are 500  $\mu\text{m}$  in a'; 200  $\mu\text{m}$  in a, b and c'; 100  $\mu\text{m}$  in c and b'.

The higher density of bacteria with co-inoculation *R. tropici* - *B. subtilis* than with *R. tropici* alone was also confirmed by the culturable counts of bacterial suspension from the root surface (Fig. 2). The root-cap and root-hair zones were colonized by approximately  $10^6$  bacteria  $\text{g}^{-1}$  root DW, whereas bacteria number was almost 50% lower in the root elongation zone. In contrast, bacterial numbers counted in roots inoculated with *R. tropici* alone were much lower than with *B. subtilis*. The greatest difference was observed in root tip where no bacteria could be detected without inoculation of *B. subtilis* (Fig. 2 a').



### VI.3.3. Nodulation, growth and P use efficiency of plants

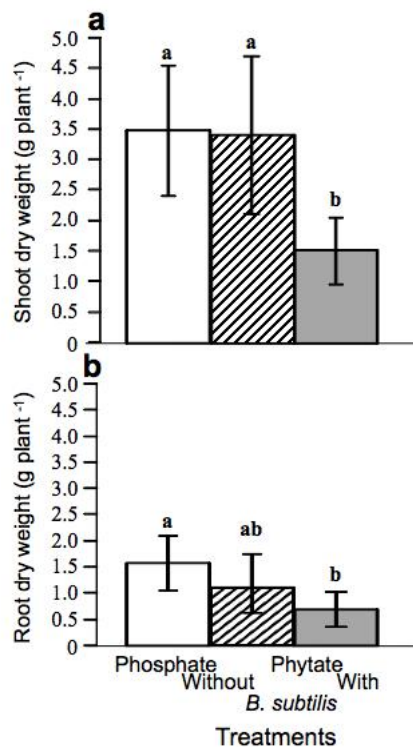
Co-inoculation with *B. subtilis* decreased the biomass and number of nodules (Fig. 3a, b). It also decreased the biomass of shoot and root although the decrease was statistically significant for shoot DW only (Fig. 4).



**Figure IV.3 Biomass (a) and number (b) of nodules in common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). Data are means  $\pm$  SD of 9 replicates harvested at 42 DAT. Mean values with the same letter were not significantly different at  $P < 0.05$ .**

With *R tropici* alone, nodulation was lower with phytate than with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . However, shoot or root biomasses were not significantly different with phytate or with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



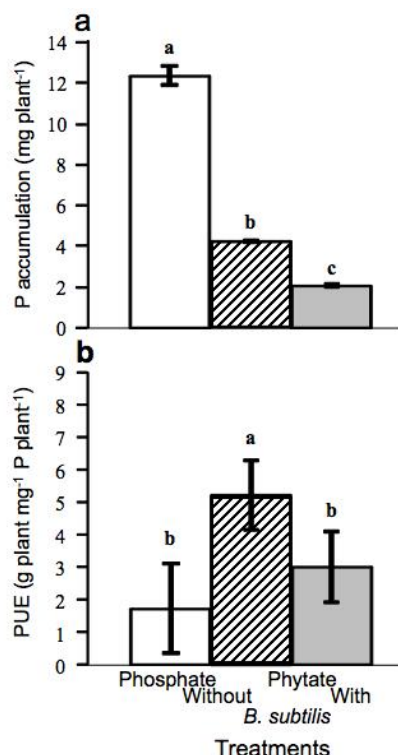


**Figure IV. 4 Biomass of shoot (a) and root (b) of the common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). Data are means  $\pm$  SD of 9 replicates harvested at flowering stage. Mean values with the same letter were not significantly different at  $P < 0.05$ .**

The highest P accumulations were observed under  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Co-inoculation with *B. subtilis* decreased plant P accumulation by 40% (Fig. 5a) and the PUE (Fig. 5b). With *R. tropici* alone, phytate supply did not alter plant P accumulation nor PUE, as compared to  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  supply where the highest P accumulation was observed.







**Figure IV. 5** Shoot phosphorus accumulation (a) and phosphorus use efficiency (b) of the common bean RIL147 inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 under 75  $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as phosphate (white bars) or as phytate (hatched bars) or co-inoculated with both *R. tropici* CIAT899 and *Bacillus subtilis* under phytate (grey bars). Data are means  $\pm$  SD of 9 replicates harvested at flowering stage. Mean values with the same letter were not significantly different at  $P < 0.05$ .

#### VI.4.Discussion

In this work, we showed that BPP transcripts were localized at the surface of a legume nodulated-root (Fig. 1). To our knowledge, this has not been shown before. The highest density of fluorescent signal at the root-cap (Fig. 1a) is not artefactual because it was not observed without reverse transcription (Fig. 1a'). This high level of BPP transcripts also corresponds to a high signal due to DNA in this zone (Fig. 2a) probably corresponding to bacterial DNA. This proliferation of bacteria may be due to the abundance of rhizodeposits in this zone (Hodge *et al.* 1998; Wardle *et al.* 2004; Gray and Smith 2005). The BPP signal in the root-hairs zone (Fig. 1b) is consistent with intense colonization by bacteria (Figs 2b, 2b'), and the previously described root exudation by these cells (Bertin *et al.* 2003). Eventually the lowest density of bacteria



colonization in the elongation zone (Figs 2c, c') would be consistent with low rhizodeposit of the root in relation with relatively low activity of exchange with the nutrient solution at the root surface of this zone (Gray and Smith 2005). However, the presence of BPP signal within the root in the elongation zone (Fig. 1c) is quite puzzling: it may be due to *B. subtilis* colonization or to endophytic BPP-harboring bacteria that have not been eliminated by surface sterilization of the seeds. Indeed, those signals cannot be attributed to *R. tropici* CIAT899, since the BPP gene cannot be found in the complete genome of this bacteria. Thus, these BPP-gene harbouring bacteria could be endophytic, suggesting a complex distribution of the BPP-harboring bacteria within the exo- and the endo-rhizosphere of the root tip.

The lower accumulation of P in phytate-fed plants with than without *B. subtilis* inoculation (Fig. 5) may be due to the inhibition of nodulation (Fig. 3), and the subsequent low N<sub>2</sub>-dependent growth (Fig. 4). This inhibition of nodulation is probably caused by the intense colonization of the root-hairs by *B. subtilis*. The latter might compete with *R. tropici* in this zone, since the rhizobial multiplication in the root-hair rhizosphere is a requisite for the successful infection by one rhizobia in the cross at the tip of the root-hair cell (Gage 2004). The high competitiveness of *B. subtilis* may be due to its capacity to use phytate in this environment, in contrast with *R. tropici* which does not have this capacity. The inoculation with a mutant of *B. subtilis* without phytase capacity, or alternatively, with a rhizobia harbouring high phytase capacity, would make it possible to test this hypothesis. Such Phy+ rhizobia would also allow for testing whether their phytase capacity would contribute to an increase in nodulation with phytate as a source of P. But so far, no Phy+ rhizobia has ever been described in the symbiosis with common bean. Therefore, the benefit of co-inoculation rhizobia-*bacillus* may actually require reconsidering the proportion of each bacteria in the inoculant.

The similar growth of common bean with Pi or phytate with *R. tropici* alone (Fig. 4) agrees with previous report of phytate-fed N<sub>2</sub>-dependent growth of common bean in hydroaeroponics (Attar *et al.* 2011). The observation of BPP signal within the root (Fig. 1) may explain this capacity of growth exclusively with phytate. Since no plant transporter of phytate has ever been found, phytate may need to be hydrolyzed within the rhizoplan or the rhizosphere before its P could be assimilated by any plant cell. This hydrolysis would be performed by the presumably endophytic BPP-bacteria



found within the root parenchyma (Fig. 1c). The lower accumulation of P with phytate than with phosphate (Fig. 5a) is compensated by the higher P use efficiency (Fig. 5b), which results in twice higher efficiency in use of the rhizobial symbiosis (Fig. 5) with phytate than with Pi. Likewise, several APases, such as phosphoenol pyruvate phosphatase (Bargaz *et al.* 2012) and phytase (Araujo *et al.* 2008), were over-expressed within the *P. vulgaris* nodules under P deficiency. This would optimise the PUE, and the subsequent efficiency in use of the rhizobial symbiosis by producing more biomass per unit of P consumed. This would correspond to fixing more N<sub>2</sub> per unit of nodule P content for a N<sub>2</sub>-dependent growth (Vadez and Drevon 2001).

In conclusion, our work shows an intense colonization of BPP-phytase bacteria in the rhizosphere of root-cap and root-hairs for the use of P from phytate and the subsequent growth of N<sub>2</sub>-dependent common bean. More work is needed to optimize the co-inoculation of rhizobia and *Bacillus* for the use of phytate that is a major source of Po in soils, and a potential pollutant of waters. Also, more studies are needed to identify rhizobia with phytase, and to better understand how to optimize the external and internal efficiency in use of phytate for SNF, and the overall growth of legume crops.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Fabatropimed project funded by Agropolis Foundation under the reference ID 1001-009 and AVERROES scholarship program provided by the EU for the internship of R.T. Maougal in INRA-Montpellier-France. The authors thank Brett Morgan for his revision of the manuscript.



## VI.5.References

- AFNOR (1969) Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. Paris: AFNOR: 224–246
- Araujo AP, Plassard C, Drevon JJ (2008) Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant soil* 312: 129-138
- Attar HA, Zagloul A, Bargaz A, Drevon JJ (2011) Phosphorus efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) is affected by the form of phosphorus application in hydroaerobic culture. *Intern J Agriculture, Environ Biotechnol* 4: 317-324
- Bargaz A, Ghoulam C, Amenc L, Lazali M, Faghire M, Abadie J, Drevon J.J (2012) A Phosphoenol pyruvate phosphatase gene transcript is induced in the root nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* under P deficiency. *J Exp Bot* 63: 4723-4730
- Bertin C, Yang XH, Weston L (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67–83
- Broughton WJ, Hernander G, Blair B, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128
- Cordell D, Drangert JO, White S (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ Change* 19: 292-305
- Drevon JJ, Hartwig U (1997) Phosphorous deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta* 201: 463-469
- Drevon JJ, Alkama N, Araujo AP, *et al* (2011) Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Procedia Environ Sci* 9: 40-46
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 280-300
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Physiol Plant* 3: 872–877





- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37: 395–412
- Hartwig UA, Nosberger J (1994) What triggers the regulation of nitrogenase activity in forage legume nodules after defoliation. *Plant Soil* 161:109–114
- Hernandez G, Drevon JJ (1991) In situ assay of acetylene reduction by *Phaseolus vulgaris* root nodules: influence of oxygen. *J Plant Physiol* 138: 587-591
- Hodge A, Paterson E, Grayston SJ, Campbell CD, Ord BG, Killham K (1998) Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO<sub>2</sub> enrichment. *Soil Biol Biochem* 30: 1033–1043.
- Huang H, Shi P, Wang Y, Luo H, Shao N, Wang G, Yang P, Yao B (2009) Diversity of Beta-Propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Appl Environ Microbiol* 75: 1508-1516
- Jorquera M, Martinez O, Maruyama F, Marschner P, Mora ML (2008) Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microb. Environ* 23: 182-191
- Kouas S, Labidi N, Debez A, Abdelly C (2005) Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron Sustain Dev* 25: 389- 393
- Kouas S, Debez H, Slatni T, Lbidi N, Drevon JJ, Abdelly C (2009) Root proliferation, proton efflux and acid phosphatase activity in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus shortage. *J Plant Biol* 52: 395-402.
- Lazali M, Zaman-Allah M, Amenc L, Ounane G, Abadie J, Drevon JJ, 2013. A phytase gene is over-expressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta* 238, 317-324.
- Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J* 1: 321-330
- Liu JZ, Li ZS, Li JY (1994) Utilization of plant potentialities to enhance the bio-efficiency of phosphorus in soil. *Ecoagriculture Res* 2: 16-23
- Molina C, Zaman-Allah M, Khan F, *et al* (2011) The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. *BMC Plant Biol* 14: 11-31



- Mullaney EJ, Ullah AH (2003) The term phytase comprise several different classes of enzymes. *Biochem Bioph Res Co* 312: 179-184
- Poonguzhali S, Madhaiyan M, Tongmin S (2006) Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp. *chinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. *Plant Soil* 286: 167–180
- Qiao YF, Tang C, Han XZ, Miao SJ (2007) Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean (*Glycine max* Murr.). *J Plant Nutrition* 30: 1341-1353
- Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE, O'Hara CP, Simpson RJ (2001) Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant Soil* 229: 47–56
- Richardson AE, George TS, Hens M, Simpson RJ (2005) Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, UK, pp 165 – 184
- Sa T, Israel DW (1991) Energy status and functioning of phosphorus deficient soybean nodules. *Plant Physiol* 97: 928–935
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol*, 156 : 997–1005.
- Tarafdar JC, Claassen N (2005) Preferential utilization of organic and inorganic sources of phosphorus by wheat plant. *Plant Soil* 27: 285-293
- Turner BL, Paphazy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID (2002) Inositol phosphates in the environment. *Phil Trans R Soc B* 357: 449–469
- Vadez V, Drevon JJ (2001) Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21: 691-699
- Vadez V, Rodier F, Payre H, Drevon JJ (1996) Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiol Biochem* 34: 871-878
- Van Aarle IM, Viennois G, Amenc LK, Tetry MV, Luu DT, Plassard C (2007) Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 17: 487–494



- Wang QR, Li JY, Li ZS (1998) Dynamics and prospect on study of high acquisition of soil unavailable phosphorus by plant. *Plant Nutrition Fertility Sci* 4: 107-116
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, Wall DH (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629–1633
- Yadav BK, Tarafdar JC (2004) Phytase activity in the rhizosphere of crops, trees and grasses under arid environment. *J Arid Environ* 58: 285–293

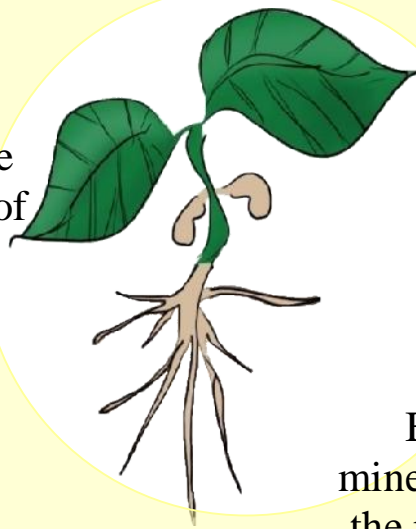


# Conclusion générale et perspectives

Introduction  
générale

Chapitre 1 : revue  
bibliographique

Chapitre 4  
Localization of the *Bacillus subtilis* Beta-propeller phytase transcripts in nodulated-roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate.



Chapitre 2  
Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency

Chapitre 3 La faible disponibilité en P stimule les activités phytase de la rhizosphère de *Phaseolus vulgaris* dans l'agro-écosystème de Sétif





---

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

### 1. Conclusion générale

Au cours du travail réalisé pendant cette thèse nous nous sommes intéressés au phosphore (P), élément important pour la nutrition des végétaux. Sous sa forme assimilable par les plantes, la majorité des sols cultivables en sont pauvres. Le recours à la fertilisation phosphatée pour corriger la déficience en cet élément en devient nécessaire mais il reste coûteux et préjudiciable pour l'environnement. La dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol. En effet, on trouve dans les sols un nombre important de microorganismes, incluant des bactéries, des champignons et des algues. Bien que ces microorganismes soient généralement liés à la surface des particules de sol, c'est surtout au niveau de la rhizosphère que leur activité est la plus élevée. Cependant, il faut noter que la population et la distribution des microorganismes solubilisant le phosphore au sein de la microflore totale, est variable.

Nous avons choisis comme plante modèle pour cette étude *Phaseolus vulgaris* ou haricot commun car en plus d'être la légumineuse comestible la plus importante dans le monde c'est une légumineuse très sensible à la déficience en phosphore.

Nous avons effectué plusieurs expériences pour accroître nos connaissances sur plusieurs phénomènes mal compris concernant la communauté bactérienne minéralisant le phytate dans la rhizosphère d'une légumineuse nodulée. Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de répondre à notre objectif principal qui consistait en une meilleure compréhension du rôle des phytases sécrétées par les bactéries dans la mobilisation du P organique. Les principaux résultats sont résumés dans ce chapitre de conclusion générale et perspectives.

Tout d'abord, nous avons cherché à évaluer et quantifier l'impact de la déficience en P sur la communauté bactérienne cultivable par quantification de cette dernière dans un système expérimental contrôlé (sous serre) et non contrôlé (sur champs). Deuxièmement, nous avons établis leur affiliation phylogénétique et



évaluer leur efficacité à sécréter des phytases. Troisièmement, nous avons cherché à localiser ces bactéries au niveau du rhizoplan

### **L'impact des conditions du sol déficient en P sur la communauté des bactéries rhizosphériques minéralisant le phytate**

Un premier volet (chapitre 2) réalisée sous serre nous a permis de mieux connaître la communauté bactérienne minéralisant le phytate dans la rhizosphère du haricot. Nous avons utilisé comme plante modèle la RIL 147 du haricot, lignée sensible au déficit en P. Les plantes ont été cultivées sous serre en pots et nous avons utilisé un sol suffisant en P et un autre déficient en P, tous deux récoltés dans la station expérimentale de l'Institut National de la Recherche Agronomique à Maugio, Montpellier, France. Nous avons caractérisé la taille de la communauté bactérienne cultivable globale (quantification par comptage bactérien sur milieu nutritif solide) et comparé avec la communauté bactérienne minéralisant le phytate (quantification par comptage sur milieu sélectif). Cette méthode a montré que les densités bactériennes étaient significativement plus élevées dans la rhizosphère que dans le sol nu et cela uniquement chez le sol P déficient. En revanche cette méthode de sélection sur milieu solide semble être source de faux positifs car en confirmant la croissance de ces bactéries minéralisant le phytate en milieu liquide avec du phytate comme seule source de phosphore, beaucoup de bactéries se sont révélées négative à la libération du Pi. Ce résultat confirme ceux de Patel *et al.*, (2010). Nous avons trouvé que la proportion d'isolats pouvant utiliser le phytate dans un milieu liquide représente seulement 1% des bactéries cultivables totaux, ce qui est en accord avec les résultats décrits par Richardson et Hodobas (1997) et Jossi (2008) dans d'autres sols de la rhizosphère des plantes. Ces différences de tailles de la communauté bactérienne mises en évidence semblent rendre compte d'un effet rhizosphère plus marqué concernant le sol P déficient comparé à celui de sol P suffisant. Donc, la plante, pourrait de par son effet rhizosphère, sélectionner une communauté bactérienne particulière.

Nos travaux ont révélé également que la communauté bactérienne de *P. vulgaris* minéralisant le phytate était plus active (phase de latence plus courte, les taux de production plus élevés Pi) in vitro dans des sols déficient en P que dans des sols suffisants en P. Les haricots nodulés auraient adapté leur communauté



microbienne en fonction de la disponibilité du P, en sélectionnant les bactéries ayant une plus grande capacité à minéraliser les phytates en condition de P déficient par rapport aux conditions de P suffisant. Cet accroissement de la communauté bactérienne spécifique en fonction de la disponibilité du P est également observé par la mesure de l'activité phytase dans la rhizosphère des plantes.

Cette première partie du travail menée sur la communauté bactérienne a permis de mettre en évidence un effet rhizosphère différent entre les plantes du sol P déficient et celle du sol P suffisant, ce premier résultat ne nous permet pas d'extrapoler cet effet à la communauté fonctionnelle, impliquée dans la minéralisation du Phosphore, au champ, d'où le travail suivant (chapitre 3) consacré à cette étude. Nous avons comparé l'effet de la déficience en phosphore sur les bactéries minéralisant le phytate dans deux sols contrastants en P d'un agro-écosystème méditerranéen et de comparer cette communauté bactérienne chez deux RILs contrastante en utilisation de P de *P vulgaris*. L'étude des isolats du sol a révélé qu'elles sont favorisées à proximité des racines et que seule une faible proportion (42 %) de ces bactéries est capable de minéraliser le phytate. L'influence des RILs sur la communauté bactérienne fonctionnelle rhizosphérique et dans une moindre mesure sur la communauté totale, serait due au fait que l'activité métabolique de la plupart des populations dans la rhizosphère est fondée sur la consommation des exsudats racinaires. La communauté bactérienne fonctionnelle peut, ainsi, être plus affectée par les changements dans l'exsudation racinaire que la communauté totale, quelle que soit la source de la modification (le génotype de la plante, le stade de développement ou le changement climatique). Par ailleurs, d'autres études sur divers systèmes, y compris les prairies pérennes (Jossi *et al.*, 2008), ont rapporté des écarts similaires: Ce qui expliquerait que l'activité phytase soit plus importante chez la RIL 147 comparativement à la RIL 115.

### **Efficacité des bactéries rhizosphérique à sécréter des phytases**

Nous avons également ajusté le dosage de la phytase à nos bactéries (chapitre 2). Ce dosage nous a permis de mettre en évidence l'augmentation significative de densité de la communauté bactérienne cultivable dans les sols déficients en P. Une majorité d'entre eux produit des enzymes extra-cellulaires, ce résultat correspond à ceux de Hussin *et al.* (2007) Toutefois, la présence simultanée des enzymes extracellulaires et celles associés aux cellules chez certaines bactéries comme dans



les résultats de Patel et al (2010) ceci est expliqué par la présence de mécanismes différents pour hydrolyser le phytate dans le milieu extérieur ou à l'intérieur du périplasme. Les études de Lim et al (2007) et Jorquera et al (2008b) ont montré que toutes les classes de phytases sont représenté chez les bactéries mais les plus fréquentes sont les classes de phytase HAP (présentant une activité maximale à un pH acide) et BPP (présentant une activité maximale à un pH neutre). Dans notre étude c'est au pH 7 que nous avons mesuré les activités phytases les plus élevées, nos résultats suggèrent que toutes les bactéries peuvent posséder une phytase BPP qui pourrait être plus appropriée à minéraliser activement le phytate, dans les sols calcaires de bassin méditerranéen, que la phytase HAP

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que les plantes de haricots cultivés sous déficience en P ont augmenté l'activité de phytase bactérienne dans leur rhizosphère. Cela peut indiquer une sélection positive par la racine de souches présentant cette fonction sous la déficience en P.

### **Caractérisation moléculaire de la communauté bactérienne minéralisant le phytate**

L'isolement et la caractérisation taxonomique des souches bactériennes (chapitre 2), présentant une activité phytase, ont révélé une large diversité de bactéries affiliées aux genres *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* et *Salmonella*. La structure est identique entre les deux sols suffisant et déficient en P, ce qui suggère que cette structure n'est pas P dépendante.

L'affiliation phylogénétique a montré que *Pseudomonas spp* représente le genre le plus fréquent associé à la rhizosphère du haricot commun, quelle que soit le sol étudié (sol P déficient ou P suffisant). Elle pourrait être un élément important de l'adaptation du haricot dans les sols pauvres en P. Ce résultat est en accord avec des études antérieures qui ont signalé la présence de *Pseudomonas sp.* dans la rhizosphère de nombreuses espèces végétales (Jorquera et al 2008a, Irshad et al ., 2012, Martinez et al 2011), certaines de ces souches affichant une capacité à minéraliser le phytate (Jorquera et al 2008a) Nos données expérimentales suggèrent donc que les bactéries appartenant à *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Pantoea* pouvaient minéraliser phytates dans la rhizosphère d'une légumineuse à





travers la production d'enzymes BPP soit libérées dans le sol ou associées aux cellules.

Indépendamment de la réalisation des expérimentations en champ ou sous serre, la structure de la communauté a révélé que la différenciation du sol à la racine était plus importante pour la communauté active que peu affecté par la sélection de la racine. Mais nos résultats montrent néanmoins que les plantes n'exercent pas une influence majeure sur la diversité bactérienne globale et affectent principalement l'activité et l'abondance des populations spécifiques, comme déjà signalé dans la rhizosphère de *Thlaspi caerulescens* (Gremion, 2003), le maïs et le soja (Buyer et al., 2002).

### **Localisation des bactéries au niveau du rhizoplan :**

Pour déterminer l'effet d'une bactérie minéralisant le phytate sur la croissance du haricot, nous nous sommes intéressés à la culture de cette plante soit avec du P minéral soit avec du phytate comme seule source de P, inoculé ou non avec *B. subtilis* (chapitre 4). Nous nous sommes concentrés sur l'expression du gène BPP de *B. subtilis* en utilisant la RT-PCR *in situ* pour vérifier si la colonisation du haricot commun par *B. subtilis* a été associée à l'expression de la BPP dans les racines de la légumineuse nodulée et nous avons effectué des mesures biologiques et chimiques afin de déterminer si l'inoculation avec *B. subtilis* permettrait d'améliorer la nutrition en P pour la croissance N<sub>2</sub>-dépendante du haricot sous phytates.

Notre travail montre une intense colonisation de bactéries BPP-phytase dans la rhizosphère des pointes racinaires et des poils absorbants pour l'utilisation de P à partir du phytate et la croissance N<sub>2</sub>-dépendante ultérieure du haricot commun. Nous avons montré également que les transcriptions BPP ont été localisées à la surface de la racine de la légumineuse nodulée, et ceci est un résultat intéressant dans la mesure où il n'a pas été démontré auparavant. La plus forte intensité du signal fluorescent a été observée sur la coiffe racinaire et il correspond également à un signal élevé de l'ADN bactérien dans cette zone. Cette prolifération de bactéries est expliquée par l'abondance de rhizodépôts dans cette zone (Hodge et al 1998; Wardle et al 2004; Gray et Smith 2005). Une grande prolifération bactérienne ainsi que le signal BPP sont également observés dans la zone racine des poils et c'est dans la zone d'élongation que la densité de la colonisation bactérienne est la plus faible, ce



qui est en relation avec une activité relativement faible de l'échange avec la solution nutritive à la surface de la racine de cette zone (Gray et Smith 2005). Cependant, la présence d'un signal BPP dans la racine dans la zone d'élongation est assez déroutante : il peut être dû à une colonisation de *B. subtilis* ou à des bactéries endophytes bactéries BPP qui n'ont pas été éliminés par la stérilisation en surface des graines. En effet, ces signaux ne peuvent pas être attribués à *R. tropici* CIAT899, puisque le gène BPP ne peut être trouvé dans le génome complet de cette bactérie, ce qui suggère une distribution complexe des bactéries BPP à l'intérieur de l'exo- et de l'endorhizosphère de la pointe de la racine.

Indépendamment de la méthode utilisée et quelles que soient les perturbations étudiées, des différences entre les communautés rhizosphériques par rapport aux communautés du sol nu étaient toujours observées. Tel que rapporté par Weiskopf (2005) pour le lupin et le blé, seulement une légère différenciation a été détectée entre la rhizosphère et les communautés du sol nu de haricot. Pris dans leur ensemble, nos données suggèrent fortement que les plants de haricots nodulés ont pu adapter leur communauté microbienne en fonction de la disponibilité du P en sélectionnant les bactéries avec une plus grande capacité à minéraliser les phytates en P déficiente que dans P des conditions suffisantes. Cette capacité, si spécifique de légumineuses nodulées, pourrait être une stratégie efficace pour mobiliser Pi inorganique à partir de phytate de sol et pourrait participer à l'augmentation de la disponibilité du P observée dans les cultures intercalaires de céréales et de légumineuses

## **2- Perspectives**

En perspectives, il nous apparait que différentes expérimentations pourrait être réalisées afin de répondre a certains aspects qui demeurent incompris :

- caractériser et différencier les communautés bactérienne minéralisant le phytate sur plusieurs RILs contrastantes en utilisation de P afin de confirmer ou d'infirmer un effet génotype de la plante.
- Dans nos travaux nous nous sommes intéressés aux bactéries cultivées, il serait intéressant de quantifier toutes les bactéries de la rhizosphère du haricot par q-PCR.



- La similitude de la densité bactérienne minéralisant le P entre la rhizosphère et le sol nu du sol P suffisant suggèrent l'absence de sélection de bactéries minéralisant le P dans la rhizosphère du haricot commun sous P suffisant. Des travaux complémentaires peuvent désormais être considérés pour évaluer l'impact de ces populations sur la minéralisation de Po en particulier sous forme de phytate, trouvé dans le sol de la Méditerranée, afin d'utiliser les bactéries minéralisation le phytate comme inoculant pour la nutrition P.

## References

- Buyer JS, Roberts DP, Russek-Cohen E. (2002) Soil and plant effects on microbial community structure. *Can J Microbiol* 48: 955-964.
- Gremion F, Chatzinotas A, Harms H (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environmental Microbiol* 5: 896-907.
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37: 395–412
- Hussin ASM, Farouk AE, Greiner R, Salleh HM, Ismail AF (2007) Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *W J Microbiol Biotechno.* 23:1653-1660.
- Hodge A, Paterson E, Grayston SJ, Campbell CD, Ord BG, Killham K (1998) Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO<sub>2</sub> enrichment. *Soil Biol Biochem* 30: 1033–1043.
- Irshad U., Brauman A., Villenave C., Plassard C., (2012) Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant Soil.* 358: 155–168.
- Jorquera M, Martinez O, Maruyama F, Marschner P., Mora ML (2008b) Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microb Environ.* 23:182–191.



- Jorquera MA, Hernández MT, Rengel Z, Marschner P, Mora ML (2008a) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol Fert Soils*. 44:1025–1034.
- Jossi M (2008) Rhizosphere bacterial communities associated with *Lolium perenne* structuration and plant-mediated influences. Thèse d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse.
- Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J*. 1: 321–330
- Martínez O. A., Jorquera M. A., Crowley D. E., Mora M. L., (2011) Influence of nitrogen fertilisation on pasture culturable rhizobacteria occurrence and the role of environmental factors on their potential PGPR activities. *Biol Fert Soils*. 47 875 – 885.
- Patel KJ, Singh AK, Nareshkumar G (2010) Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Appl Soil Ecol*. 44:252–261
- Richardson AE, Hadobas PA (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol*. 43:509–516
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, Wall DH (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629–1633
- Weisskopf L (2005). How white Lupin can survive in soils with sparingly available phosphate: Cluster root secretion physiology and plant microbe interactions. PhD thesis, University of Zürich, University of Neuchatel.