

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri, Constantine
Faculté des sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre :
Série :

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de magister
en biotechnologies végétales

THEME

Techniques de production d'inoculum Rhizobial.
Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) :
Inoculation et nodulation

Présenté par : M^{elle} MAOUGAL Rym Tinhinen

Soutenu le : 2004

Devant le jury :

Présidente : Dr N.YKHLEF

Maître ce conférences. Université Constantine

Rapporteur : Pr. A. DJEKOUN

Professeur. Université Constantine

Examineur : Dr. N.BENGUEDOUAR

Maître de conférences. Université Constantine

Examineur : Dr L. DEHIMAT

Maître de conférences. Université Constantine

A mes parents

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon encadreur, le professeur Djekoun Abdelhamid, pour son aide précieuse et ces conseils judicieux .Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme Ykhlef N., maître de conférence à l'Université Mentouri, Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales pour son aide et ces conseils et d'avoir accepter de présider mon jury.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Mr Benguedouar A., maître de conférence à l'Université de Mentouri et à Mr Dhimat L. maître de conférence à l'Université Mentouri qui me font l'honneur d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier particulièrement mes professeurs Mme Khalfallah et Mr Khelifi D., Professeurs à L'université Mentouri, Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, pour leurs encouragements.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Belbekri N. et Mme Tourki M., ingénieurs de laboratoire pour leur aide et leurs encouragements et à Mr Benbelkacem Abdelkader, directeur de l'Institut Techniques des Grandes Cultures (ITGC) pour m'avoir aidé à mener à bien ce travail.

A mes amis de promotion, j'adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide.

Maougal Rym Tinhinen

Sommaire

Introduction

I- ÉTABLISSEMENT DES SYMBIOSES RHIZOBIENNES.....	13
1-LE RHIZOBIUM.....	13
1-1- <i>Caractères généraux</i>	13
1-2- <i>Taxonomie du Rhizobium</i>	13
1-3- <i>Le genre Mesorhizobium</i>	13
2- LA PLANTE HOTE.....	14
2-1- <i>Famille de plante-hôtes impliquées dans la symbiose</i>	15
2-2- <i>La légumineuse étudiée: le pois chiche</i>	15
2-3- <i>Classification</i>	15
2-4- <i>Valeur nutritionnelle</i>	16
2-5- <i>Etude générale de la plante</i>	16
2-6- <i>Place du pois chiche en Algérie</i>	16
II- L'INFECTION ET LA NODULATION	17
1- L'INFECTION	18
1-1- <i>Phase de pré-infection</i>	18
1-2- <i>Phase de l'infection et de la formation des nodules</i>	19
1-3- <i>Phase de fonctionnement ou maturité des nodules</i>	20
2- ÉTAPES DU DEVELOPPEMENT DES NODOSITES.....	20
2-1- <i>Echange de signaux</i>	22
2-2- <i>Formation des nodules</i>	22
3- STRUCTURE ET MORPHOLOGIE DES NODULES.....	22
4- FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION DES NODULES.....	24
5- LA SPECIFICITE	24
6- LES GENES DE LA NODULATION	25
- <i>Les facteurs Nod</i>	26
7- PROCESSUS DE FIXATION DE L'AZOTE	26
- <i>La réaction globale de la fixation de l'azote</i>	28
8- LES GENES DE LA FIXATION.....	28
9- REGULATION DE LA FIXATION DE L'AZOTE	30
10- LA NITROGENASE.....	30
11- ROLE DE LA LEGHEMOGLOBINE	31
III- CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES LIEES A LA FIXATION.....	31
IV- L'INOCULATION	33
1- LA PRATIQUE DE L'INOCULATION.....	33
2- HISTORIQUE.....	34
3-LES BUTS DE L'INOCULUM.....	34
4- MODE D'ACTION D'UN INOCULUM	34
5- NECESSITE D'UNE INOCULATION.....	35
6- CAS DE DEFICIENCE EN RHIZOBIA	35

7- SELECTION D'UNE SOUCHE DE RHIZOBIUM POUR LA PRODUCTION D'INOCULUM	36
-Caractères physiologiques des Rhizobia.....	36
7-1-Résistance à la température et tolérance au pH	36
7-2-Résistance à la salinité.....	36
7-3-Résistance aux concentrations élevées d'azote.....	36
7-4-Résistance aux antibiotiques.....	37
8- FACTEURS AFFECTANT LA REPONSE A L'INOCULATION	37
8-1-La profondeur du placement de l'inoculum.....	37
8-2-Date de plantation	38
8-3-Sécheresse et humidité.....	38
8-4-L'utilisation d'un fongicide ou d'un herbicide	38
8-5-Exposition aux rayons solaires et au séchage	38
8-6-Le pH du sol.....	39
8-7-Un manque de Phosphore	39
8-8-L'impact de la population rhizobial autochtone sur l'inoculation	39
8-9-Influence du sol sur l'inoculation	39
8-10-Molybdène.....	40
9- CRITERES DE SELECTION D'UN INOCULUM	40
9-1-Caractéristiques d'un inoculum	41
10-TECHNOLOGIES DE LA PRODUCTION D'INOCULUM	41
10-1-Les étapes de la production d'inoculum	41
10-2-Le succès d'une inoculation	42
10-3-Méthodes d'inoculation des semis.....	42
10-3-1-L'application aux graines (enrobage)	42
10-3-2-L'application au sol (liquide).....	43
11-LE SUPPORT D'INOCULUM.....	43
12-DIFFERENTS TYPES DE SUPPORT D'INOCULUM.....	43
12-1-L'inoculum solide.....	44
12-1-1-La tourbe.....	44
12-1-2- La vermiculite	44
12-2-L'inoculum liquide.....	44
13-L'ADHERENCE	45
14-CONTROLE DE QUALITE DE L'INOCULUM	47
15-STOCKAGE DE L'INOCULUM.....	47
16-LA CO-INOCULATION	48
16-1- La co-inoculation avec Azospirillum	48
16-2-L'inoculation avec des bactéries solubilisant le phosphate	48
I- ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODULES	50
1- MATERIEL VEGETAL	50
2- COLLECTE DES SOLS.....	50
3- MODE DE CULTURE	52
4- COLLECTE DES NODULES.....	52
5- CONSERVATION DES NODULES.....	53
6-ISOLEMENT DES RHIZOBIA A PARTIR DES NODULES.....	53
6-1 - Stérilisation des nodules	54
6-2- L'isolement.....	54
7- PRINCIPAUX MILIEUX DE CULTURE UTILISES.....	54
8-PURIFICATION DES ISOLATS	54

9- CONSERVATION DES ISOLATS.....	56
10-TESTS DISTINCTIFS ENTRE LE GENRE RHIZOBIUM ET AGROBACTERIUM.....	56
10-1-Précipitation du Calcium-Glycérophosphate	57
11- AUTHENTIFICATION DES ISOLATS (TEST DE NODULATION).....	57
11-1- Préparation et stérilisation du mélange sable-vermiculite	57
11-2-Préparation des jarres de Léonard.....	58
11-3- Sélection et stérilisation des semis.....	58
11-4- Inoculation des jarres	60
11-5- La chambre de culture.....	60
II- CARACTERISATION DES BACTERIES	60
1- MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE	60
1-1- Mesure de la densité optique	61
1-2- Enumération bactérienne	61
2-EFFETS DE FACTEURS INTRINSEQUES.....	29
2-1-Utilisation de la source de carbone	30
2-2-Utilisation de la source d'azote.....	30
2-3- Résistance aux antibiotiques.....	30
3- EFFET DE FACTEURS EXTRINSEQUES	31
3-1- Tolérance à la salinité (NaCl)	31
3-2- Influence du pH.....	31
3-3- Effet de la température.....	31
III- PRODUCTION D'INOCULUM.....	32
1- CULTURE DE RHIZOBIA	32
1-1-Milieu de culture	32
1-2- Pré-culture.....	32
1-3-La fermentation	32
1-4-Suivi de la croissance bactérienne.....	33
2- PREPARATION DES SUPPORTS D'INOCULUM.....	34
2-1-Les supports utilisés.....	34
2-2- Préparation des supports	34
2-2-1- Détermination de l'humidité des supports	35
2-2-2-Broyage des supports	35
2-2-3- Volume d'inoculum absorbé par le support.....	35
2-2-4-Neutralisation des supports.....	36
2-2-5- Stérilisation des supports et emballage.....	37
3- L'INOCULATION	37
4- CONTROLE DE QUALITE DE L'INOCULUM	37
4-1- Contrôle de qualité de l'inoculum liquide	37
4-1-1-Acidité du milieu.....	38
4-1-2-Contamination du milieu.....	39
4-1-3-Estimation du nombre de Rhizobium dans l'inoculum.....	39
4-2- Contrôle de qualité de l'inoculum solide	39
5- L'INOCULATION DES GRAINES DE POIS CHICHE ET CULTURE EN POTS	39
5-1-Préparation de L'adhésif	40
5-2-Les techniques d'inoculation	40
5-2-1- La méthode d'enrobage	40
5-2-2- La méthode liquide à base de tourbe.....	41

6- DETERMINATION DE LA SURVIE DES BACTERIES	41
7- TEST DE L'INOCULUM AU SOL	41
I- CARACTERISATION PHENOTYPIQUES DES RHIZOBIA.....	43
1- ISOLEMENT ET IDENTIFICATION	43
1-1-Examen microscopique	44
1-2-Aspect des colonies	44
1-3- Croissance sur les différents milieux de cultures.....	44
1-4-Test de différenciation entre les deux genres <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	45
-Test du calcium-glycérophosphate (Hofer, 1941).....	45
2- TEST DE NODULATION : AUTHENTIFICATION DES ISOLATS	45
II- CARACTERISATION DES RHIZOBIUM	49
2-CROISSANCE BACTERIENNE.....	49
1-1-Densité optique	49
2- TEMPS DE GENERATION.....	52
3-EFFETS DES FACTEURS INTRINSEQUES.....	54
3-1-Source de carbone.....	54
3-2-Source d'azote	54
3-3-Résistance intrinsèque aux antibiotiques	55
4- EFFETS DES FACTEURS EXTRINSEQUES	57
4-1-Tolérance au NaCl	57
4-2-Effet de la température.....	59
4-3- Effet du pH sur la croissance des <i>Rhizobia</i>	62
5-CALCUL DES INDICES DE SIMILARITE DES ISOLATS (IRS)	64
III –PRODUCTION D'INOCULUM.....	70
1-LA PREPARATION DES SUPPORTS D'INOCULUM	71
1-1-Détermination de l'humidité des supports	71
1-2-Le broyage des supports.....	71
1-3-Le volume de l'inoculum absorbé par les supports	71
1-4-Neutralisation des supports.....	72
1-5-Stérilisation des supports	73
2- CONTROLE DE QUALITE DE L'INOCULUM	73
2-1-L'inoculum liquide.....	73
2-1-1-Le contrôle de la pureté	73
2-1-2-Le contrôle du pH.....	74
2-1-3-Estimation du nombre de <i>Rhizobium</i> dans l'inoculum.....	74
2-2- L'inoculum solide.....	75
2-2-1-Observation microscopique.....	76
2-2-2-Détermination du nombre de <i>Rhizobium</i> dans l'inoculum	76
2-2-3-Suivi de la croissance des <i>Rhizobia</i> dans les différents inoculums.....	79
3-L'INOCULATION DES GRAINES.....	82
3-1- Le nombre de <i>Rhizobia</i> par graine enrobée	82
3-2- La méthode liquide à base de tourbe	86
4-EFFETS DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA SURVIE DES BACTERIES DANS L'INOCULUM	88
4-1- Effet du support.....	88
4-2- Effet de la température de conservation :.....	88

4-3- Effet du temps de conservation de l'inoculum sur le nombre de
Rhizobium :..... 89

Discussion générale et conclusion84

Introduction

La production végétale et le rendement sont deux critères liés au potentiel de la plante, aussi les conditions environnementales peuvent également contribuer à augmenter cette production (techniques culturales, apport d'engrais,...). Parmi les éléments qui peuvent contribuer à augmenter la production végétale et le rendement chez les légumineuses, la mise à profit de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* à travers l'apport d'inoculum.

Cette technique consiste en l'introduction de bactéries dans le sol, pour fixer l'azote libre de l'air contenu dans le sol et éventuellement le transférer à la plante hôte, augmentant ainsi à la fois la production végétale et la teneur du sol en matière organique.

Cette technique de l'utilisation d'apport d'inoculum à contribuer à la mise en place d'une intense activité de production d'inoculum s'est améliorée ces dernières années. A cette effet on note que la quantité d'inoculums à base de *Rhizobium* produite dans le monde est de l'ordre de 2000 tonnes / année, pour une superficie d'environ 20 millions d'hectares cultivée par des légumineuses à graines et fourragères (Herridge et al., 2002).

En Algérie, l'inoculation est peu connue. Elle est utilisée uniquement à titre expérimental.

Parmi les légumineuses, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des souches bactériennes du genre *Mesorhizobium* (Liu et al 2003).

L'exploitation de la relation symbiotique (plante, *Rhizobium*) est devenue actuellement un champs d'investigation en terme de

- ◆ Souche efficiente.
- ◆ Support de conservation.
- ◆ Technologie de production d'inoculum.

L'une des techniques d'exploitation de la fixation symbiotique de l'azote consiste à inoculer les légumineuses avec des *Rhizobia* efficaces. Le bénéfice de

cette inoculation dépend à la fois de la souche inoculée, de la plante-hôte et des conditions environnantes (Aouani et al., 1997). La sélection de souches compétitives devrait par conséquent tenir compte de l'ensemble de ces contraintes, afin de promouvoir et d'améliorer la culture des légumineuses alimentaires en l'occurrence Pois chiche et d'augmenter la fixation symbiotique d'azote et le rendement en grains.

La technologie de sélection de souches bactériennes implique l'amélioration de souches plus efficaces qui doivent être utilisées pour remplacer les souches actives du sol. L'analyse nécessite la mise au point de techniques appropriées pour différencier les souches inoculées de celles natives et les dépister dans le sol. A cet effet, la résistance aux antibiotiques est l'une des techniques les plus couramment utilisées (Feki et al ; 1998).

Pour répondre à la question relative à la production d'inoculum, ce travail comporte cinq axes :

- ◆ authentifier les différentes souches extraites après prélèvement des nodules et isolement des souches pour l'évaluation de leur performance symbiotique dans des conditions bactériologiquement contrôlées.
- ◆ caractériser les souches par différents tests culturels, biochimiques et nutritionnels spécifiques aux Rhizobia.
- ◆ calculer l'indice de similarité des souches.
- ◆ production et contrôle de qualité de l'inoculum pour les isolats sélectionnés à partir de la caractérisation phénotypique.
- ◆ conditionner les différents supports pour la fabrication d'inoculum.

Revue Bibliographique

I- Établissement des symbioses rhizobiennes

1-Le *Rhizobium*

Les *Rhizobium* sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique en association avec des légumineuses hôtes (Loynachan., 2003).

1-1-Caractères généraux

Les *Rhizobium* nodulant le pois chiche sont des bactéries mobiles, Gram négatif, aérobies et non sporulantes (Jordan, 1984).

Le milieu le plus utilisé pour la culture des *Rhizobium* est le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) contenant des sels minéraux, du sucre, de l'extrait de levure et de l'agar (Vincent.,1970 ; Somasegaran et Hoben.,1994). Les souches apparaissent au bout de 3 à 5 jours après incubation à 25-30°C. Elles ont une forme circulaire, convexe de 2 à 4 mm de diamètre (Somasegaran et Hoben., 1994). Dans le sol ces bactéries sont sous forme de bâtonnets de taille moyenne (0,5 - 0,9µ de largeur et 1,2 - 3µ de longueur) (Jordan, 1984).

1-2- Taxonomie du *Rhizobium*

Les *Rhizobium* isolés jusqu'à présent appartenait tous au groupe des *alpha-Proteobacteria* (l'un des 25 phylums bactériens et sans doute l'un des plus importants, il comporte 387 genres qui se répartissent en 5 branches phylogénétiques). Récemment des chercheurs viennent d'identifier deux souches bactériennes formant des nodules racinaires sur des légumineuses qui font partie d'un autre groupe, les beta-proteobacteries. (Young., 1996)

1-3- Le genre *Mesorhizobium*

Les *Rhizobium* nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) sont classés dans le genre *Mesorhizobium* (Nour et al ; 1994, Jarvis et al ; 1997). Ce genre comprend deux espèces : *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium mediterraneum* (tableau 1).

Tableau 1 Classification des rhizobia (Anonyme 2004)

<p><i>Rhizobium etli</i> <i>Rhizobium galegae</i> <i>Rhizobium gallicum</i> <i>Rhizobium giardinii</i> <i>Rhizobium hainanense</i> <i>Rhizobium huautlense</i> <i>Rhizobium indigoferae</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium loessense</i> <i>Rhizobium lupini</i> <i>Rhizobium mongolense</i> <i>Rhizobium sullae</i> <i>Rhizobium tropici</i> <i>Rhizobium undicola</i> <i>Rhizobium yanglingense</i></p>	<p>Type species Formally « <i>Rhizobium huanglingense</i> »</p> <p>Formally « <i>Rhizobium hedysari</i> »</p> <p>Formally <i>Allorhizobium undicola</i></p>
<p><i>Mesorhizobium amorphae</i> <i>Mesorhizobium chacoense</i> <i>Mesorhizobium ciceri</i> <i>Mesorhizobium huakuii</i> <i>Mesorhizobium loti</i> <i>Mesorhizobium mediterraneum</i> <i>Mesorhizobium plurifarium</i> <i>Mesorhizobium tianshanense</i></p>	<p>Formally <i>Rhizobium ciceri</i> Formally <i>Rhizobium huakuii</i> Formally <i>Rhizobium loti</i>, Type species Formally <i>Rhizobium mediterraneum</i></p> <p>Formally <i>Rhizobium tianshanense</i></p>
<p><i>Sinorhizobium americanus</i> <i>Sinorhizobium arboris</i> <i>Sinorhizobium fredii</i> <i>Sinorhizobium kostiense</i> <i>Sinorhizobium kummerowiae</i> <i>Sinorhizobium medicae</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Sinorhizobium morelense</i> <i>Sinorhizobium sahelii</i> <i>Sinorhizobium teranga</i> <i>Sinorhizobium xinjiangense</i></p>	<p>Published.name not yet validated</p> <p>Formally <i>Rhizobium fredii</i>, Type species</p> <p>Formally <i>Rhizobium meliloti</i></p> <p>Known also as <i>Sinorhizobium sahelense</i> Incorrectly known as <i>Sinorhizobium teranga</i></p>
<p><i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i></p>	<p>Formally <i>Rhizobium japonicum</i> , Type species</p>
<p><i>Azorhizobium caulinodans</i></p>	<p>Type species</p>
<p><i>Methylobacterium nodulans</i> <i>Burkholderia phymatum</i> <i>Rlstonia taiwanensis</i> <i>Devosia neptuniae</i> <i>Blastobacter denitrificans</i></p>	

2- La plante hôte

2-1- Famille de plante-hôtes impliquées dans la symbiose

Les légumineuses alimentaires sont parmi les cultures vivrières les plus cultivées par l'homme. Elles constituent une importante source protéique et se présentent comme un substitut aux protéines animales, disponibles à travers les viandes rouges et blanches qui sont difficilement accessibles à de larges couches de la population. Les Légumineuses sont cultivées pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et pour rompre les successions céréalières préjudiciables aux rendements et aux productions à travers les assolements. (Hamadache et *al.*, 1997).

2-2-La légumineuse étudiée: le pois chiche

- Historique et origine :

Le pois chiche est parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'homme depuis l'antiquité (Van Der Maesen., 1987). Les premières traces d'utilisation du pois chiche comme aliment remontent à environ 7000 ans. Il aurait été cultivé pour la première fois dans la région méditerranéenne il y a 5000 ans.

Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du sud-est de la Turquie et de la Syrie (Saxena 1984, Smithson et *al* 1985, Singh 1997). Il arriva sur les côtes du bassin méditerranéen après avoir traversé de nombreux pays et les Phéniciens pourraient être à l'origine de cette diffusion (Anonyme a 2003).

2-3- Classification

Le pois chiche est une plante appartenant à la famille des *Fabaceae*, sous famille de *Papilionoideae*, tribu de *Cicereae*, genre *Cicer*, contenant 40 espèces (Paterson et *al* 2000).

2-4- Valeur nutritionnelle

Le pois chiche, au même titre que la fève et les haricots, est une graine protéagineuse cultivée pour sa richesse en protéine. Il fait partie du nombre très réduit d'aliments qui apportent à la fois des protéines et un grand nombre de sels minéraux (calcium, fer, potassium et phosphore) jouant un rôle important dans l'alimentation. Elle renferme entre 20 % et 25% de protéines. A titre de comparaison, la teneur en protéines de la viande est de 16 à 25% et celle du poisson de 14 à 20% (Anonyme b., 2004).

2-5- Etude générale de la plante

Le pois chiche est une légumineuse annuelle, autogame, herbacée (Summerfield et Robert, 1985). C'est une plante haute de 20 à 50 cm, à port dressé, cultivée pour ses graines rondes contenues au nombre de 1 ou 2 dans des gousses (Anonyme c.,2004) (figure 1) .*Cicer arietinum* est la seule espèce annuelle cultivée (Summerfield et al, 1984 ; Van Der Maesen, 1987 ; Giller., 2001).

Le semis du pois chiche se fait au printemps dans la région Nord méditerranéenne. Les besoins en humidité dans le sol de la plante sont de 15-40% pendant la germination et le développement de la graine ; l'humidité excessive du sol à la floraison réduit le rendement en grain. (Wery et al, 1994).

2-6- Place du pois chiche en Algérie

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L) est, en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves. Sa culture a connu, durant la décennie 1980-90 une certaine évolution progressive sur le plan des superficies et de la consommation et une évolution régressive en terme de productivité (Anonyme d., 1994). Les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie sont souvent d'ordre agro techniques liées aux conditions de semis (période, modes de semis, qualité de la semence) et à l'infestation par les adventices (Hamadache et Ait Abdallah., 1998)



Figure 1 Le pois chiche (*Cicer arietinum* .L) (Anonyme k ; 2003)

II- L'infection et la nodulation

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection. (Anonyme e, 2004)

1- L'infection

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez et al, 1991). (Figure 2)

1-1- Phase de pré-infection

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine. (Richter., 1993).

Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïdes qui activent les facteurs Nod déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales (Hopkins., 1999).

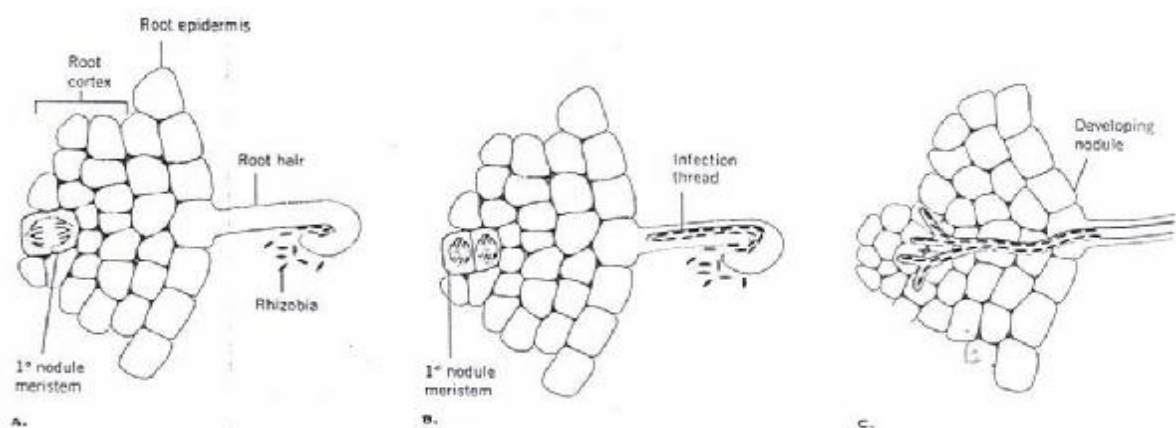


Figure 2 Schémas du processus d'infection amenant à la formation des nodules (Hopkins ., 1999)

- A. les Rhizobia colonisent le sol dans le voisinage des poils absorbants en réponses aux signaux envoyer par les racines ; en retour les Rhizobium stimulent les poils absorbants afin qu'ils se recourbent.
 - B. les Rhizobia envahissent les racines et forment le cordon d'infection
 - C. le cordon d'infection pénètre de nombreuses cellules corticales pour former le nodule
- La dernière étape (non représenté) est la libération des Rhizobia.

1-2-Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme alors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux (Figure 3).

Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (Hopkins., 1999)

1-3- Phase de fonctionnement ou maturité des nodules

Les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées. Les *Rhizobium* prennent la forme bactéroïde, entourés par une membrane pér bactéroidienne, après leur libération du cordon d'infection (Hopkins., 1999).

La membrane pér bactéroidienne a pour rôle la stabilité du système hôte/symbiose ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (Richter., 1993).

1-4- Phase de dégénérescence

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol (Richter., 1993).

2- Etapes du développement des nodosités

La nodulation est un processus d'interactions complexes entre les deux partenaires. Les mécanismes moléculaires de reconnaissance entre la plante hôte et les bactéries sont considérés comme une forme de communication entre les cellules. Un échange précis de signaux moléculaires entre la plante hôte et les

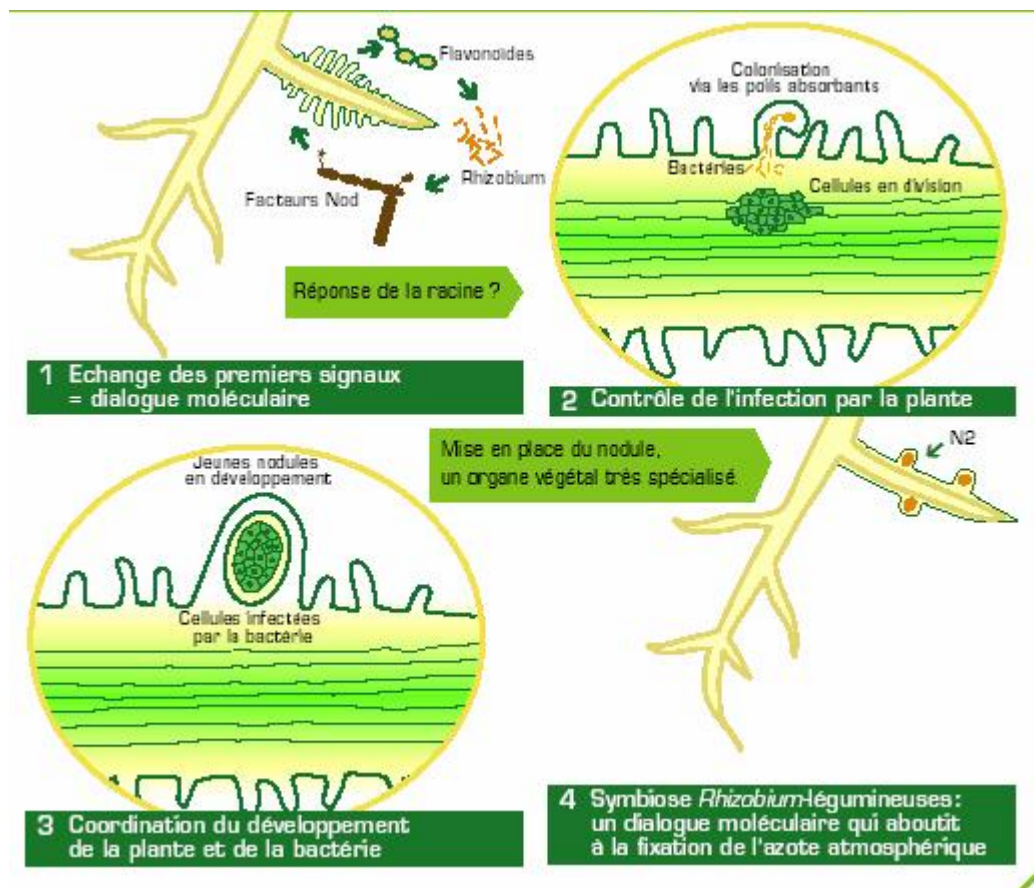


Figure 3 L'infection et la nodulation (Journet ; 2004)

rhizobia est essentiel pour le développement de nodules (Begum et Gafur., 2001). (Figure 4).

2-1- Echange de signaux

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* commence par l'échange de signaux moléculaires entre la plante et la bactérie, des flavonoïdes produits par la plante attirent les *Rhizobium* et déclenchent la production et l'apparition de facteurs de nodulation (Nod) chez les bactéries (Trevaskis et al ; 2002).

2-2- Formation des nodules

La plante produit une nouvelle région méristématique (ou nodule) dont l'augmentation rapide loge les *Rhizobium* et leur procure l'eau et les nutriments. Les *Rhizobium* en retour utilisent la partie des éléments à fournir pour produire de l'ammoniaque (NH₃) à partir du N₂. Le NH₃ est transformé en un composé organique pour faciliter le transport et utilisé par la plante.

Le développement des nodosités racinaires chez les plantes légumineuses est déclenché par des signaux diffusables : des lipochitooligosaccharides. Ces facteurs Nod sont produits par les *rhizobia* à l'approche de la rhizosphère des plantes hôtes (Anonyme f., 2004).

3- Structure et morphologie des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, soit sphérique. Ils subissent une étonnante différenciation morphologique : centrale, les cellules dépourvues de symbiotes forment vers l'extérieur une sorte de tissu cortical ; des faisceaux d'éléments conducteurs sont reliés à un faisceau conducteur central de la racine. A l'exception de ces zones de différenciations

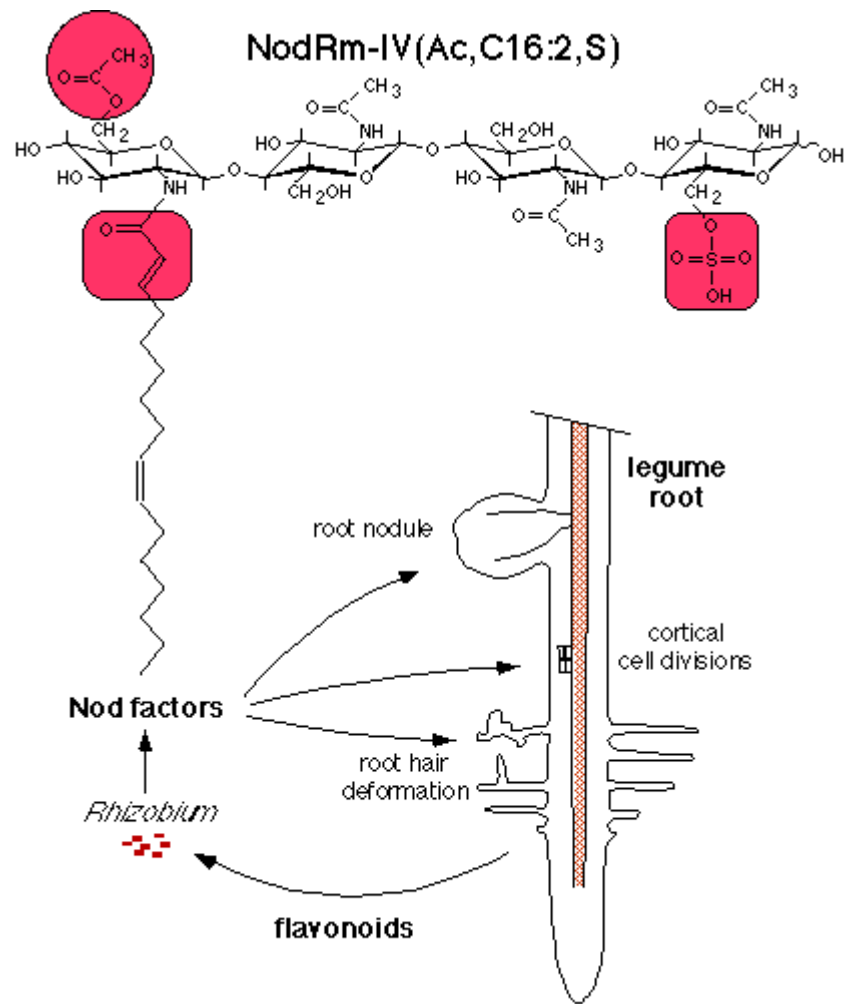


Figure 4 Interaction entre les partenaires symbiotiques (Bisseling et al .,2004)

particulières, lors de symbiose efficace, la plupart des cellules du nodule sont remplies de bactéroïdes (Richter.,1993, Trevaskis et al.,2002) (Figure 5).

4- Facteurs influençant la formation des nodules

L'organogenèse des nodosités dépend de la condition physiologique de la plante, par exemple la croissance sous limitation de l'azote combiné. En plus, les hormones végétales, agissent comme des facteurs généraux du contrôle de la division cellulaire et de la différenciation tissulaire (Richter., 1993).

5- La spécificité

Seuls les facteurs Nod spécifiques induisent la courbure et la formation de l'infection (première étape lors de la formation des nodules) (Simms., 2002). Dans l'interaction *Rhizobium*-plante, on observe un haut niveau de spécificité. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire, c'est à dire un échange de signaux flavonoïdes excrétés par la racine de la plante hôte. Chez les bactéries, les gènes de la nodulation (gène *nod*) sont induits par le signal flavonoïde, et cette induction mène à la production et à l'excrétion des signaux de nodulation, les facteurs Nod.

La structure de base des lipochitooligosaccharides est modifiée chez les différentes espèces de *Rhizobium*. Donc, la structure spécifique des facteurs Nod

produits par chaque espèce de *Rhizobium* sert comme signal permettant la reconnaissance de la présence de la bactérie par sa plante hôte. (Anonyme f, 2004).

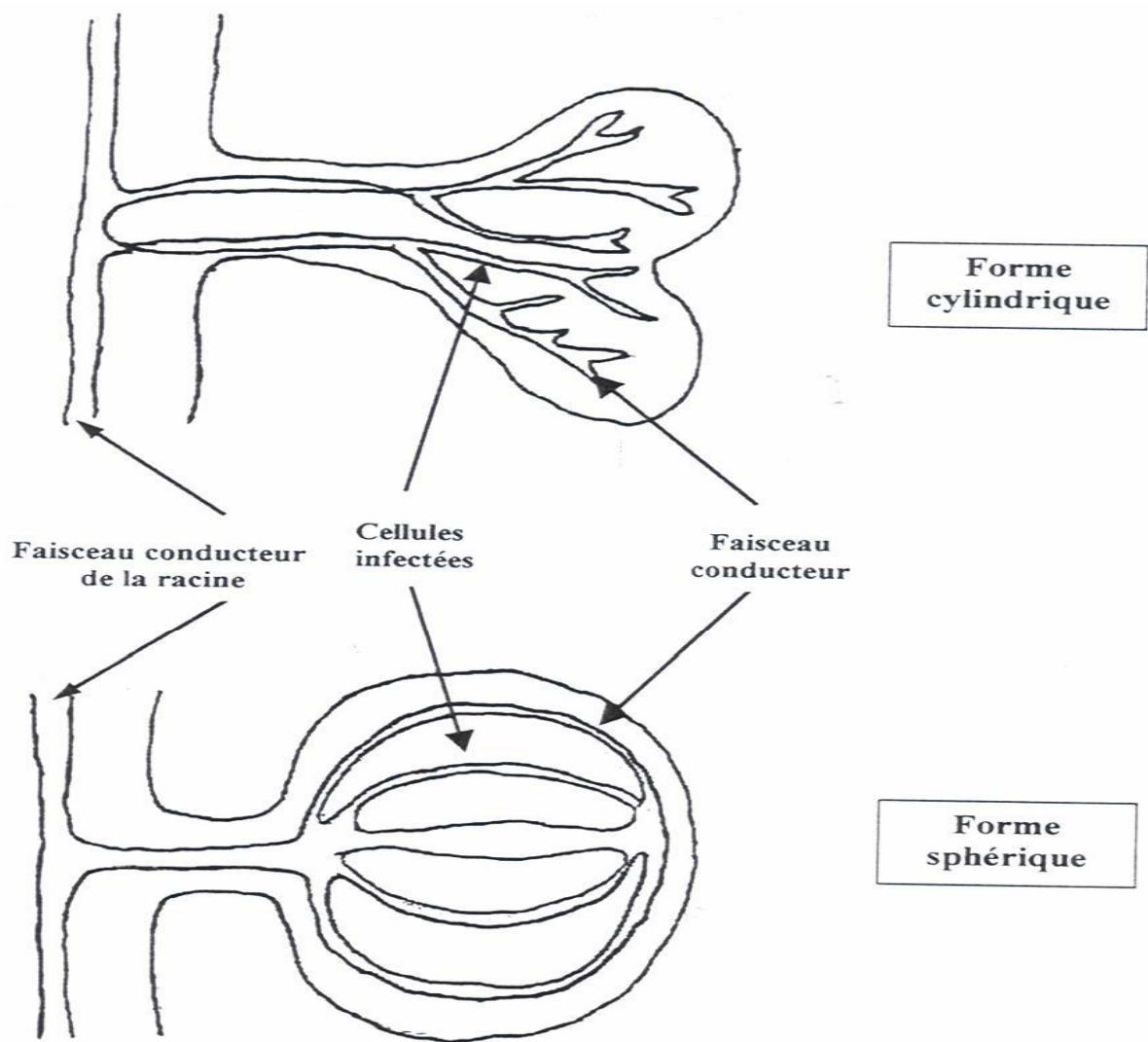


Figure 5 Les deux formes que prend le nodule (Richter., 1993)

6- Les gènes de la nodulation

Les différents *Rhizobium* utilisent des mécanismes génétiques et moléculaires similaires pour reconnaître et infecter les légumineuses- hôtes : Des gènes Nod qui sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, la reconnaissance de signaux symbiotiques de la plante et la production par la bactérie de signaux ; et les facteurs Nod, provoquant de nombreuses réponses symbiotiques. (Richter., 1993).

-Les facteurs Nod

Les facteurs Nod produits par le partenaire bactérien, ont une très grande activité biologique et induisent à de très faibles concentrations la mise en route d'une partie du programme symbiotique de l'hôte. La transcription de gènes de nodulines précoces, des divisions cellulaires sont à l'origine de l'organogenèse des nodosités. (Denarié., 2000). Les facteurs Nod sont essentiels pour la capacité des *rhizobia* à induire les nodules racinaires (Spaink., 2000). Ce sont des lipochitooligosaccharides (figure 6) spécifiques qui affectent les plantes de diverses façons et le premier effet visible est le recourbement des poiles absorbants (Trevaskis et *al.*, 2002).

La production de facteurs Nod dans la bactérie est contrôlée par le degré d'expression de nodulation du gène. (Schultze et Kondorosi., 1998).

7- Processus de fixation de l'azote

Les légumineuses ont une relation symbiotique avec les *Rhizobium* afin de convertir l'azote atmosphérique (N_2) en une forme adaptée aux plantes. Ce processus est appelé fixation azotée. (Adjei et *al*, 2002).

Ce processus comporte trois particularités :

- une sensibilité élevée de la nitrogénase vis-à-vis de l'oxygène.

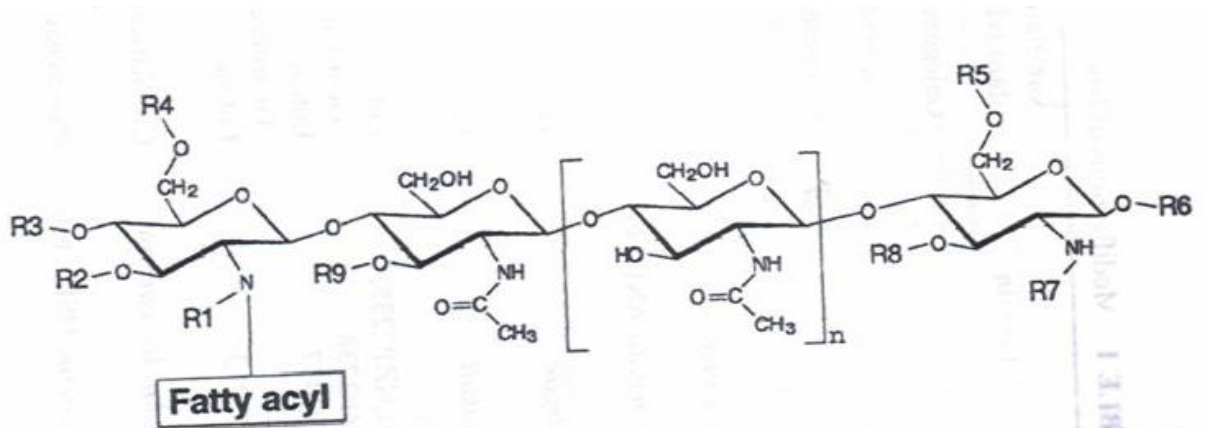


Figure 6 Structure générale d'un facteur Nod produit par les rhizobia (Spaink., 2000)

- une assez grande consommation d'énergie, de 16 ATP au moins par molécule de N₂ fixée.
- une production simultanée d'hydrogène moléculaire, qui dans le cas de la fixation symbiotique de *Rhizobium* dissipe approximativement la moitié des électrons parvenus jusqu'à la nitrogénase.

Ces trois caractéristiques sont peut-être les raisons qui expliquent pourquoi la fixation de l'azote est réalisée chez si peu d'organismes au cours de l'évolution. (Richter., 1993).

- La réaction globale de la fixation de l'azote

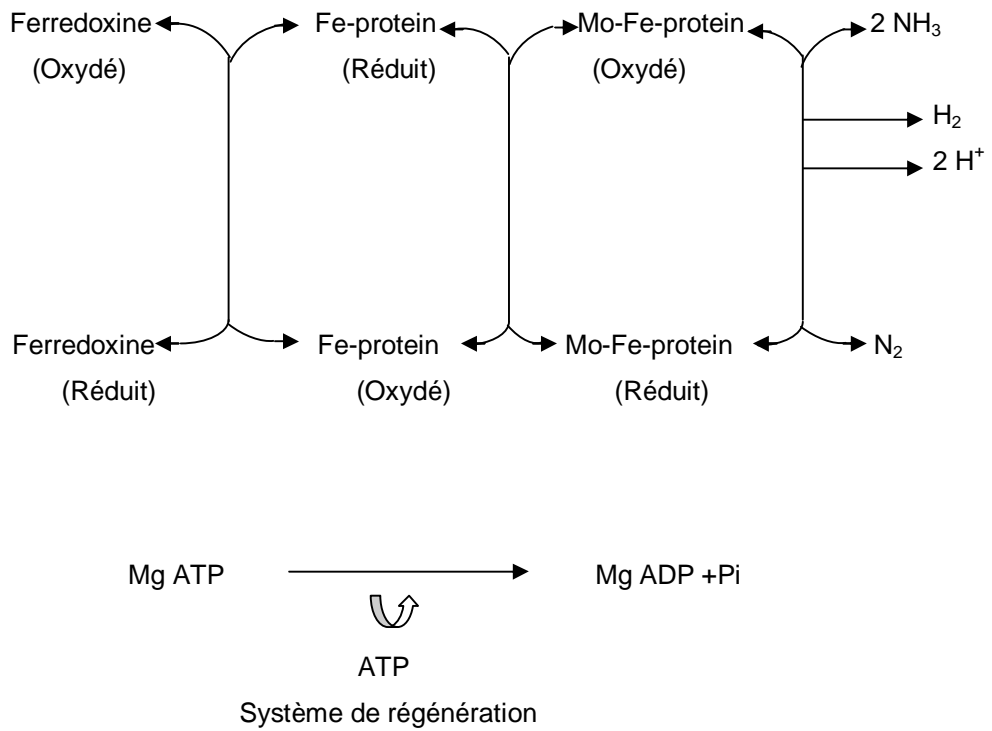
La réaction chimique connue sous le nom de fixation biologique de l'azote prend place dans les nodules. Bien que le processus implique un grand nombre de réactions biochimiques, il peut être résumé en une simple réaction (Figure 7). L'équation indique qu'une molécule d'azote atmosphérique N₂ se combine avec des protons H⁺ pour former deux (2) molécules d'ammoniaque (2 NH₃) et deux molécules d'hydrogène en gaz (2 H₂). Cette réaction est menée par une enzyme, la nitrogénase.

Les 16 molécules d'ATP représentent l'énergie minimale demandée afin que la réaction prenne place. La source de cette énergie requise pour la fixation biologique de l'azote est l'énergie solaire via le processus de photosynthèse.

L'ammoniaque (NH₃) formé est converti en acide aminé tel que la glutamine. L'azote des acides aminés peut être utilisé par la plante afin de synthétiser des protéines pour sa croissance et son développement. (Sprent., 1984)

8- Les gènes de la fixation

La génétique moléculaire de *Rhizobium* a également permis d'identifier les gènes majeurs (*nif* et *fix*) impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote et dans sa régulation par l'oxygène.



Réaction globale:

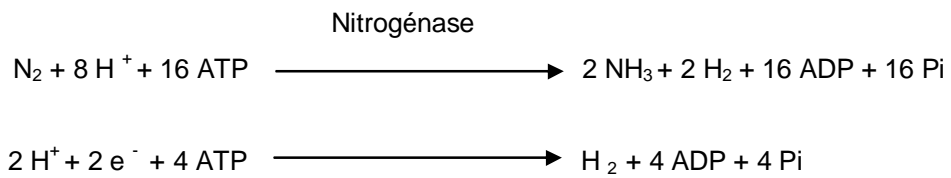


Figure 7 Réactions catalysées par la nitrogénase dans les bactéroïdes.
(Spren., 1984)

D'une manière schématique, la transcription des gènes de la fixation de l'azote (gène *nif*) n'a lieu que dans des conditions physiologiques bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries concernées.

Les signaux majeurs intervenant dans cette régulation sont l'ammoniaque et l'oxygène. L'expression des gènes (*nif*) dépend, dans la majorité des cas, d'un activateur de la transcription appelé NifA et d'un facteur sigma spécifique, produit de *rpoN*, qui reconnaît des promoteurs particuliers en amont de l'opéron *nif* (Elmerich., 2003).

9- Régulation de la fixation de l'azote

L'azote ammoniacal joue probablement un rôle important ; en sa présence, la synthèse de la nitrogénase n'a pas lieu (répression). Elle a lieu, après une période de latence, lorsque l'azote ammoniacal a été utilisé dans la cellule (dérépression). Des gènes spécifiques du microsymbiote sont responsables de ces régulations. (Richter., 1993).

10- La nitrogénase

La conversion biologique de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée par une enzyme, la nitrogénase, système que l'on trouve chez les bactéries fixatrices d'azote (Rees et *al.*, 1993).

Ce n'est que lorsque la symbiose est mise en place que la nitrogénase apparaît dans les bactéroïdes et la leghémoglobine dans les nodosités (Anonyme g, 2004).

La nitrogénase est constituée de deux protéines : la Fe-protéine et la Fe-Mo-protéine, qui, ensemble, véhiculent l'ATP (Rees et *al.*, 1993).

L'information génétique pour la synthèse de la nitrogénase est portée par le *Rhizobium*, mais elle ne s'exprime pas chez la bactérie libre. Les gènes ne seraient activés que par certains composés synthétisés par la plante hôte et présents dans le micro environnement cellulaire des nodosités (Anonyme g, 2004).

11- Rôle de la leghémoglobine

La leghémoglobine est la noduline la plus abondante ; elle a pour fonction de transporter l'oxygène facilitant ainsi la diffusion de l'O₂ aux bactéroïdes (Sanchez et al., 1991).

Le problème majeur des nodules est de disposer d'assez d'oxygène afin d'approvisionner les bactéroïdes pour la synthèse de l'ATP sans pour cela provoquer une inactivation de la nitrogénase ; il est donc demandé un flux élevé d'oxygène à une basse concentration. La propriété de lier l'oxygène, propre à la légghémoglobine, permet de réunir cette condition. (Spren., 1984).

III- Contraintes environnementales liées à la fixation

Le processus de fixation de l'azote est influencé par plusieurs facteurs :

- La température du sol où l'on a démontré que la température optimale se situait entre 35°C à 45°C. (Evers., 2003)
- Le pH du sol affecte également les deux partenaires de la symbiose, en général un pH de 6.0 à 7.0 fournit un environnement optimal à l'assimilation pour les légumineuses (Gunasekaran et Balachandar., 2000). L'effet du pH sur la survie des *rhizobia* dans le sol a été étudié par Swaminathan et Prasad (1982) (tableau 2).
- La fertilité du sol affecte la fixation azotée où un excès de nitrates dans le

Tableau 2 La survie des rhizobium a pH varies

pH	Population (X 10 ⁶ /g)				
	20 ^{eme} jour	40 ^{eme} jour	80 ^{eme} jour	100 ^{eme} jour	moyenne
7	24	19	14	10	16.75
8	20	29	18	12	19.75
9	23	34	33	13	25.75
10	23	30	17.5	8	22.12

(Swaminathan and Prasad., 1982)

Tableau 3 Tableau schématique de quelques effets de l'environnement sur la physiologie des nodules fixant l'azote

facteur	Effets
Température	Sur la fixation de l'azote et/ou son assimilation. diffusion des gaz
Stress hydrique	effet direct sur les nodules incluant une réduction de la porosité affectant l'assimilation de l'O ₂
Salinité	réduction de l'activité de la nitrogénase l'inhibition de la synthèse de la leghémoglobine
L'azote combine	inhibition par les nitrites formes par la réduction des nitrates dans les bacteroides.

(Sprent., 1984)

sol, ou une déficience de quelques nutriments essentiels vont limiter la croissance et le développement de la plante (Anonyme h., 2004).

- L'effet des nitrates se traduit par une action inhibitrice empêchant l'induction des nodosités, leur développement et la synthèse de la nitrogénase (Dilworth, 1966)
- La présence d'azote combiné (organique ou minéral) dans le milieu inhibe fortement la fixation ce qui prouve que les composés azotés sont situés sur la voie métabolique qui mène de l'azote élémentaire gazeux aux formes organiques combinées (Mazliak., 1981).
- Un excès d'humidité ou une sécheresse prolongée affecte négativement la nodulation et la fixation azotée (Gunasekaran et al., 2000). Venkateswaralu (1997) a rapporté que la population rhizobienne dans le sol est très faible en saison sèche mais qu'elle retourne à la normale dès les premières pluies.
- La salinité est un facteur affectant la fixation car généralement elle n'est pas appréciée des nodules quoique à de très basses concentrations de sel (25 mM NaCl) ; les légumineuses peuvent compenser par la production de nodules plus large (Sprent., 1984).

Le tableau 3 résume l'effet de ces différents facteurs.

IV- L'inoculation

1- La pratique de l'inoculation

L'inoculation est la pratique qui consiste à introduire les souches de *rhizobia* ou *Bradyrhizobia* dans l'écosystème plante-sol ; un inoculum étant une formulation des souches en porteur solide ou liquide (Baraibar., 2000).

2- Historique

Il y a plus de 100 ans que des recherches ont été entreprises en vue d'améliorer la croissance des plantes. Les chercheurs se sont surtout attachés à élucider les questions de l'apport et la disponibilité d'azote et de phosphate, qui sont les éléments nutritifs les plus indispensables à la croissance des plantes.

Les premiers inoculums, constitués de bactéries telluriques, qui, induits dans les légumineuses, apportaient à celles-ci de l'azote, ont été commercialisés en 1898. Ces bactéries sont encore utilisées aujourd'hui et font l'objet d'importants travaux de recherche (Anonyme i, 2001)

3-Les buts de l'inoculum

Les inoculums sont utilisés pour :

- Stimuler les racines et améliorer la croissance.
- Faire germer les racines.
- Apporter des facteurs de croissance et des éléments nutritifs.
- Lutter contre les maladies et les prévenir.
- Améliorer ou rétablir la microflore du sol. (Anonyme i, 2001)

4- Mode d'action d'un inoculum

Les inoculums peuvent agir de plusieurs manières :

a) action directe : les microorganismes infestent les poils des racelles des plantes et font gonfler les cellules racinaires, qui forment des nodosités. A l'intérieur de ces nodosités, les bactéries convertissent l'azote de l'air en une forme que la plante peut utiliser comme nutriment.

b) Action indirecte : les inoculums convertissent des formes minérales de

phosphate tellurique et autres éléments nutritifs moins disponibles en des formes immédiatement disponibles pour les plantes.

c) Protection : les inoculums offrent une protection contre les agents pathogènes (Anonyme i, 2001).

5- Nécessité d'une inoculation

L'inoculation des légumineuses est un moyen de s'assurer que la souche de *rhizobia* la plus adaptée, et en nombre suffisant, soit présente dans la rhizosphère et permette une nodulation abondante alliée à une bonne fixation d'azote. Malgré les difficultés qui peuvent survenir pendant l'inoculation des légumineuses, sa pratique est simple. Le but de cette manœuvre est d'assurer une fixation élevée d'azote (Date., 2000).

6- Cas de déficience en *rhizobia*

Il est nécessaire d'inoculer les graines ou le sol avec des bactéries hautement efficaces dans les cas suivants :

- sols qui n'ont pas été des hôtes pour les légumineuses (sols vierges).
- un sol qui n'a pas reçu la légumineuse spécifique depuis plus de 4 ans.
- Un pH du sol supérieur à 8.5 (Un pH de sol inférieur à 5.8 doit être ajusté en ajoutant de la chaux avant l'inoculation).
- Matière organique du sol inférieure à 1%.
- Sécheresse ou inondation.
- Erosion du sol.
- Utilisation des traitements et produits chimiques.
- Température des couches de sols dépassant 45°C. (Anonyme j .,2004)

7- Sélection d'une souche de *Rhizobium* pour la production d'inoculum

Une sélection très étendue doit être faite afin d'identifier l'inoculum idéal pour une légumineuse.

Les critères de sélections varient selon le type de sol : acide, alcalin, salin, avec des nitrates, riche en matière organique, ou contaminé avec des métaux lourds (Kannaiyan et *al.*, 2000)

-Caractères physiologiques des *Rhizobia*

7-1-Résistance à la température et tolérance au pH

La température optimale pour la croissance des *rhizobia* se situe entre 28⁰C et 31⁰C, la température maximale de croissance des *Rhizobium* est entre 32⁰ C et 47⁰ C. (Nour et *al*; 1995). Le pH est un facteur limitant la fixation symbiotique (Graham et Vance., 2003).

7-2-Résistance à la salinité

La nodulation est très sensible au stress salin ; de ce fait la production d'inoculum capable de donner des résultats doit passer par la sélection de souches tolérantes au sel. (Jebara et *al.*, 2001).

7-3-Résistance aux concentrations élevées d'azote

Des études ont démontré que l'ajout d'azote à 2 mM a pour effet l'inhibition de la nodulation et la fixation de l'azote (Dovel et *al.*, 1993). La sélection des *rhizobia* doit donc tenir compte de la tolérance de celles-ci aux concentrations élevées et basses en azote dans le sol (Kyei-Boahen et *al.* , 2002).

7-4-Résistance aux antibiotiques

L'un des marqueurs importants pour la sélection des bactéries réside dans la résistance aux antibiotiques (Smith ., 1996). Afin d'utiliser les antibiotiques comme un marqueur de sélection certains pré requis doivent être réunis :

- a) les microorganismes doivent se prêter à la culture.
- b) la résistance doit être stable.
- c) la résistance doit être rapide.

La méthode utilisée est la culture de bactérie sur milieu contenant différentes concentrations d'antibiotiques afin de sélectionner les souches résistantes spontanées (OECD., 2004) **(1)**

8- Facteurs affectant la réponse à l'inoculation

Comme la fixation de l'azote est un processus symbiotique, des facteurs environnementaux affectant la plante hôte ainsi que les *rhizobia* doivent être optimaux pour l'établissement d'une symbiose effective (Somasegaran et Hoben., 1994).

8-1-La profondeur du placement de l'inoculum

La profondeur est un facteur important qui peut influencer l'inoculation du sol. Il est bien établi que le mouvement des *rhizobia* dans le sol est limité (Madsen et Alexander, 1982)

L'application de l'inoculum aux graines à la profondeur du semis a pour résultat une prédominance de la nodulation dans la partie supérieure de la racine.

(1): OECD: Organisation for Economic Co- operation and Development

Les expériences de McDermott et Graham (1989), Wolyn et *al* (1989) ainsi que Vikman et Vessey (1992) ont montré que les nodules des racines latérales sont plus actifs durant la formation des graines et peuvent fournir une fixation significative de l'azote durant la phase de reproduction de la plante, donc la stratégie de l'inoculation est de positionner l'inoculum de façon à ce qu'il soit intercepté par les racines latérales (Kyei-Boahan et *al.*, 2002).

8-2-Date de plantation

Les graines inoculées doivent être plantées le plus vite possible après traitement (12 heures ou moins) afin que les cellules bactériennes restent humides et survivent assez longtemps pour infecter les racines des légumineuses (Beuerlein., 2003)

8-3-Sécheresse et humidité

Une période très sèche ou très humide suivant la plantation a pour effet de diminuer les performances de l'inoculum. (Beuerlein., 2003)

8-4-L'utilisation d'un fongicide ou d'un herbicide

Lors de l'application d'un fongicide ou d'un herbicide sur les graines il faut s'assurer qu'il soit sec avant l'application de l'inoculum, mais le plus souvent les traitements antifongiques ne sont pas mélangés avec l'inoculum. (Beuerlein., 2003).

8-5-Exposition aux rayons solaires et au séchage

Les graines semées peuvent être exposées aux rayons du soleil (rayon UV) après l'inoculation et avant d'être plantées, et les graines disséminées peuvent l'être avant et après plantation (Somasegaran et Hoben ., 1994).

8-6-Le pH du sol

Il s'agit d'un important facteur environnemental. Plusieurs légumineuses répondent au chaulage quand elles poussent sur sol acides (poussent et nodulent bien dans les sols à pH 5.6 - 6.8). Pour les *rhizobia*, le pH optimal est variable entre 5.8 et 7.2 en fonction des espèces de *Rhizobium* (Somasegaran et Hoben ., 1994).

8-7-Un manque de Phosphore

Cette carence va limiter sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote. Les recherches sélectionnant des *rhizobia* effectifs aux champs doivent prendre en considération une fertilisation phosphatée adéquate (Somasegaran et Hoben ., 1994). Le manque de phosphore dans le sol a également un effet inhibiteur sur la nodulation et la fixation de N₂.

8-8-L'impact de la population rhizobial autochtone sur l'inoculation

Quand la population de *rhizobia* autochtone spécifique à une légumineuse précise est faible (moins de 50 bactéries par gramme de sol) l'introduction de nouvelles souches par l'inoculation des graines doit normalement réussir. Par contre, l'inoculation dans les sols où les souches rhizobiennes sont fortement présentes (plus de 10³ bactéries/g de sol) est difficile et souvent sans succès (Thies et al. 1991 ; Brochwell et al. 1995).

8-9-Influence du sol sur l'inoculation

La capacité des souches inoculées à coloniser les sols en quantité suffisante afin de fournir une nodulation efficiente est assez dépendante du sol. Ainsi une minutieuse compréhension de la présence de population du sol peut autoriser des recommandations pour la considération du besoin en inoculation des légumineuses (Slattery and Pearce, 2002).

Une faible persistance rhizobienne indique un besoin d'inoculer les légumineuses quand le sol est acide. A l'inverse, des sols alcalins où normalement il y a une grande population de *rhizobia* autochtones et l'inoculation des légumineuses n'est pas nécessaire (Slattery and Pearce, 2002).

8-10-Molybdène

Le molybdène est un micronutriment essentiel à toutes les légumineuses qui ont en besoin pour la formation et le fonctionnement de la nitrogénase. Les sols pauvres en molybdène produisent de faibles quantités de nodules inefficients (Somasegaran et Hoben, 1994).

9- Critères de sélection d'un inoculum

Basés sur les suggestions de Brockwell (1982) et de Kannaiyan et *al.*, (2000), les caractères suivants sont considérés comme souhaitables pour une souche afin d'être utilisée comme un inoculum :

- a) capacité à noduler et à fixer l'azote.
- b) capacité à former des nodules avec une population native de *Rhizobium* présente dans le sol.
- c) capacité à fixer l'azote malgré les mauvaises conditions environnementales.
- d) capacité à former des nodules et à fixer l'azote en présence de nitrates dans le sol.

- e) capacité à bien pousser dans un milieu artificiel, sur un support d'inoculum et dans le sol.
- f) capacité à persister dans le sol, particulièrement pour les légumineuses annuelles.
- g) capacité à migrer du site d'inoculation.
- h) capacité à coloniser le sol en l'absence de légumineuse hôte.
- i) capacité à tolérer les stress environnementaux.

- j) capacité à fixer l'azote sur un large spectre de génotypes.
- k) être stable génétiquement.
- l) être compatible avec des fertilisants chimiques.

9-1-Caractéristiques d'un inoculum

Un bon inoculum doit être préparé avec des souches rhizobiennes d'une grande efficacité en conditions de champs. Elles doivent avoir une grande spécificité afin d'être compétitives pour la formation de nodules et être aptes à promouvoir les performances de l'hôte.

Les souches rhizobiennes doivent survivre dans l'inoculum et maintenir ces propriétés durant la période de stockage. Elles doivent être tolérantes aux facteurs de stress tels : l'acidité, la dessiccation, température élevée et des pesticides chimiques. (Baraibar., 2000).

10-Technologies de la production d'inoculum

10-1-Les étapes de la production d'inoculum

La technologie de production d'inoculum implique :

- a) La sélection d'une souche rhizobienne compatible et effective avec la légumineuse.
- b) Une densité élevée de la souche sélectionnée.
- c) L'incorporation de la culture rhizobienne liquide dans un support d'inoculum pour emballage et distribution.
- d) L'enrobage des graines de légumineuses avec les supports d'inoculum ou implanter directement l'inoculum dans le sol. (Roughley., 1970 ; Halliday 1981).

Dans la fabrication d'inoculum, une période de « séchage » (maturation) après addition d'un bouillon de culture au support améliore la qualité de production (Kannaiyan et al., 2000). Après la période de maturation, l'inoculum est

empaqueté dans des sachets en polyéthylène. L'inoculum doit être incubé à température de 25°C à 30°C.

Durant cette période, les bactéries vont se multiplier et les sachets sont ensuite stockés dans une chambre froide entre 4°C-15°C jusqu'à utilisation (Kannaiyan et *al.*, 2000).

10-2-Le succès d'une inoculation

Le succès d'une inoculation est souvent lié à différents facteurs : conditions environnementales, le nombre de cellules infectives, la présence de souches indigènes compétitives et la méthode d'inoculation (Brockwell et *al.* ; 1995).

Des études ont montré que la majorité des *rhizobia* appliquée aux graines via l'inoculation conventionnelle, meurent avant le semis ou peu après un placement dans le sol. Ceci peut être dû à une exposition à un traitement chimique, à la présence de toxines, à la déshydratation ou à une chaleur excessive (Brockweel et *al.*, 1980 ; Roughley et *al.* 1993).

10-3-Méthodes d'inoculation des semis

Les méthodes d'inoculation peuvent avoir une grande influence sur le taux de fixation d'azote. (Montanez., 2000). Il a été démontré que les nodules de la partie inférieure des racines peuvent fixer plus d'azote que ceux de la partie supérieure et contribuent à l'apport d'azote fixé par la plante.

Deux types d'inoculation sont utilisées: l'application aux graines et l'application au sol.

10-3-1-L'application aux graines (enrobage)

L'application de l'inoculum à la surface des graines avant le semis est la méthode traditionnelle de l'inoculation (Kannaiyan et *al.*, 2000). Cette méthode est

plus effective car elle permet la mobilité des *Rhizobium* dans la rhizosphère quand l'inoculum est mixé avec de l'eau (Rupela et Saxena., 1987; Beck et al., 1993).

10-3-2-L'application au sol (liquide)

L'inoculum appliqué au sol est réalisé dans le sillon au moment du semis avec de l'herbicide ou de l'insecticide. Ce type d'inoculum est plus facile à utiliser que mais son coût est plus élevé. (Kannaiyan et al., 2000).

11-Le support d'inoculum

Le terme de support est utilisé pour tout milieu où les microorganismes peuvent croître. (Kannaiyan et al., 2000) .Un support doit :

- avoir une grande capacité de rétention d'eau.
- être non toxique pour les *rhizobia*.
- être facilement stérilisable par autoclavage.
- être peu coûteux et disponible.
- fournir une bonne adhésion aux graines.
- avoir une capacité d'échange d'anions et/ou de cations.
- être compatible avec toutes les espèces de *Rhizobium* et garder une population standard de 3 à 6 mois (Smith., 1996 ; Burton., 1981).

12-Différents types de support d'inoculum

Le support d'un bon inoculum est une substance solide, semi-solide ou liquide qui peut contenir un certain nombre de cellules bactériennes durant un temps donné (khavazi et Redjali., 2000).

12-1-L'inoculum solide

L'inoculum solide est le plus utilisé pour l'inoculation des légumineuses (Beck et *al.*, 1993). Deux types de supports sont le plus souvent utilisés:

12-1-1-La tourbe

De la plupart des formes d'inoculums disponibles, celle de la tourbe est la forme la plus populaire : elle n'est pas difficile à obtenir et à produire et elle maintient une grande concentration de bactéries viables. (Graham-Weiss et *al.*, 1987).

12-1-2- La vermiculite

Sa nature non organique fait qu'elle est facilement stérilisable sans risque de production de toxines ou causer de nouveaux changements structuraux.

La structure multi-lamélaire de la vermiculite fournit une aération supérieure et de l'espace pour une prolifération microbienne (Grahams-weiss et *al.*, 1987). Ce support a été choisi car, microbiologiquement pur (contient $> 10^9$ de *Rhizobium* par gramme et délivre $> 10^5$ *rhizobia* par graine) et possède une grande propriété à couvrir les graines (Graham-Weiss et *al.*, 1987).

Le tableau 4 représente une comparaison entre les deux supports d'inoculums.

12-2-L'inoculum liquide

Afin de développer un alternatif à l'inoculum à base de tourbe, les recherches se sont concentrées sur l'inoculum liquide car l'inoculum à base de tourbe est trop encombrant pour une application en champ sur une large échelle et tend à boucher les semoirs (Singleton et *al.*, 2002).

Tableau 4 Comparaison entre l'inoculum a base de tourbe et celui a base de vermiculite

Propriétés	vermiculite	tourbe
pH	Approximativement neutre	Nécessite une neutralisation avant utilisation comme support
Capacité de tampon	bon	faible
Toxicité	Inorganique : ne produit pas de toxines ou ne subit pas de changement structuraux après stérilisation	Organique : peut contenir certains inhibiteurs aux souches bactériennes, peut produire des substances toxiques et subit des changements structuraux après stérilisation
Contamination	Exfolie à de très hautes températures qui vont tuer les micro-organismes, sa nature minérale ne supportera pas une croissance microbienne	Contient usuellement des contaminants pas connus apte a pousser sur le support organique
Structure physique	Multilamellaire ; assure une bonne aération une équilibration rapide de la température et de l'espace pour une croissance microbienne durant la fermentation	La structure peut changer à de hautes températures ou après exposition à une irradiation aux rayons gamma
Adhérence aux graines	Il s'écaille : bonne propriétés d'adhérence pour couvrir les graines	En poudre ou en granule ; souvent nécessite un adhésif pour adhérer aux graines

(**Graham-Weiss ; Bennett ; Paau ; 1987**)

Tableau 5 Concentration pour préparation d'adhésifs utilisables pour l'inoculation
(% en poids par volume d'eau)

Adhésif	Gomme arabique	Methycellulose
Simple inoculation	15%	2%
Enrobage	40%	3 a 4%

(Anonyme,2004)

13-L'adhérence

La ténacité est la caractéristique la plus importante pour un adhésif afin d'éviter la perte d'inoculum lors du passage des graines dans les semoirs (Kannaiyan et *al.*, 2000). Le simple mélange d'inoculum et de semences sèches, ou même humidifiées ne permet pas une bonne adhérence sur les graines.

Pour réaliser l'inoculation ou l'enrobage des semences, il est souhaitable d'utiliser un adhésif pour « coller » le *Rhizobium*, mais aussi pour l'alimenter jusqu'à ce qu'il infecte la plantule. Pour une simple inoculation, de nombreux adhésifs sont efficaces tel que l'eau sucrée (10 à 25 %) ; l'amidon (de blé, de maïs, ou de riz dans les mêmes proportions que l'inoculum) , le miel (10%) ; l'huile de table (10 ml par kg de semence), la gomme arabique et la méthycellulose. Ces deux dernières sont les plus recommandées (Hoben et *al.*, 1991) (Tableau 5).

14-Contrôle de qualité de l'inoculum

La qualité des inoculums à base de *Rhizobium* est très importante pour assurer une bonne performance au champ. Basiquement, la qualité veut dire la présence du bon type de microorganisme dans sa forme active (Kannaiyan., 2000) .

15-Stockage de l'inoculum

La population rhizobienne tend à diminuer avec le temps même avec de très bonnes conditions de stockage (Brick ., 2002).

Le stockage optimum d'un inoculum doit se faire en milieu réfrigéré. Un stockage de courte durée sous une température inférieure à 33°C est acceptable.

Toutefois, une exposition aux UV, aux rayons solaires et à une forte chaleur détruit les bactéries.

16-La co-inoculation

16-1- La co-inoculation avec *Azospirillum*

Les effets positifs à la suite d'une co-inoculation avec des *Rhizobium* en conditions de champs ont été rapportés pour plusieurs légumineuses (Groppa et al., 1998).

Les principaux effets d'*Azospirillum* sont de rendre meilleur le développement racinaire et l'augmentation ultérieure du taux d'absorption d'eau et de minéraux (Hamaoui et al., 2001).

16-2-L'inoculation avec des bactéries solubilisant le phosphate

La plupart des sols agricoles contiennent une large réserve de phosphate dont une part considérable est accumulée lors d'application régulière de fertilisants chimiques (Igual. et al., 2001).

Dans la rhizosphère, il existe des bactéries bénéfiques à la croissance de la plante (Glick., 1995). Ce type de bactéries est désigné sous le nom de PGPR (Plante Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper.,Schroth.,1978) dont les bactéries solubilisant le phosphate (PSB) fixent l'azote en relation symbiotique avec les légumineuses .

Certains auteurs (Alagawadi et Gaur., 1992 ; Belimov., et al 1995) ont démontré que la croissance des plantes peut être augmentée par une double inoculation avec des PSB et *Azospirillum* .

Matériel Et Méthode

I- Isolement des bactéries à partir des nodules

1- Matériel végétal

Durant notre travail nous avons utilisés cinq variétés de pois chiche (*Cicer arietinum L.*) dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 6:

Tableau 6 : Caractéristiques générales des différentes variétés de pois chiche utilisées (ITGC.2004)

Génotype	Origine	Cycle végétatif	Grosseur de la graine	Poids de 100 grains (en Gr)	Comportement en sec	Tolérance aux maladies
X88TH301	ICARDA	Semi-tardive	Grosse	41.83	Tolérante	*
FliP85-55	ICARDA	Semi-tardive	Grosse	38	Tolérante	Résistante
ILC482	Turquie	Précoce	Petite	30	Néant	**
ILC3279	EX URSS	Tardive	Petite	26	Tolérante	Résistante
FliP84-92	ICARDA	Semi-tardive	Moyenne	38	Néant	***

* moyennement résistante à sensible à l'antracnose, tolérance aux boytris, rouilles, root-rot, oïdiums et orobanche.

** moyennement résistante à l'antracnose, mais résistante aux autres maladies (fusariose, botrytis, rouilles root-rot, oïdium, orobanche).

*** résistante à l'antracnose et moyennement sensible à sensible a la fusariose.

ICARDA: international center for agricultural research in dry areas.

2- Collecte des sols

Les échantillons de sols ont été collectés sur 13 sites différents localisés dans une zone humide du Nord-Est Algérien (deux sites à Jijel), dans des zones semi-arides de l'Est (deux sites à Oum el Bouaghi, deux sites à Khenchela et deux sites à Batna) et de l'Ouest Algérien (Ain Timouchent) ainsi qu'en zone aride dans le Sud –Est (deux sites à Biskra) ainsi que deux sites à Constantine. (Figure 8)

3- Mode de culture

La culture des plantes a été réalisée en pots de 1 kg à raison de 3 graines par pot. Les semis de pois chiche ont été sélectionnés selon une taille identique et stérilisés dans un premier temps 10 à 15 secondes dans l'éthanol absolu puis 3 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium 3 % (V/V), enfin rincés 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Au dernier rinçage, les graines sont laissées gonfler pendant 2 heures.

La pré-germination a été réalisée dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre humidifié avec de l'eau distillée stérile, et incubé à 22°C pendant 3 jours à l'obscurité jusqu'à apparition de radicules (Içgen et *al*, 2002)

4- Collecte des nodules

La collecte des nodules a été réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck et *al* (1993). Une creusée d'environ 15 cm est réalisée autour de la plante pour extraire son appareil racinaire, débarrassé manuellement de la terre liée sans endommager les nodules.

Au laboratoire, les racines sont rincées à l'eau courante ; les nodules sont ensuite détachés à 1-2 cm de leur point d'attache.

5- Conservation des nodules

Les nodules obtenus sont rincés à l'eau distillée stérile puis séchés avec du papier filtre stérile et conservés au réfrigérateur à 4°C pour un usage immédiat (jusqu'à 48 h).

Pour une conservation de longue durée il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de calcium (CaCl_2) anhydre qui permet une longue conservation (6 à 12 mois) (Vincent., 1970).

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre ; chacun est rempli au $\frac{3}{4}$ de son volume, par du CaCl_2 anhydre recouvert d'une couche de coton et est identifié par une étiquette de façon à mettre en évidence :

- Le nom de la légumineuse (genre et espèce).
- Le lieu de prélèvement.
- La date de prélèvement (figure 9).

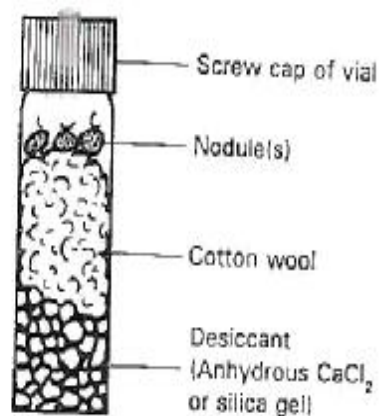


Figure 9 Conservation des nodules (Vincent, 1970)

6-Isolement des *rhizobia* à partir des nodules

Les différentes étapes d'isolement des *Rhizobium* sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1985, 1994) et Beck et *al.*(1993).

6-1 - Stérilisation des nodules

Les nodules intacts sont immergés 5 à 10 secondes dans de l'éthanol à 95° ; ils sont ensuite transférés immédiatement dans une solution à 3% (v/v) de peroxyde d'hydrogène pendant 2 à 4 minutes puis rincés dans cinq bains successifs d'eau distillée stérile.

6-2- L'isolement

Dans une boîte de Pétri stérile, une goutte d'eau stérile est déposée. Les nodules stériles sont déposés séparément dans la goutte d'eau puis écrasés avec une pince stérile à bout émoussé. Le broyat obtenu à partir de chaque nodule écrasé sera ensemencé sur boîte de Pétri (YMA + rouge Congo) selon la méthode des quatre cadrans (Figure 10) de façon à isoler de simples colonies (Figure 11), les boîtes de Pétri sont incubées 72 heures à 28 °C à l'obscurité (Vincent., 1970).

7- Principaux milieux de culture utilisés

Pour la caractérisation des isolats les milieux de cultures utilisés sont :

- 1-**YMB** (Yeast –Mannitol-Broth) (Vincent., 1970) (annexe 1)
- 2-**YMA** (Yeast –Mannitol –Agar) (Vincent., 1970) (annexe 1)
- 3-**YMA + Rouge Congo** (RC) (Vincent., 1970) (annexe 1)
- 4- **YMA+Bleu de Bromothymol** (BTB) (Somasegaran et Hoben.,1994) (annexe 1)
- 5- **Glucose-Peptone-Agar (GPA) +Pourpre de Bromocresol (BCP)** (Vincent , 1970) (annexe 1)

8-Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent., 1970 ; Somasegaran et Hoben., 1994)

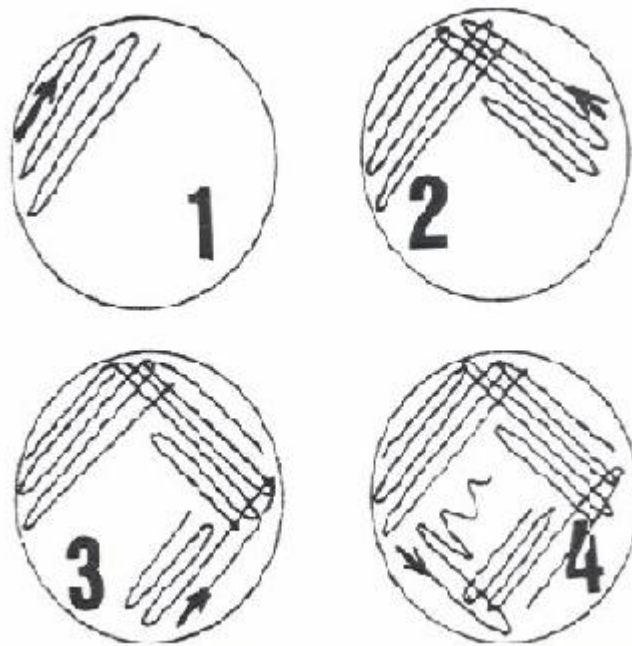


Figure 10 Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide en suivant les étapes dans l'ordre 1, 2, 3,4. (Quatre cadrans)
(Somasegaran et Hoben ; 1994)



Figure11 l'isolement des bactéries sur boite de Pétri **(Anonyme ; 2004)**

et comparaison avec une souche témoin de *Mesorhizobium ciceri* CP39 nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), souche provenant de l'ICARDA (Syrie)

Les caractères morphologiques recherchés sont :

- La forme, l'aspect et la couleur des colonies.
- La croissance sur milieu YMA au rouge Congo (les bactéries du genre *Rhizobium*, en général et *Mesorhizobium*, en particulier absorbent très peu de rouge Congo).
- La croissance sur milieu YMA+Bleu de Bromothymol pour la mise en évidence de la vitesse de croissance.
- La croissance sur milieu GPA au Pourpre Bromocrésol : pour la mise en évidence des souches bactériennes contaminantes. Les souches de *Rhizobium* n'acidifient pas ce milieu.

9- Conservation des isolats

La technique de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970). Le milieu YMA est tamponné avec 3 g/l de CaCO₃ et réparti dans des tubes.

Après autoclavage à 120° C pendant 20 minutes, les tubes sont inclinés. Après refroidissement, des stries de la souche à conserver sont effectuées sur la surface de la gélose inclinée. La technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4° C (Vincent., 1970).

10-Tests distinctifs entre le genre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Ce test permet une différenciation entre les deux genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*.

10-1-Précipitation du Calcium-Glycérophosphate

Les isolats sont cultivés sur un milieu contenant du glycérophosphate de calcium à 28° C pendant 3 jours (Hofer,1941)

Composition du milieu : g/l

KNO ₃	5 g
NaCl	3.8 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	1 g
KCl	0.16 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.6 g
Ca-Glycérophosphate	0.8 g
Mannitol	20 g
Agar	14 g
Eau distillée	1000 ml

11- Authentification des isolats (test de nodulation)

Tous les isolats doivent être testés et confirmés avant de les inoculer ; le test de nodulation est la capacité et l'aptitude des isolats à former des nodules avec la plante-hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées.

(Vincent., 1970, Beck et *al.*, 1993).

Ce test consiste en l'inoculation des graines de la plante hôte (*Cicer arietinum L.*) avec les différents isolats obtenus. Il est conduit dans des jarres de Léonard (Vincent, 1970).

11-1- Préparation et stérilisation du mélange sable-vermiculite

Le sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée.

La vermiculite est lavée au moins 10 fois puis séchée à l'air libre et enfin moulue dans un mixer .Le mélange (3/4 vermiculite, 1/4 sable) est stérilisé par autoclavage à 120° C pendant 20 mn, 3 fois espacées de 24 heures avant de remplir les jarres.

11-2-Préparation des jarres de Léonard

Des bouteilles d'eau minérale en plastiques sont coupées horizontalement en deux parties, ces bouteilles sont dans un premier temps lavées puis désinfectées sous la hôte à flux laminaire par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis dans de l'éthanol à 95%.

Les bouchons ont été percés au milieu, la partie supérieure de chaque jarre est remplie d'un mélange de sable et de vermiculite (partie 8-2) .Les deux parties de la bouteille sont reliées par un cordon préparé avec de la compresse correspondant au diamètre du bouchon. Les bouchons sont stérilisés dans un bêcher à l'autoclave à 120° C pendant 20 mn. (Figure 12)

11-3- Sélection et stérilisation des semis

Les graines de pois chiche (*Cicer arietinum L.*) ont été sélectionnées selon une taille identique et stérilisées selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) : les graines sont en premier lieu immergées 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95% puis immédiatement transférées dans une solution de H₂O₂ 5% (V/V) pendant 10 minutes. Les graines sont ensuite rincées 10 fois à l'eau stérile. Au dernier rinçage, elles sont laissées gonfler pendant deux heures.

Les graines sont mises à germer durant 4 à 8 jours, à l'obscurité dans des boites de Pétri sur papier filtre. (Minchin et al ., 1980).

Après l'apparition des radicelles, les semis pré-germés seront plantés dans les jarres de Léonard à raison de 3 semis par jarre. Afin d'éviter l'exposition des racines à la lumière (Sprent et Zaharam., 1988) la partie supérieure de la jarre (qui

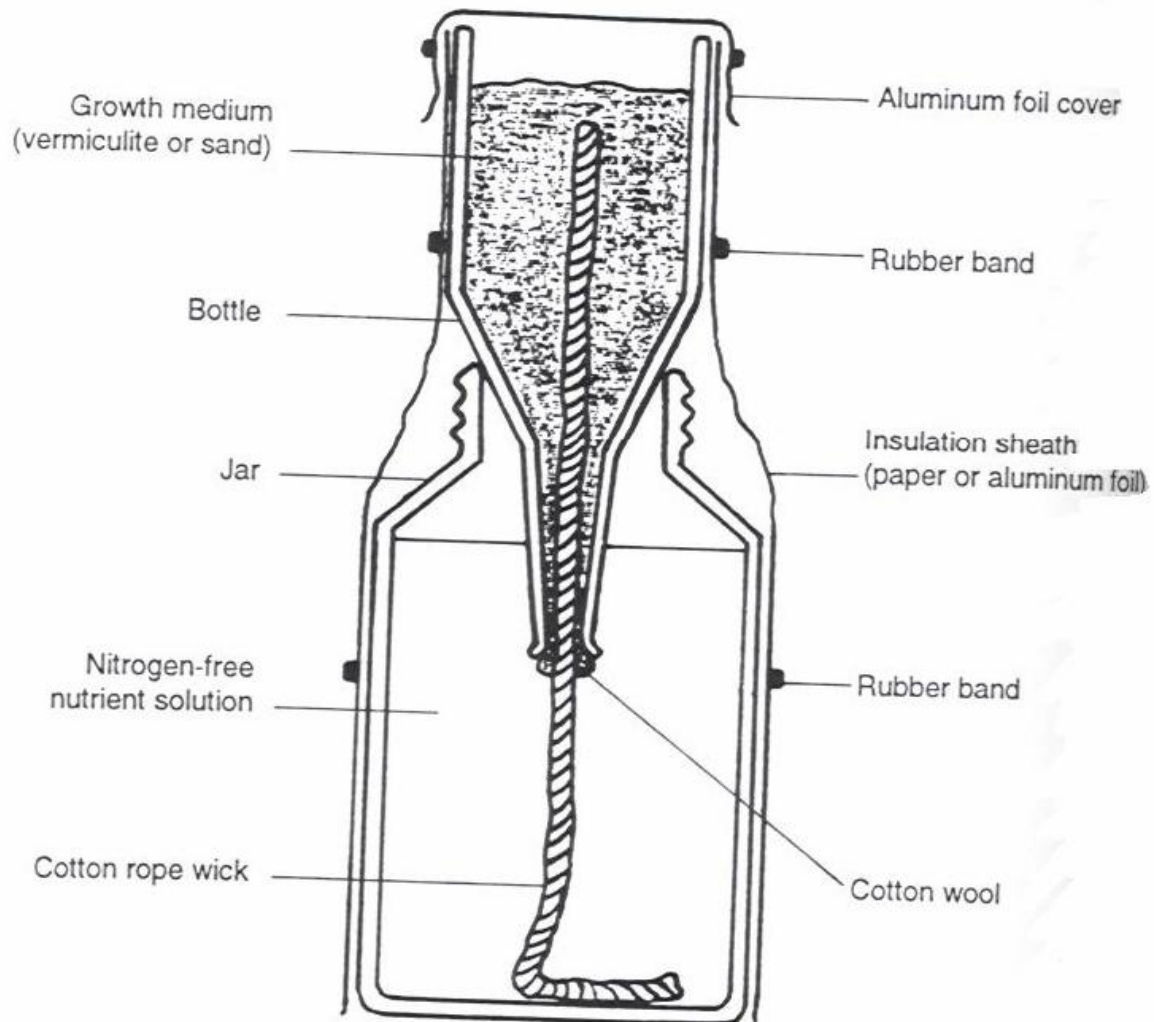


Figure 12 jarre de Leonard (Vincent, 1970)

doit contenir les racines) est couverte par du plastique noir (Brochwell et al., 1980 ; Gibson., 1980).

11-4- Inoculation des jarres

Après avoir planté les graines à une profondeur de 2 à 4 cm, chaque jarre est inoculée par 3 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle ($\geq 1 \times 10^9$) cultivée sur TY à 28° C [1 ml par semis] et recouverte d'une couche mince de sable fin. La solution nutritive est ajoutée une fois par semaine, pendant le premier mois puis 2 fois par semaine pour la période restante (Vincent., 1970).

11-5- La chambre de culture

Les jarres inoculées sont mises en chambre de culture sous conditions contrôlées :

- Une photopériode de 16 heures
- Une température de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ le jour et de $16 \pm 5^{\circ}\text{C}$ la nuit.
- Une humidité relative de 50 % à 60 %.

II- Caractérisation des bactéries

Après le test de nodulation, les isolats ayant nodulé la plante-hôte sont soumis à plusieurs tests spécifiques à l'étude du genre *Rhizobium* (Zhang et al., 1991).

1- Mesure de la croissance bactérienne

La mesure de la croissance bactérienne est nécessaire pour déterminer le temps de génération de chaque isolat et pour cela deux techniques sont requises, mesure de la densité optique et dénombrement des bactéries.

1-1- Mesure de la densité optique

Une culture des isolats est réalisée dans des erlenmeyer contenant 100 ml de YMB. Chaque erlenmeyer est inoculé par 1 ml des isolats cultivés sur TY (annexe 1). Le milieu est incubé dans un bain-marie avec agitation (200 rpm) à 28° C. l'incubation dure 5 jours durant lesquelles, la densité optique ($\lambda = 540 \text{ nm}$) est mesurée régulièrement (Somasegaran et *al.*, 1994). La première mesure est prise directement après l'inoculation ($t = 0$).

1-2- Enumération bactérienne

La technique utilisée est celle des dilutions et comptages sur boîte (Beck et *al.*, 1993 ; Somasegaran., 1994) :

Des erlenmeyers d'une capacité de 250 ml sont remplis avec 100 ml de YMB et inoculés avec 1 ml des isolats cultivés sur TY (annexe 1). Les erlens sont ensuite incubés dans un bain-marie agité (200 rpm à 28°C.

Les lectures sont effectuées aux temps : $t = 0$, $t = 2\text{h}$, $t = 4\text{h}$, $t = 12\text{h}$, $t = 18\text{h}$, $t = 24\text{h}$, $t = 36\text{h}$, $t = 48\text{h}$, $t = 72\text{h}$ et $t = 96\text{h}$ en prélevant à chaque fois 1 ml de suspension servant à la réalisation des dilutions (de 10^{-1} à 10^{-7}) (Figure 13).

Les boîtes de Pétri contenant du YMA + rouge Congo sont ensemencées chacune par 1 ml d'une dilution qui comprend entre 30 – 300 colonies par boîtes. Le nombre de bactéries/ml de milieu est déterminé en multipliant par l'inverse du facteur de dilution adéquat et le volume de prélèvement.

Le temps de génération est obtenu par la relation suivante :

$$T = t \cdot \text{Log } 2 / (\text{Log } N_2 - \text{Log } N_1)$$

Où

T = moyenne de temps de génération

t = temps t_2 – temps t_1

N₁ = nombre de *rhizobia* à t_1

N₂ = nombre de *rhizobia* à t

2-Effets de facteurs intrinsèques

2-1-Utilisation de la source de carbone

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA où le mannitol est remplacé par les différents sucres : lactose, D-saccharose, D-glucose, D-fructose. Le test est réalisé en présence de YMA comme témoin.

L'incubation dure de 24 à 72 heures à 28°C (Vincent., 1970 ; Nour et *al.*, 1994).

2-2-Utilisation de la source d'azote

Les isolats sont cultivés sur le milieu défini de Bergerson (Annexe 1) et sur le même milieu où la source d'azote (la glutamine) est remplacée par des acides aminés (alanine, glycine, histidine, méthionine, valine).

Les observations des diamètres des colonies formées ont été faites après une incubation de 3 jours à 28°C.

2-3- Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des *Rhizobium*, comme un moyen d'identification (Beck et *al.*, 1993).

Quatre antibiotiques sont appliqués et chacun d'eux est utilisé à différentes concentrations (tableau 7)

Tableau 7 Les solutions stocks d'antibiotiques utilisées ($\mu\text{g/ml}$ de YMA)

Antibiotiques	Concentrations [mg/ml]	Solvant
Ampicilline	5 – 20 – 50 - 100	Eau distille
Acide nalidixique	2– 5 – 10 – 40 – 100 - 200	NaOH
Kanamycine	5 – 10 – 60 – 100	Eau distille
Streptomycine	5- 10 – 30 – 50 - 100	Eau distille

Pour réaliser ce test la méthode de dilution en milieu gélosé préconisée par Vincent (1970) , Beck et *al* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994) a été appliquée en utilisant des stocks de solutions d'antibiotiques ajoutés au milieu YMA.

Les nodules sont stérilisés par passage dans l'hypochlorite de sodium (5 w/v), et rincés avec de l'eau distillée stérile (6 fois de suite), puis écrasés avec une pince stérile, le broyat est prélevé à l'aide d'une anse de platine et ensemencé sur boîte de Pétri contenant le milieu TY-A. (Annexe 1)

L'incubation des boîtes a duré 24 heures à 28°C jusqu'à apparition des colonies (Beck *al.*, 1993 ; Somasegaran et Hoben.,1994) puis les bactéries sont transférées sur le milieu TY-A contenant les différentes concentrations d'antibiotiques.

3- Effet de facteurs extrinsèques

3-1- Tolérance à la salinité (NaCl)

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA à différentes concentrations de NaCl (1,0 %, 2%, 3%, 5%, 10%) (W/V) en présence d'un milieu YMA à concentration normale (0.01% NaCl).

3-2- Influence du pH

Les isolats et la souche témoin CP 39 sont cultivés sur milieu YMA à différents pH : 3.5, 4, 6.8, 9, 11, en présence d'un milieu témoin à pH 6.8.

3-3- Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales pour la croissance de chaque isolat, une culture de ces différents isolats et de la souche

témoin a été réalisée sur milieu YMA et incubée à différentes températures : 4⁰ C, 20⁰ C, 28⁰ C, 35⁰ C, 40⁰ C et 50°C.

III- Production d'inoculum

1- Culture de *rhizobia*

1-1-Milieu de culture

Le milieu choisi est le milieu YMB selon Montange et Beunard (1984), Beck et *al* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994).

1-2- Pré-culture

La pré-culture a été faite selon la méthode de Montage et Beunard (1984). Chaque erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de YMB stérile est inoculé à l'aide d'une anse d'une souche bactérienne conservée sur gélose inclinée puis incubé dans un bain-marie avec agitation (200 rpm) à 28°C pendant 2 jours.

1-3-La fermentation

Un fermenteur en verre d'une capacité de 2 litres a été utilisé pour la manipulation. Il est rempli avec 500 ml de YMA puis stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes (Figure 14).

La fermentation des isolats choisis ainsi que la souche témoin CP39 a été réalisé par l'ensemencement de 10 ml de pré-culture dans les 500ml d'YMB et laissé incubé pendant 3 jours (Montange et Beunard., 1984).

L'aération est assurée par un compresseur d'air et un filtre stérile. La moyenne préconisée est de 5 litres d'air/litre/heure (Montange et Beunard., 1984).

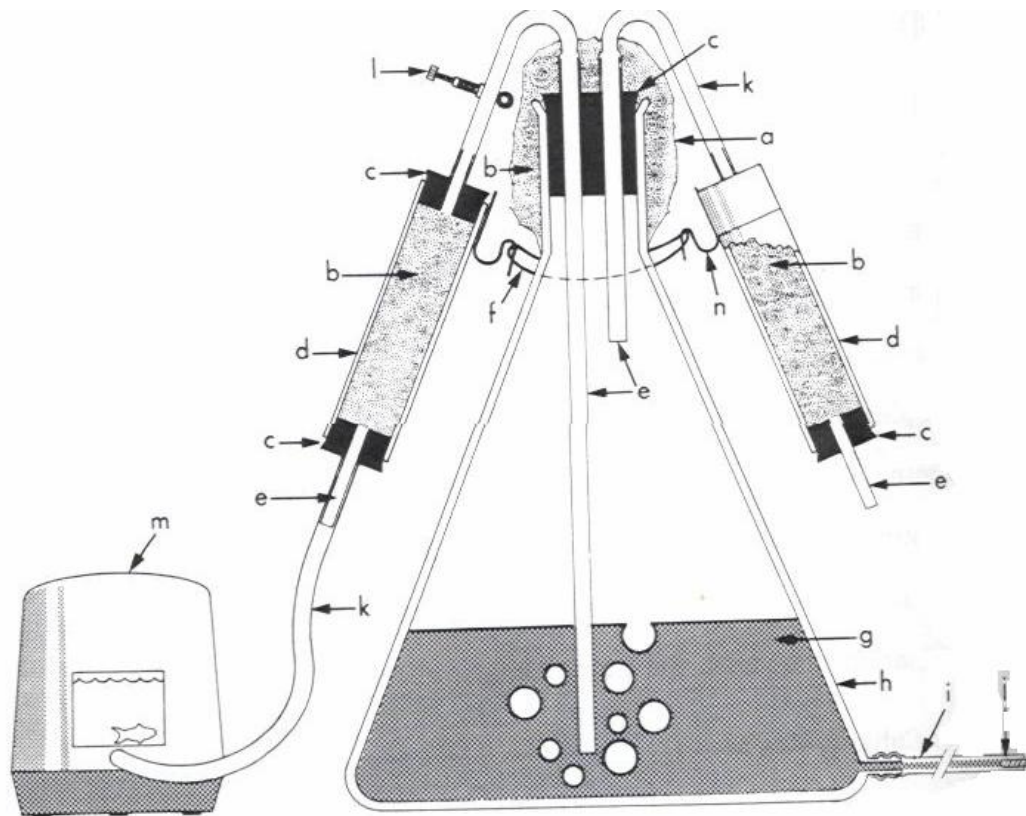


Figure 14 fermenteur (Beck et al, 1993)

- : bouchon
- b : coton cardé
- c : bouchon
- d : tube en plastique
- e : tube en verre
- f : support
- g : milieu de culture YMA
- h : Erlenmeyer (2 litres)
- i : tube en verre
- j : bouchon
- k : tuyau autoclavable
- l : tube pour prélèvement des échantillons
- m : pompe a air

1-4-Suivi de la croissance bactérienne

Le contrôle de la croissance dans le fermenteur peut être assuré par prélèvement d'une aliquote de la culture qui subit les tests suivants (Somasegaran et Hoben., 1994) :

- estimation du nombre de bactéries contenus dans l'inoculum selon la méthode de dilution et comptage sur boîte (Somasegaran et Hoben., 1994).
- coloration de Gram.
- contrôle du pH (le pH est ajusté en ajoutant aseptiquement du KOH 5N).

2- Préparation des supports d'inoculum

Dans la production d'inoculum, plusieurs supports peuvent être utilisés

2-1-Les supports utilisés

Afin de produire plusieurs types d'inoculums les supports que l'on a utilisé lors de notre étude sont :

- La tourbe.
- La tourbe de France.
- La kaolinite de composition chimique Al_2O_3 35% SiO_3 63% et des traces d'éléments minéraux.
- La vermiculite.
- Le chardon (*Carduus*)

2-2- Préparation des supports

Avant utilisation, les supports doivent être séchés et neutralisés.

2-2-1- Détermination de l'humidité des supports

L'humidité des supports est déterminée selon la méthode de Somasegaran et Hoben (1994) : après dessiccation dans une étuve ventilée à 70°C pendant 48 heures et la teneur en humidité du support est calculée selon la formule préconisée par Somasegaran et Hoben :

$$M = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_2}$$

Où:

M : humidité du support (exprimé en %)

W₁ : poids frais du support (g)

W₂ : poids sec du support après séchage à 70°C.

2-2-2-Broyage des supports

Après détermination de la teneur en humidité les supports sont broyés au moyen d'un broyeur mécanique puis passés au tamis de 0.74 µm.

2-2-3- Volume d'inoculum absorbé par le support

Ce volume est déterminé selon la méthode utilisée par Somasegaran et al (1985), en calculant la capacité de rétention qui consiste à ajouter 50 ml d'eau distillée à 20 grammes de tourbe puis agiter pendant 2 heures.

Le mélange homogène est filtré dans un entonnoir contenant du papier filtre au dessus d'une fiole graduée et laissé pendant une nuit. (Figure 15)

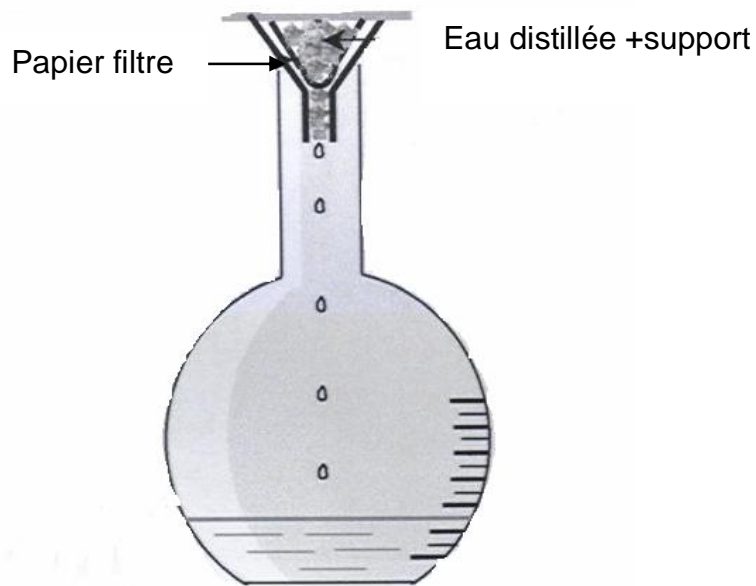


Figure 15 Evaluation du volume de la suspension bactérienne pour inoculer le support

Après décantation, le volume d'eau absorbé est calculé par différence entre le volume initial et le volume recueilli, correspondant à la capacité de rétention du liquide.

Le volume d'inoculum est compris entre 60-70% de cette valeur (Somasegaran et Hoben ; 1994)

2-2-4-Neutralisation des supports

Mis à part la kaolinite qui est neutre, les supports ont besoin d'être neutralisés. Le pH des supports est mesuré suivant la méthode de Somasegaran et Hoben (1994) en réalisant une suspension de 10 g du support avec 90 ml d'eau distillée, en agitant puis en ajustant le pH qui doit se situer entre 6.5 et 7 avec addition de CaCO_3 .

2-2-5- Stérilisation des supports et emballage

Après broyage et neutralisation, les supports ont été emballés dans des sachets en polypropylène thermorésistant d'une dimension de 10 cm X 15 cm à raison de 5 g par sachet. Il est nécessaire d'humidifier les supports avec 10% du volume à inoculer avec de l'eau distillée et de bien souder les sachets. (Figure 16). Ces derniers subissent trois stérilisations successives espacées de 24 heures (Saint-Macary et Neyra., 1992).

3- L'inoculation

L'inoculation des sachets contenant les supports stériles est réalisée à l'aide d'une seringue stérile sous une hotte à flux laminaire, en prenant soins de bien refermer les trous. Les sachets sont étiquetés avec les mentions suivantes (Figure 17) :

- Le nom de l'espèce de *Rhizobium*.
- La plante.
- Le support d'inoculum.
- La date de production.
- Le laboratoire.

4- Contrôle de qualité de l'inoculum

4-1- Contrôle de qualité de l'inoculum liquide

Tout au long de la croissance des *Rhizobium*, des prélèvements sont effectués afin de vérifier le pH, la contamination du milieu ainsi que le nombre de *Rhizobium* dans l'inoculum.



Figure 16 soudure des sachets d'inoculum



Figure 17 Sachets en polypropylène contenant l'inoculum

4-1-1-Acidité du milieu

Pour contrôler l'acidité du milieu on prélève 1ml du liquide dans un tube stérile, on verse deux gouttes de BTB et on vérifie la couleur : jaune, elle indique un milieu acide, verte elle indique un milieu basique. L'ajustement de pH se fait avec du NaOH 1N.

4-1-2-Contamination du milieu

Le contrôle de l'inoculum est réalisé selon les paramètres suivants :

- l'observation de la couleur du milieu et son odeur.
- l'examen microscopique après coloration de Gram.
- l'ensemencement à chaque prélèvement sur boîte contenant le milieu YMA + Rouge Congo et le milieu GPA + Pourpre de Bromocrésol.

4-1-3-Estimation du nombre de *Rhizobium* dans l'inoculum

La méthode utilisée est la technique des dilutions décrite par Somasegaran et Hoben (1994)

4-2- Contrôle de qualité de l'inoculum solide

33 gr de l'inoculum solide sont immergés dans 100 ml d'eau distillée et, après agitation de 15 minutes, on réalise plusieurs dilutions que l'onensemence sur milieu YMA + rouge Congo (Montange et Beunard, 1984).

5- L'inoculation des graines de pois chiche et culture en pots

Cet essai a porté sur les variétés : X88TH30-1, F4P85-55, ILC 482, ILC3279, F4P84-92 (ITGC 2004).

La stérilisation des graines a été effectuée selon la méthode proposée par Kyei-Boahan et *al.* (2002) : sous une hotte à flux laminaire la surface des graines est stérilisée par passage dans de l'éthanol à 95% durant 3 minutes puis dans de l'hypochlorite de sodium (3%) durant 3 minutes suivie par plusieurs lavages successifs d'eau distillée stérile et laissée sous la hotte jusqu'à ce qu'elles sèchent.

5-1-Préparation de L'adhésif

Deux types d'adhésifs sont utilisés, la gomme arabique (40 %) et le saccharose (10%).

L'adhésif est obtenu en chauffant 100 ml d'eau distillée puis en ajoutant 1 à 2 gr de gomme arabique ou de saccharose par petite quantité jusqu'à dissolution complète. Le pH est ajusté à 6.0 avec NaOH 1N (Vincent, 1970 ; Graham., 1994).

5-2-Les techniques d'inoculation

Pour l'inoculation des graines deux méthodes sont testées : la méthode d'enrobage et la méthode liquide à base de tourbe.

5-2-1- La méthode d'enrobage

Elle a été appliquée selon la technique décrite par Feng et *al.* (2002) : 10 g de graines de pois chiche stérile ont été mélangés avec 2.5 g d'inoculum et 10 ml d'une solution d'adhésif (20 % gomme arabique ou 10 % saccharose).

Les graines inoculées sont exposées sous la hotte pendant 30 minutes à une température ambiante pour qu'elles sèchent, puis elles sont stockées dans des flacons en verre à une température de 28°C.

5-2-2- La méthode liquide à base de tourbe

1g de la tourbe inoculée est mis en suspension dans un litre d'eau de robinet. Un volume de 5 ml de la suspension bactérienne est appliqué à chaque graine préalablement lubrifiée avec une solution de gomme arabique (20%).

Les graines sont ensuite séchées à l'obscurité et à l'air libre pendant 10 mn (Islam et Afandi., 1980) puis semées dans les pots.

6- Détermination de la survie des bactéries

Pour déterminer la survie des *rhizobia* sur la graine inoculée, la méthode utilisée est celle de Daza et al (2002) : il s'agit de transférer 20 graines inoculées dans 100 ml d'une solution tampon (0,85% NaCl), d'agiter vigoureusement pendant 10 minutes et de procéder à une dilution successive, étalage sur boîte de Pétri contenant du YMA+ rouge congo. Le nombre de *rhizobia* a été estimé par le nombre de colonies formées après 3 à 5 jours d'incubation à l'obscurité et à une température de 28°C.

7- Test de l'inoculum au sol

L'efficacité des différents inoculums à base de tourbe, de vermiculite, de kaolinite et de Chardon a été testée sur la plante hôte.

Des graines inoculées sont semées dans des pots de 1 kg (à raison de 3 graines par pots) ; ces derniers sont remplis d'un mélange de sable – terre (1 :1) prélevé au site expérimental (Chaabet Erssas).

La culture a été réalisée dans une chambre de culture. L'irrigation a été faite par une solution nutritive dépourvue d'azote (Fahraeus). (Annexe 1)

La récolte est effectuée après 50 jours de croissance.

8- Analyse statistique

Les résultats obtenus sont traités par une analyse de variance (ANOVA) sur Microsoft Excel.

Les facteurs étudiés sont :

§ Effet de la souche, du support d'inoculum, de la température et du temps de conservation sur la croissance et la survie des *Rhizobia* dans l'inoculum.

§ Effet de l'adhésif, du temps de conservation et de la souche sur la survie des Rhizobia sur la graine.

§ Effet de la méthode d'inoculation, du temps de conservation de la souche, de la survie des *Rhizobium* sur la graine et le nombre de nodules obtenus.

Résultats Et Discussion

I- Caractérisation phénotypiques des *rhizobia*

1- Isolement et identification

Dans cette étude 50 isolats ont été isolés à partir des nodules de la légumineuse (*Cicer arietinum* L.) prélevé sur les différents sites.

En comparant les isolats avec la souche témoin CP39 (ICARDA) nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) il a été remarqué, selon la littérature récente, que leurs caractères culturels et morphologiques présentent le profil du genre *Rhizobium*.

Parmi les méthodes d'identification du genre *Rhizobium*, nous nous sommes basés sur celles préconisées par Vincent (1970), Beck et al (1993) et Somasegaran et Hoben (1994).

1-1-Examen microscopique

La coloration de Gram révèle des bâtonnets courts, Gram négatif.

1-2-Aspect des colonies

Les colonies sur milieu YMA sont décelables après 24 heures d'incubation à 28°C, abondantes après 3 à 5 jours, circulaires, convexes, semi-transparentes et lisses.

1-3- Croissance sur les différents milieux de cultures

- sur milieu YMA + rouge Congo: les isolats absorbent peu ou pas le rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre, une caractéristique observée chez le *Rhizobium* (Vincent ; 1970, Jordan ; 1984).
- Sur milieu YMA + bleu de bromothymol : les souches isolées acidifient rapidement (24h) le milieu ce qui explique le virement de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol.
- Sur milieu Glucose-Peptone-Agar + pourpre de bromocresol: les isolats n'entraînent aucun virement de couleur du milieu après 24h d'incubation comme peuvent le faire certains contaminants notamment les bactéries à Gram positif (Beck et al., 1993 ; Somasegaran et Hoben.,1994).

Tous ces caractères morphologiques et culturels sont des tests fondamentaux dans la taxonomie du *Rhizobium* (Zhang et al., 1991) mais insuffisants pour conclure. Aussi il est impératif, à partir d'un isolement du sol, d'effectuer une distinction entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* par des tests spécifiques notamment celui de Ca-glycérophosphate (Hofer, 1941).

1-4-Test de différenciation entre les deux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*

-Test du calcium-glycérophosphate (Hofer, 1941)

La grande majorité des isolats ont donné des colonies blanchâtres sur ce milieu, ce qui les distingue du genre *Agrobacterium* qui, lui, produit une enzyme, la 3 cétylglucosidase (Kerstens et Deley., 1984) qui se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu_2O autour des colonies (Lindström et Lehtomaki., 1988).

2- Test de nodulation : authentification des isolats

L'authentification des isolats et leur appartenance au genre *Rhizobium* passe nécessairement par le test de nodulation, c'est-à-dire leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante-hôte (*Cicer arietinum*) en conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent. 1970 ; Somasegaran.,1985) (Figure 18).

Toutes les souches testées en jarres de Léonard ont réussi à infecter les racines et à former des nodules. Le temps d'apparition des premiers nodules sur les racines est différent les souches bactériennes. En effet, les isolats IT, CHA, KENT, BIS, DJ II, BAT, AIN, OLB I, LOCALE ainsi que la souche de référence CP 39 ont provoqué une nodulation deux semaines seulement après l'inoculation des



Figure 18 La croissance de *Cicer arietinum* dans les jarres de Léonard

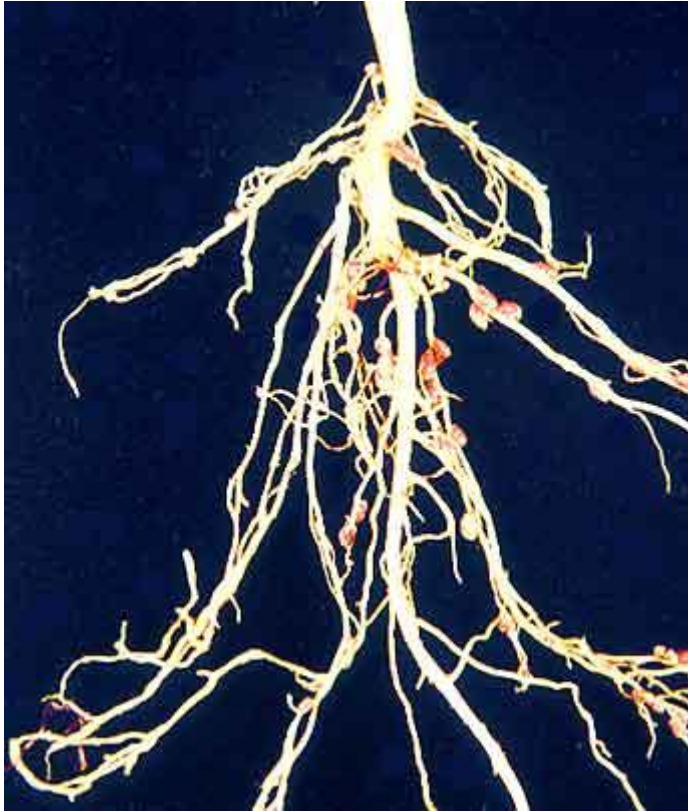


Figure 19 Résultat du test de nodulation

plantes alors que pour le reste des isolats, la nodulation n'est apparue que la troisième, voire la quatrième semaine. Cette différence dans le temps d'apparition des nodules a été observée lors des travaux de Aouani et al., (2001) indiquant que l'espèce *Mesorhizobium mediterraneum* forme des nodules efficaces après

seulement deux semaines. D'autres auteurs (Kyei-Boahen et al., 2002 ainsi que Içgen et al., 2002) stipulent que les nodules ne se forment que quatre semaines après l'inoculation des graines de pois chiche.

Les nodules obtenus sont presque de la même taille, de couleur rose (dû à la présence de la légghémoglobine), signe d'une efficacité des isolats (Vincent., 1970). (Figure 19).

En considérant le test distinctif (milieu au Ca-Glycérophosphate) et la capacité à former des nodules avec la plante-hôte, nous avons retenu les souches ou isolats mentionnées au tableau 8 :

Tableau 8 Isolats et souche de référence rhizobienne utilisés

Isolats et souche	Origine géographique	Source
Isolats		
IT	El khroub (Constantine)	GBBV
CHA	Chaaberssas(Constantine)	GBBV
KENT	El kentra (Biskra)	GBBV
BIS	Biskra	GBBV
DJ I	Sidi abdelaziz (Jijel)	GBBV
DJ II	Jijel	GBBV
BAT	Batna	GBBV
AIN	Ain touta (Batna)	GBBV
KEN I	Khenchla	GBBV
KEN II	Khenchla	GBBV

Tableau 8 suite Isolats et souche de référence rhizobienne utilisés

Isolates et souches	Origine géographique	Source (référence)
OLB I	Oum el bouaghi	GBBV
OLB II	Oum el bouaghi	GBBV

ILC	Ain timouchent	GBBV
LOCALE	Ain timouchent	GBBV
Référence CP 39	Alep (Syrie)	ICARDA

GBBV: laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales (Université Mentouri, Constantine).

II- Caractérisation des *Rhizobium*

La caractérisation des bactéries est une étape importante pour une utilisation future des souches lors de la production d'inoculum.

2-Croissance bactérienne

1-1-Densité optique

Le suivi de la croissance des souches est une méthode utilisée afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle qui est en corrélation avec la production d'inoculum (Prin et *al.*, 1993). La densité optique mesurée est représentée dans les figures 20 et 21.

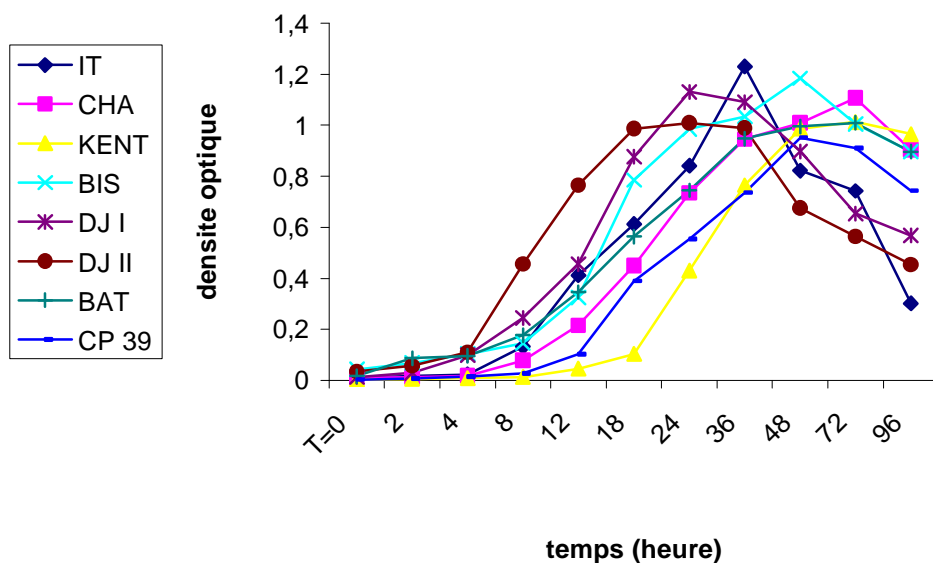


Figure 20 Croissance des isolats et de la souche témoin CP 39 sur milieu YMA durant 96 heures d'incubation à 30° C

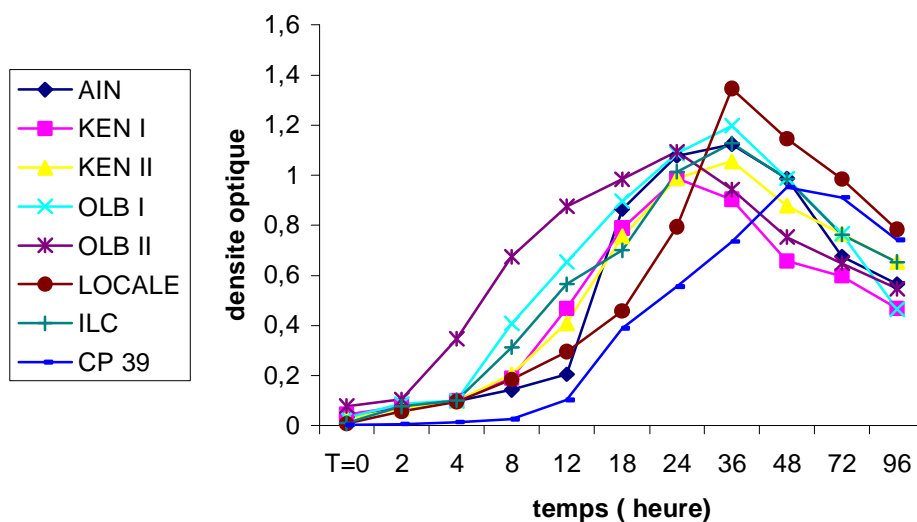


Figure 21 Croissance des isolats et de la souche témoin CP 39 sur milieu YMA durant 96 heures d'incubation à 30° C

Les travaux de Nour et *al* portant sur l'espèce *Mesorhizobium ciceri* ont montré que le *Rhizobium* à croissance rapide atteint sa croissance maximale après 36 à 72 heures en milieu liquide.

La plupart des souches utilisées (IT, CHA, KENT, DJ II, BAT, AIN, KEN II, OLB II, ILC) ainsi que la souche de référence CP 39 ont montré un trouble après seulement 24 heures de culture sur bouillon YMA.

L'observation de la croissance des différents isolats sur le milieu YMA + rouge Congo incubés à 28°C a permis de constater quelques colonies après 24 heures et une abondance de colonies après 3 jours d'incubation. Ceci indique que les souches utilisées ont les caractères du *Rhizobium* à croissance rapide conformément à ce que rapportent Jordan (1984), Chen et *al* (1998) ainsi que ceux de Nour et *al* (1994), Nour et *al* (1995) et Jarvis et *al* (1997).

Les courbes de croissance obtenues pour les différents isolats et la souche témoin CP 39 sont décrites dans les figures 22 et 23.

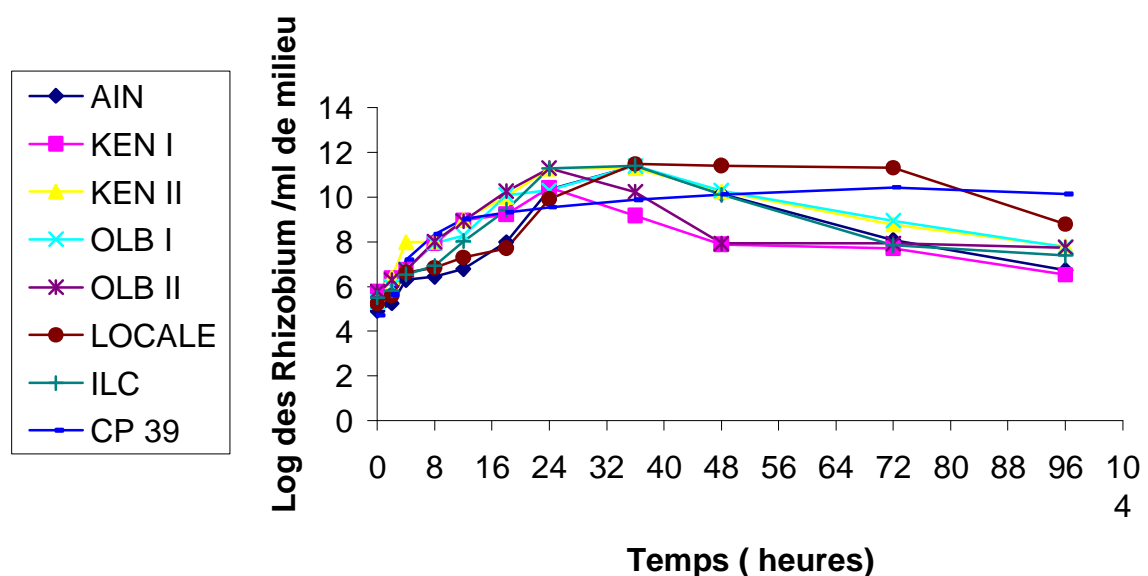


Figure 22 Croissance des Isolats et de la souche témoin CP 39 sur milieu YMA durant 96 heures d'incubation à 30°C

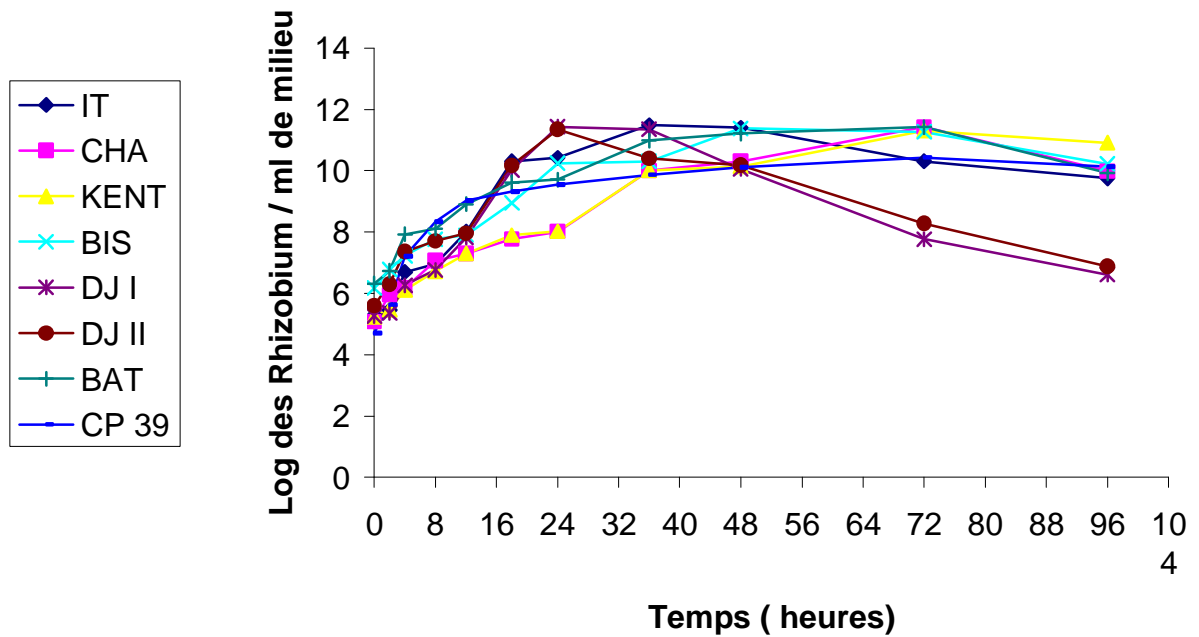


Figure 23 Croissance des isolats et de la souche de référence CP 39 sur milieu YMA durant 96 heures d'incubation à 30°C

2- Temps de génération

Le temps de génération de tous les isolats est calculé à partir du tableau 28 (Annexe 2).

Le tableau 9 présente les moyennes du temps de génération des isolats et de la souche témoin CP 39. A partir de ces résultats, les isolats peuvent être classés dans le genre *Rhizobium* à croissance rapide car la moyenne du temps de génération est comprise entre 2 et 4 heures ce qui est une des caractéristiques des *Rhizobium* à croissance rapide (Jordan., 1982 ; Nour et al., 1994 ; Nour et al., 1995).

Tableau 9 Moyenne du temps de génération des isolats et de la souche témoin

Isolats et souches	Temps de génération	Isolats et souches	Temps de génération
IT	3,35	AIN	3,65
CHA	3,70	KEN I	3,83
KENT	3,80	KEN II	3,50
BIS	2,65	OLB I	3,43
DJ I	3,85	OLB II	3,54
DJ II	3,76	ILC	3,45
BAT	3,70	LOCALE	2,60
		CP 39	3,32

3-Effets des facteurs intrinsèques

3-1-Source de carbone

Après 24 heures d'incubation à 28⁰ C, les colonies sur YMA contenant l'un des sucres sont décelables, puis abondantes après 3 jours (tableau 10) sauf pour le milieu contenant le saccharose où la croissance a été abondante au bout de 24 heures seulement, ce qui confirme les résultats de Nour et al (1994 ;1995) sur l'espèce de *Rhizobium* nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum*).

Tableau 10 Culture des différents isolats sur milieu YMA en présence des différents sucres.

	Mannitol	Saccharose	Fructose	Glucose
Isolats				
IT	+	+	+	+
CHA	+	+	+	+
KENT	+	+	±	+
BIS	+	+	+	+
DJ I	+	+	+	+
DJ II	+	+	+	+
BAT	+	±	±	+
AIN	+	+	+	+
KEN I	+	+	+	+
KEN II	+	+	+	+
OLB I	+	+	+	+
OLB II	+	+	±	+
ILC	+	+	+	+
LOCALE	+	±	±	+
Souche témoin CP 39	+	+	+	+

+ : bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

± : croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

_ : absence de croissance.

3-2-Source d'azote

La croissance des isolats ainsi que la souche de référence CP 39 sur milieu Bergersen modifié (annexe 1) sont représentés dans le tableau 11 :

A l'exception du milieu où le glutamate a été remplacé par la valine, tous les autres acides aminés ont inhibés la croissance des *Rhizobium*, ce qui va dans le sens des résultats de Nour et al (1994) qui indiquent que les acides aminés ne peuvent pas être utilisés comme source d'azote et qu'ils peuvent même jouer un rôle d'inhibiteurs pour la croissance rhizobienne (Jordan., 1984)

Tableau 11 Croissance des *rhizobia* sur différentes sources d'azote

	alanine	glycine	histidine	méthionine	Valine
Isolats					
IT	-	-	-	-	±
CHA	-	-	-	-	+
KENT	-	-	-	-	+
BIS	-	-	-	-	+
DJ I	-	-	-	-	±
DJ II	-	-	-	-	±
BAT	-	-	±	-	+
AIN	-	-	-	-	+
KEN I	-	-	-	-	±
KEN II	-	-	±	-	±
OLB I	-	-	±	-	+
OLB II	-	-	-	-	±
ILC	-	-	-	-	±
LOCALE	-	-	-	-	+
Souche témoin CP 39	-	-	-	-	+

+ : bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

± : croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

- : absence de croissance.

3-3-Résistance intrinsèque aux antibiotiques

D'après les résultats obtenus et présentés dans le tableau 12, on note que la concentration minimale inhibitrice diffère d'un isolat à un autre. En effet, les isolats IT, BIS, OLB I et LOCALE présentent une résistance élevée aux différents types d'antibiotiques. Les souches IT, BIS, et OLB I ont une résistance à l'ampicilline de 100 µg /ml , à l'acide nalidixique de 280 µg /ml et résistent à des concentrations de 50 µg /ml d'ampicilline et de 100 µg .ml⁻¹ de kanamycine, ce qui s'accorde relativement avec les travaux d'Içgen et al (2002) sur la résistance de la souche *Rhizobium ciceri* – Y29 aux antibiotiques utilisés notamment la streptomycine (40 µg.ml⁻¹) , l'ampicilline (70 µg. ml⁻¹) , la spéctromycine (100 µg.ml⁻¹) et la cloxacine (70 µg.ml⁻¹) .

Tableau 12 Résistance intrinsèque aux antibiotiques des différents isolats et de la souche témoin (concentration minimale inhibitrice en µg/ml)

	ampicilline	Acide nalidixique	kanamycine	Sterptomycine
IT	100	260	100	50
CHA	80	280	60	50
KENT	60	240	90	30
BIS	100	280	100	50
DJ I	80	250	70	50
DJ II	70	240	80	40
BAT	60	250	70	50
AIN	70	220	60	40
KENT I	60	220	80	30
KENT II	70	250	90	40
OLB I	100	280	100	50
OLB II	80	200	60	20
ILC	70	220	80	40

Tableau 12 suite Résistance intrinsèque aux antibiotiques des différents isolats et de la souche témoin (concentration minimale inhibitrice en µg/ml)

LOCALE	80	280	100	50
--------	----	-----	-----	----

CP 39	70	250	80	40
-------	----	-----	----	----

Les bactéries montrent la plus grande concentration minimale inhibitrice pour l'acide nalidixique, ce qui est l'une des caractéristiques du *Mesorhizobium mediterraneum* (Jarvis., 1997).

La variation de la résistance intrinsèque permet l'identification des souches de *rhizobia* d'un inoculum appliqué au sol et permet de même de les différencier des souches indigènes de la même espèce en utilisant les CMI des antibiotiques comme marqueurs (Nour et al., 1994 ; Lupwayi et al., 2000 ; İçgen et al., 2002).

4- Effets des facteurs extrinsèques

4-1-Tolérance au NaCl

Les travaux de Nour et al ; (1994) (1995), Jarvis et al (1997) ont montré que les *Rhizobia* nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum*) peuvent tolérer des concentrations en NaCl de 1 à 2 %.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 13 pour les différents isolats ainsi que pour la souche témoin. La tolérance au NaCl varie d'une concentration de 1% à 10% selon les isolats avec une croissance optimale à 2% ce qui correspond aux résultats de Gaur et Sen (1981) affirmant que plusieurs souches de *Mesorhizobium ciceri* (d'origine indienne) tolèrent plus de 2% de NaCl.

Tableau 13 Tolérance des *Rhizobia* à différentes concentrations de NaCl

Isolats	Concentration de NaCl (%)				
	1%	2%	3%	5%	10%
IT	+	+	±	-	-
CHA	+	+	±	-	-
KENT	+	+	+	+	±
BIS	+	+	+	+	±

Tableau 13 suite Tolérance des *Rhizobia* à différentes concentrations de NaCl

DJ I	+	+	+	+	±
DJ II	+	+	±	-	-
BAT	+	+	±	-	-

AIN	+	+	±	-	-
KEN I	+	+	±	-	-
KEN II	+	±	±	-	-
OLB I	+	+	+	+	±
OLB II	+	+	±	-	-
ILC	+	+	+	±	±
LOCALE	+	+	+	±	±
Souche témoin CP 39	+	+	+	-	-

+ : bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

± : croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

_ : absence de croissance.

Parmi les souches isolées on note une résistance à de hautes concentrations de sel (de 5% à 10%) ce qui indique que ces souches (KENT, BIS, ILC, OLB I, DJ I, LOCALE) sont halotolérantes. En effet, des résultats équivalents sont notés par Jebara et al (2001) et Abbas et al (2001) sur le fait que les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent tolérer des concentrations supérieures à 2%. La figure 24 illustre la croissance des isolats aux différents taux de sel.

Le fait que certains isolats soient plus résistants à la salinité est tout a fait normal étant donnée la diversité des sites géographiques d'isolement.

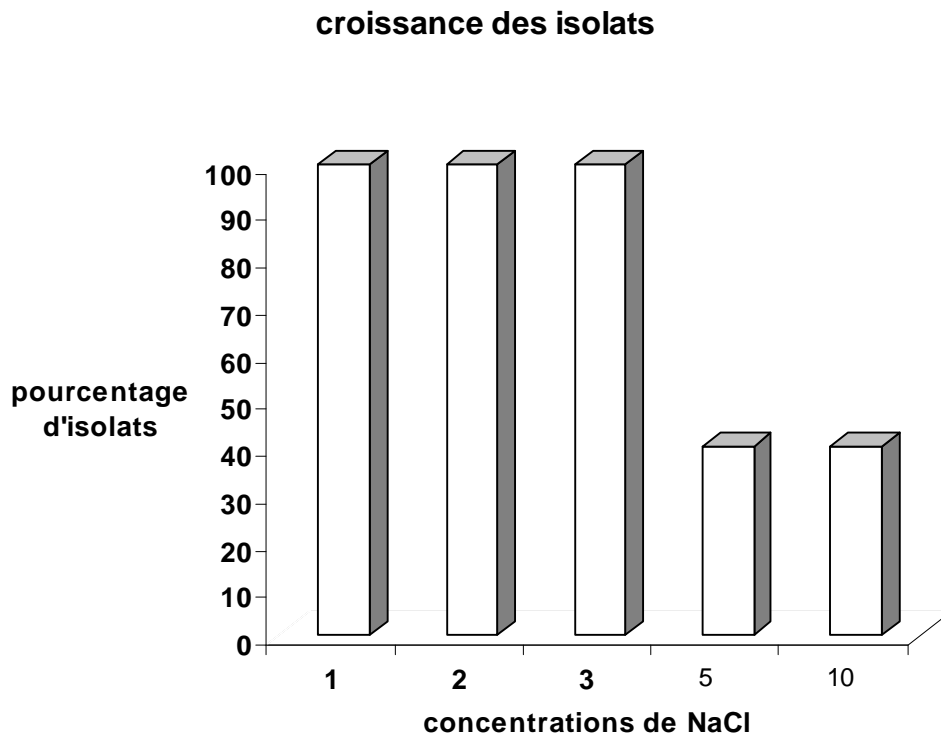


Figure 24 Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des Rhizobia

4-2-Effet de la température

D'après les résultats obtenus, la température requise pour la croissance des différents isolats varie entre 25° C à 40° C avec une température optimale de 28° C. Nour et *al* (1994) et Nour et *al* (1995), Jarvis et *al* (1997) suggèrent que la

température idéale pour la croissance Rhizobienne est de 28°C pour la croissance de l'espèce *Mesorhizobium ciceri*.

Le tableau 14, montre la croissance des différents isolats ainsi que la souche témoin a différentes températures. La figure 25 illustre la croissance des isolats aux différentes températures.

Tableau 14 Effet de la température sur les différents isolats

	4° C	20° C	28° C	35° C	40° C	50° C
Isolats						
IT	-	±	+	+	±	-
CHA	-	±	+	+	±	-
KENT	-	±	+	+	±	-
BIS	-	±	+	+	±	-
DJ I	-	±	+	±	-	-
DJ II	-	±	+	±	-	-
BAT	-	±	+	+	±	-
AIN	-	±	+	+	±	-
KEN I	-	±	+	+	±	-
KEN II	-	±	+	+	-	-
OLB I	-	±	+	+	-	-
OLB II	-	±	+	+	-	-
ILC	-	±	+	+	±	-
LOCALE	-	±	+	+	±	-
Souche témoin CP 39	-	±	+	±	±	-

+ : bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

± : croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

- : absence de croissance.

A 40°C, la croissance est très faible voire absente, en fonction de l'origine des isolats.

A 50°C, aucune croissance n'est observée même après plusieurs jours d'incubation (5 jours) ce qui est confirmé par les travaux de Cleyet-Marel et al (1990) et Date (2000) .

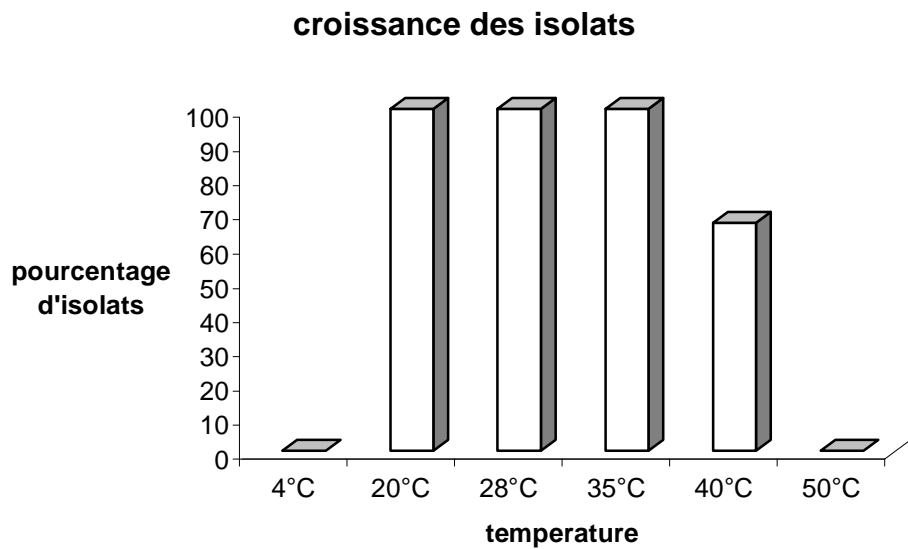


Figure 25 Effet de la température sur la croissance des isolats

4-3- Effet du pH sur la croissance des *Rhizobia*

Tableau15 Effet du pH sur la croissance Rhizobienne

	3	4	6.8	9	11
Isolats					

IT	-	-	+	+	-
CHA	-	-	+	±	-
KENT	-	±	+	+	-
BIS	-	±	+	+	±
DJ I	-	±	+	+	±
DJ II	-	±	+	+	-
BAT	-	-	+	+	±
AIN	-	±	+	+	±
KEN I	-	±	+	+	±
KEN II	-	-	+	+	±
OLB I	-	±	+	±	±
OLB II	-	±	+	±	±
ILC	-	±	+	+	±
LOCALE	-	-	+	+	±
Souche témoin CP 39	-	-	+	+	±

+ : bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

± : croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

- : absence de croissance.

Après incubation à 28°C pendant 3 jours sur milieu YMA à différents pH, on obtient une bonne croissance sur milieu à pH allant de 6.8 à 9, une croissance optimale à pH 6.8 et une absence de croissance à pH 3. Tableau (15).

La tolérance des *Rhizobia* aux pH acides a été indiquée par les auteurs tels Graham et al (1992) et Maâtallah et al (2002), qui précisent également que le calcium augmente la capacité de plusieurs *Rhizobium* à survivre dans des sols acides. La figure 26 illustre la croissance des isolats aux différents pH.

A pH 11, les colonies présentes sont moyennes (diamètre inférieur ou égal à 2mm). Ce qui pourrait correspondre aux résultats de Nour et al (1994) sur la

tolérance des *Rhizobia* au pH alcalin qui est l'une des caractéristiques morphologiques des *Rhizobia* nodulants le pois chiche (*cicer arietinum*)

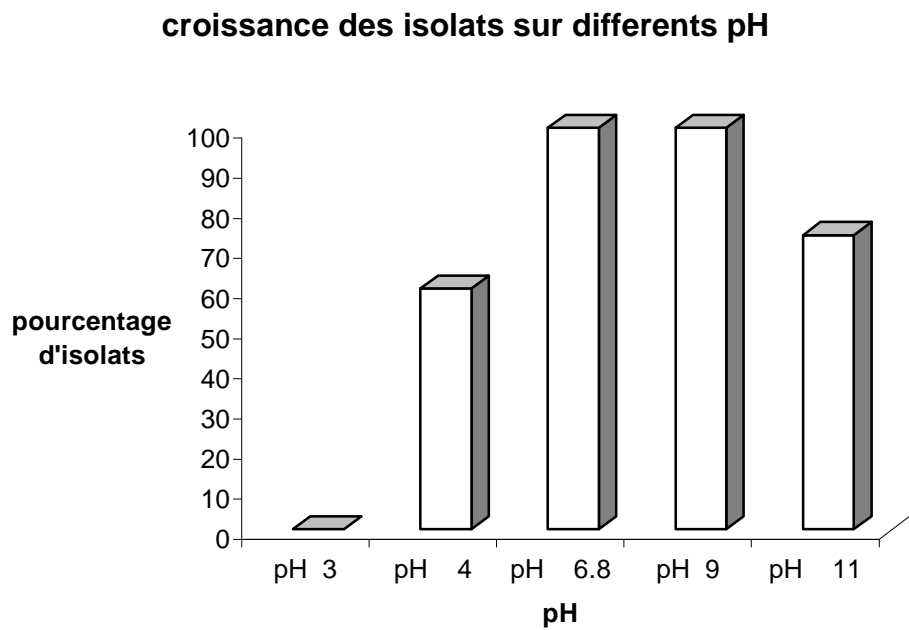


Figure 26 Effet du pH sur la croissance des isolats

5-Calcul des indices de similarité des isolats (IRS)

Les études physiologique et biochimique sont des critères importants dans la caractérisation phénotypique des *rhizobia* mais elles s'avèrent insuffisantes pour une analyse taxonomique. Néanmoins les résultats concernant la source de carbone,

l'influence du pH, du NaCl et de la température peuvent nous apporter des indications sur la similarité des isolats.

L'indice de similarité (ou indice de ressemblance IRS) a été calculé selon la méthode de Dedio, Kaltsikes et Larter (1969) en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des isolats selon la formule :

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

On observe que les indices varient entre 42,85% et 100%. On estime qu'une valeur est faible lorsqu'elle varie entre 0% et 10%. Inversement, on estime qu'une valeur est élevée lorsqu'elle est comprise entre 85% et 100%. (Dédio et *al.*, 1969).

Vu les résultats identiques obtenus pour l'effet de la source de carbone, il n'a pas été nécessaire de calculer l'indice de similarité (il est de 100% pour tous les isolats ce qui est une caractéristique des Rhizobium).

Les isolats obtenus présentent des IRS significativement élevés (entre 78% et 88%). Pour interpréter ces résultats, nous avons adopté la méthode de travail de Maâtallah et *al* (2002). Nous avons obtenu 2 seuils de similarité : un groupe où les espèces appartenant au seuil 70% - 80% qui sont : OLB I , KEN II et KENT puis l'autre groupe où les espèces appartenant au seuil 80% - 90% qui sont : BIS , DJ II , LOCALE , DJ I , BAT , IT , CHA , OLB II , ILC , AIN , KEN I et la souche de référence CP 39 . (Tableaux 16, 17, 18,19, 20 et 21).

A partir de ces résultats, on peut dire que le calcul de l'indice de ressemblance est un moyen d'évaluer le degré de parenté des variétés.

	Source de carbone	Source d'azote	Tolérance aux sels	Résistance a la température	Tolérance au pH
--	-------------------	----------------	--------------------	-----------------------------	-----------------

Tableau 20 Moyenne des indices de similarité des différents isolats

IT	100 %	92,85%	71,76%	89,79%	57,13%
CHA	100 %	92,85%	77,20%	89,79%	62,23%
KENT	100 %	92,85%	56,79%	89,79%	58,15%
BIS	100 %	92,85%	56,79%	89,79%	65,64%
DJ I	100 %	92,85%	60,87%	79,58%	77,54%
DJ II	100 %	92,85%	77,20%	79,58%	58,15%
BAT	100 %	71,42%	79,58%	89,79%	70,40%
AIN	100 %	92,85%	77,20%	89,79%	75,16%
KEN I	100 %	92,85%	77,20%	93,87%	75,16%
KEN II	100 %	71,42%	77,20%	79,58%	70,40%
OLB I	100 %	71,42%	60,87%	81,62%	76,86%

OLB II	100 %	92,85 %	74,82%	81,62%	79,24%
ILC	100 %	92,85%	71,42%	89,79%	76,86%
LOCALE	100 %	92,85%	54,41%	89,79%	72,78%
CP 39	100 %	92,85%	77,20%	89,79%	70,40%

Tableau 21 Moyenne des indices de similarités des différents isolats selon les différentes caractéristiques étudiées

Isolats	Moyenne
IT	82,30%
CHA	84,41%
KENT	79,51%
BIS	81,01%
DJ I	82,16%
DJ II	81,55%
BAT	82,23%
AIN	87%
KEN I	87,81%
KEN II	79,72%
OLB I	78,15%
OLB II	85,70%
ILC	86,18%
LOCALE	81,96%
CP 39	86,05%

III –Production d'inoculum

Le choix des souches pour la production d'inoculum a été faite en fonction de leur aptitude a noduler la plante, leur comportement vis-à-vis des facteurs extrinsèques (pH, NaCl, température). Dans notre étude les isolats retenus sont IT, BIS, LOCALE, OLB I et la souche de référence CP 39.

1-La préparation des supports d'inoculum

1-1-Détermination de l'humidité des supports

Après séchage des supports dans une étuve à 70° pendant 48 heures. L'humidité calculée est inférieure à 10% (tableau 22), ce qui correspond aux résultats de Somasegaran et Hoben (1994) qui indiquent que l'humidité ne doit pas dépasser 15%.

Le chardon (*Carduus*) a été retenu comme support d'inoculum du fait que c'est une abondante source de matière organique présente sur quasiment tous les écosystèmes.

Tableau 22 Teneur en humidité des supports

Support	Poids frais W_1 (g)	Poids sec W_2 (g)	$W_1 - W_2$ (g)	Teneur en humidité $(W_1 - W_2) \times 100 / W_2$ (%)
Tourbe	10	9,5	0,5	5,26
Tourbe de France	10	9,1	0,9	9,89
Kaolinite	10	9,25	0,75	8,11
Vermiculite	10	9,47	0,53	5,59
chardon	10	9,03	0,97	10,74

1-2-Le broyage des supports

Le broyage des supports permet l'obtention d'une poudre très fine induisant une meilleure adhérence aux graines selon les travaux de Saint-Macary et Neyra (1992).

1-3-Le volume de l'inoculum absorbé par les supports

Le volume nécessaire optimal est généralement compris entre 60 et 70 % du volume de rétention. En effet, une faible humidité entraîne le dessèchement des *Rhizobium* et une humidité trop élevée provoque leur asphyxie d'après les travaux de Saint-Macary et Neyra (1992). Les résultats sont rapportés dans le tableau 23.

Tableau 23 Volume d'inoculum absorbé par 5 g de support

Support (20g)	Volume d'eau absorbée par le support (ml)	Volume de suspension bactérienne nécessaire (ml)
Tourbe	3,50	2,1
Tourbe de France	4,70	2,82
Kaolinite	3,56	2,14
Vermiculite	3,85	2,31
Chardon	5,25	3,15

1-4-Neutralisation des supports

Le pH des supports a été ajusté entre 6,8 -7 par addition de CaCO_3 . Étant naturellement neutre, la vermiculite ne nécessite pas de neutralisation (Graham-Weiss et al., 1987).

Le tableau 24 rapporte la quantité de chaux nécessaire pour l'ajustement du pH des différents supports.

Tableau 24 La neutralisation des supports

Support	Quantité (g)	pH initial	CaCO_3 ajouté (g)	pH final
Tourbe	10 g	5,32	0,56	6,81
Tourbe de France	10g	6,06	0,22	6,96
Kaolinite	10g	7	0	7

vermiculite	10g	7	0	7
chardon	10g	6,02	0,3	6,94

1-5-Stérilisation des supports

Les supports ont été emballés dans des sachets de polypropylène puis stérilisés 3 fois de suite à 24 h d'intervalle. Par ailleurs un contrôle des supports sur milieu YMA +rouge Congo n'a présenté aucune contamination.

2- Contrôle de qualité de l'inoculum

2-1-L'inoculum liquide

Pour obtenir un inoculum de bonne qualité, il est nécessaire de contrôler sa pureté, son pH et sa température (Vincent., 1970 ; Somasegaran et Hoben., 1994 ; Stephens et Rask., 2000)

2-1-1-Le contrôle de la pureté

Tout au long des manipulations, il a été procédé à une observation constante du milieu, de la couleur et de l'odeur. L'odeur qui doit se dégager est celle de l'extrait de levure et la couleur doit rester claire d'après les résultats de Somasegaran et Hoben (1994).

Un examen microscopique et des cultures sur milieux spécifiques sont également nécessaires et ont permis de constater :

- Des bâtonnets roses lors de la coloration de Gram.
- Des colonies blanchâtres après ensemencement sur milieu YMA + rouge congo.
- Une non acidification du milieu Glucose-Peptide-Agar+ pourpre de bromocrésol au bout de 24 h d'incubation.

Ces résultats montrent que la culture liquide de nos différents isolats est pure comme l'indique les différents travaux de Vincent (1970) , Somasegaran et Hoben (1994) et Stephens et Rask (2000).

2-1-2-Le contrôle du pH

Après l'addition du bleu de bromothymol dans un tube stérile contenant 1-2 ml de milieu de culture, la couleur obtenue est jaune indiquant l'acidité du milieu ce qui concorde avec les résultats de Beck et *al* (1993) sur le *Rhizobium* qui est une bactérie à croissance rapide et provoque des changements de pH en présence du bleu de bromothymol.

2-1-3-Estimation du nombre de *Rhizobium* dans l'inoculum

Le contrôle du nombre de *Rhizobium* dans l'inoculum permet d'estimer le nombre suffisant de cellules vivantes pour l'obtention d'une bonne inoculation. Le nombre de bactéries en fin de production (après 72 h) se situe entre 10^8 et 10^9 cellules vivantes par ml de milieu (figure 27) Ces résultats correspondent à ceux obtenus par Montange et Beunard (1984) et Somasegaran et Hoben (1994).

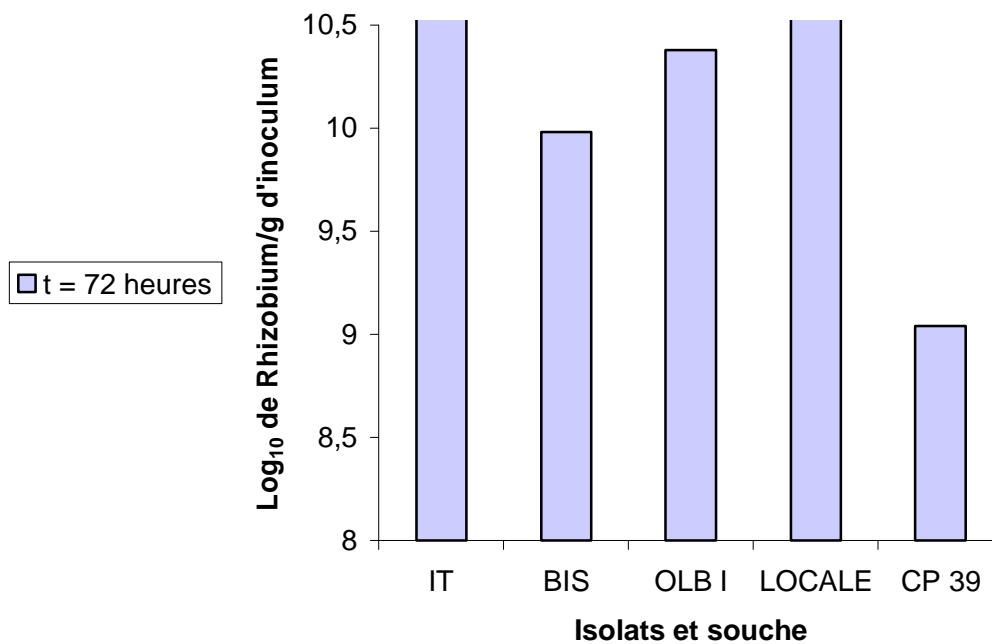


Figure 27 Estimation du nombre de Rhizobium dans l'inoculum liquide après 72 heures

2-2- L'inoculum solide

La qualité de l'inoculum formulée dans tous les supports utilisés en l'occurrence la tourbe sous deux formes : locale et importée, la kaolinite, la vermiculite et le chardon a été testé par observation microscopique et détermination du nombre de cellules bactériennes dans l'inoculum.

2-2-1-Observation microscopique

La coloration de Gram des échantillons provenant des différents types d'inoculum montre des bactéries Gram négatif correspondant aux résultats de Vincent (1970) ; Bloem et *al* (2002), ce qui nous permet de s'assurer de l'absence de contamination des inoculums.

2-2-2-Détermination du nombre de *Rhizobium* dans l'inoculum

Les normes du nombre de *Rhizobium* par gramme de supports doivent être d'au moins 5×10^8 cellules (Beck et *al.*, 1993). Cependant il n'y a pas de normes internationales, car ces taux diffèrent d'un pays à un autre (10^6 / g au Canada à 10^9 / g en Australie et en Hollande) (Beck et *al.*, 1993).

Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 28, 29, 30, 31,32 et les tableaux 45, 46, 47, 48,49 (Annexe 3).

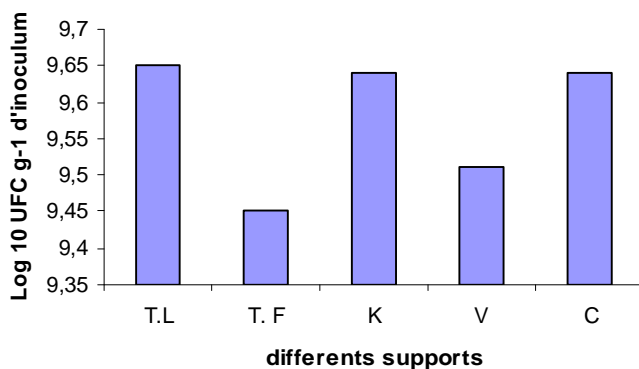


Figure 28 Nombre de *Rhizobium* de l'isolat IT dans les différents supports d'inoculum

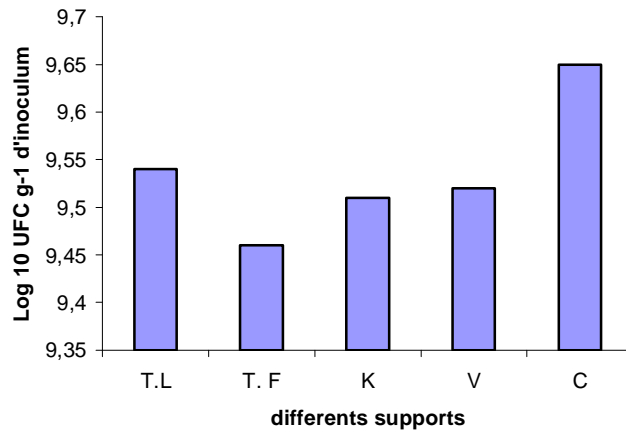


Figure 29 Nombre de Rhizobium de l'isolat BIS dans les différents supports d'inoculum

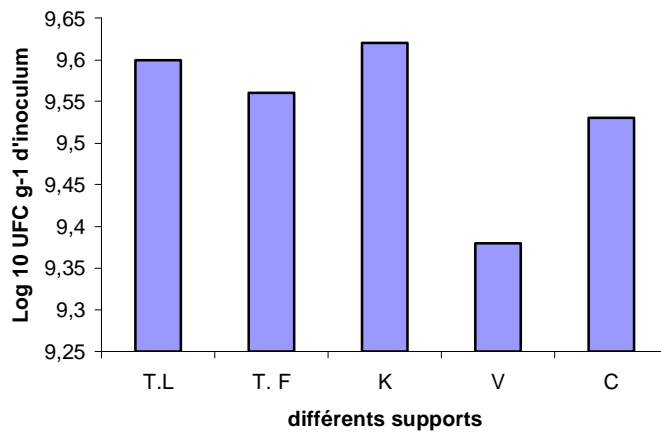


Figure 30 Nombre de Rhizobium de l'isolat LOCALE dans les différents supports d'inoculum

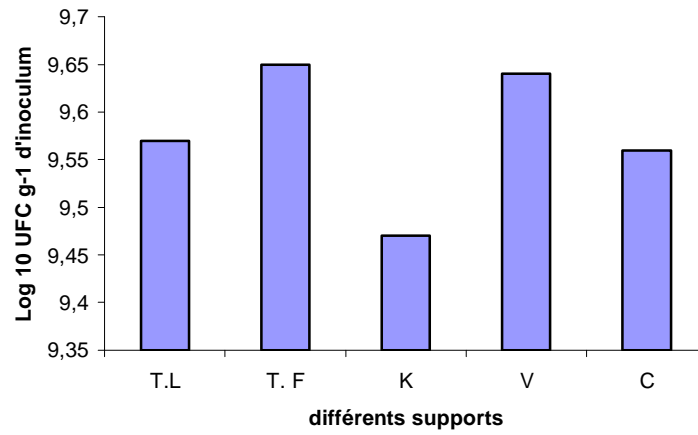


Figure 31 Nombre de Rhizobium de l'isolat OLB I dans les différents supports d'inoculum

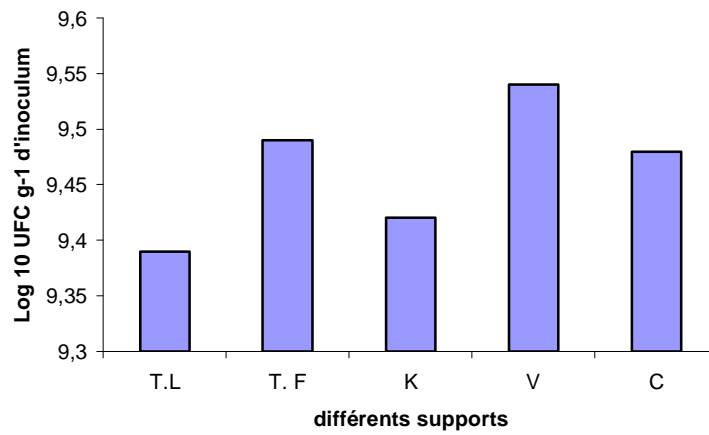


Figure 32 Nombre de Rhizobium de l'isolat CP 39 dans les différents supports d'inoculum

D'après les différents histogrammes, on note que le nombre de bactéries dans les inoculums solides dépasse les 2×10^9 cellules, et donc largement la norme établie par Beck et al (1993) (5×10^8 cellules).

2-2-3-Suivi de la croissance des *Rhizobia* dans les différents inoculums

L'étude des différentes courbes du suivi de la croissance (33;34 ;35 ;36 ;37) dans les différents inoculums montre que les isolats : IT, BIS, LOCALE, OLB I ainsi que la souche de référence CP 39 sont aptes à survivre dans tous les supports utilisés après une conservation de 30 jours.

Toutefois une décroissance du nombre de cellules de *Rhizobium* est observée dès le premier jour.

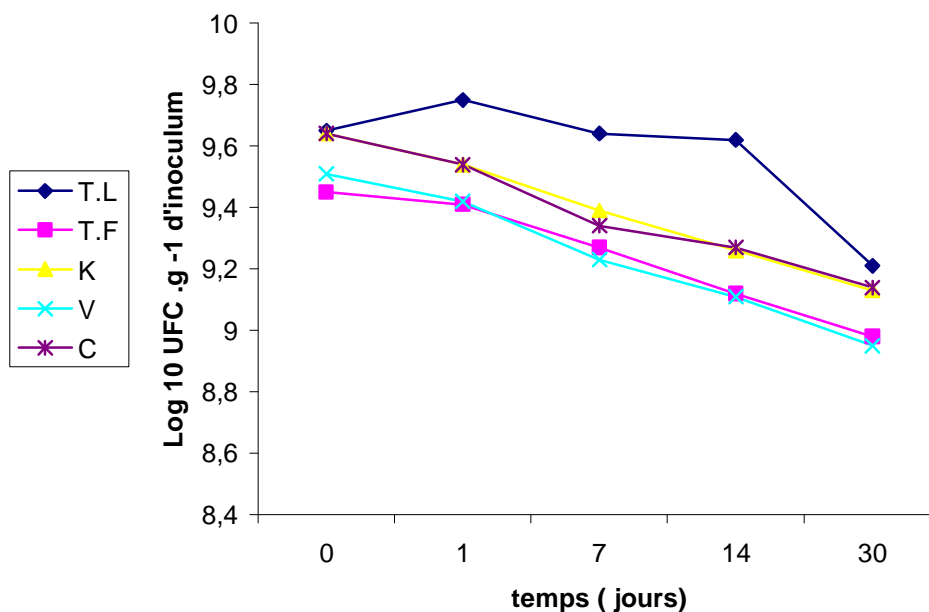


Figure 33 Nombre de cellules vivantes de l'isolat IT sur les différents supports utilisés

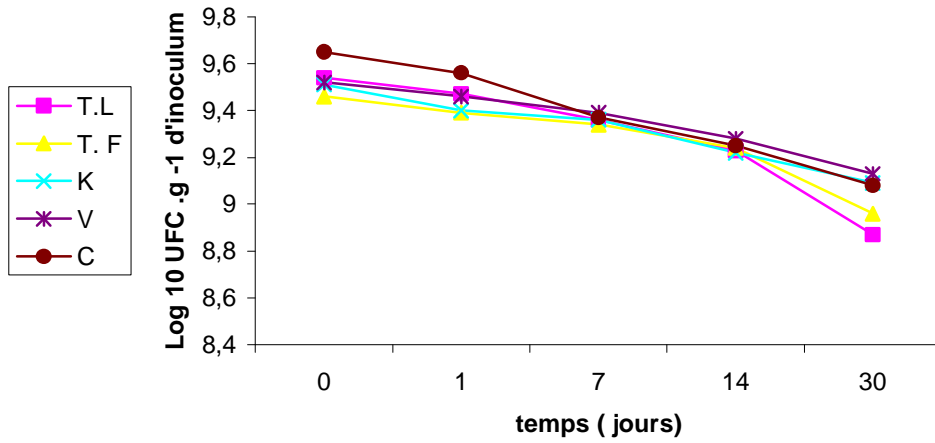


Figure 34 Nombre de cellules vivantes de l'isolat BIS sur les différents supports utilisés

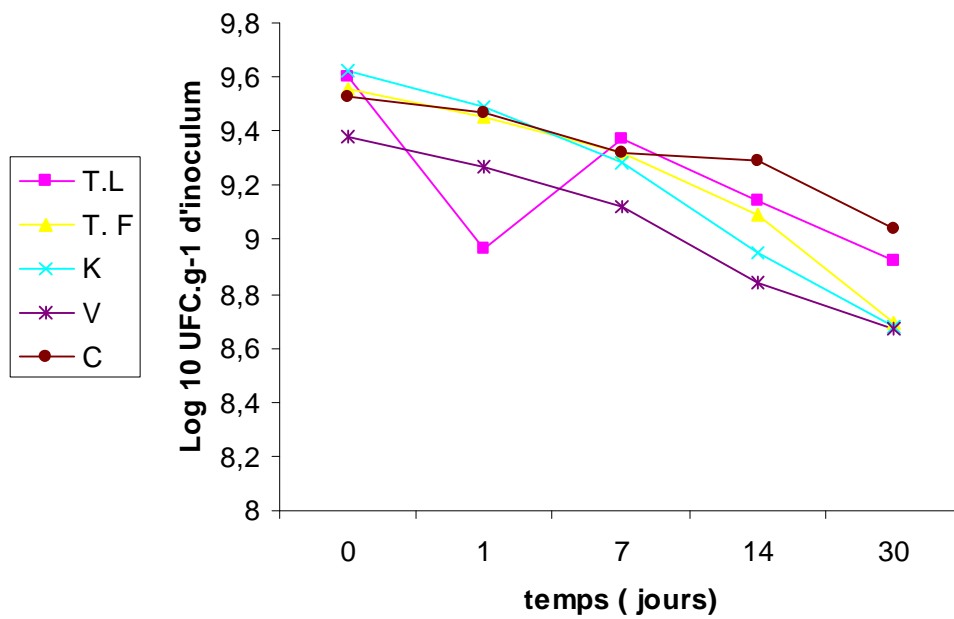


Figure 35 Nombre de cellules vivantes de l'isolat LOCALE sur les différents supports utilisés

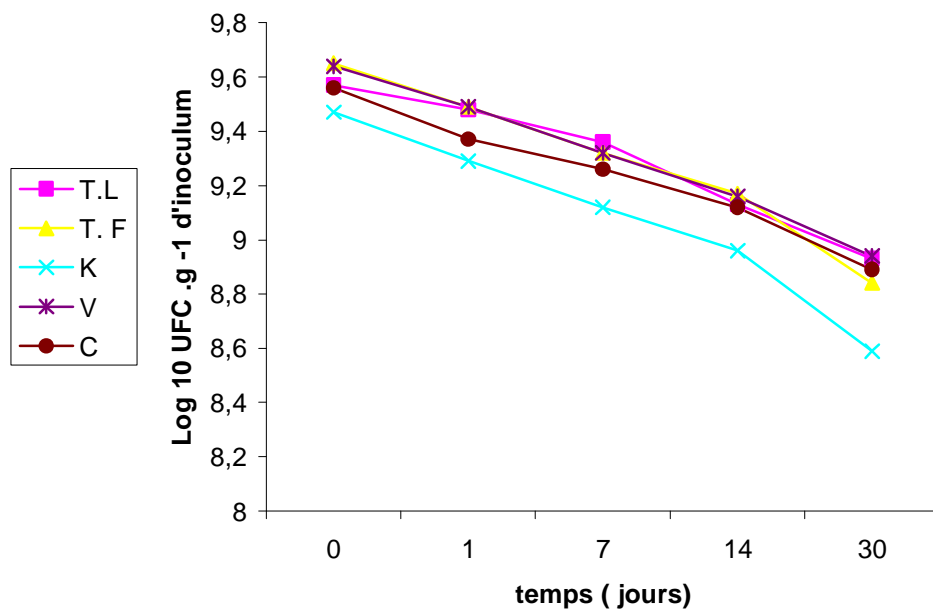


Figure 36 Nombre de cellules vivantes de l'isolat OLB I sur les différents supports utilisés

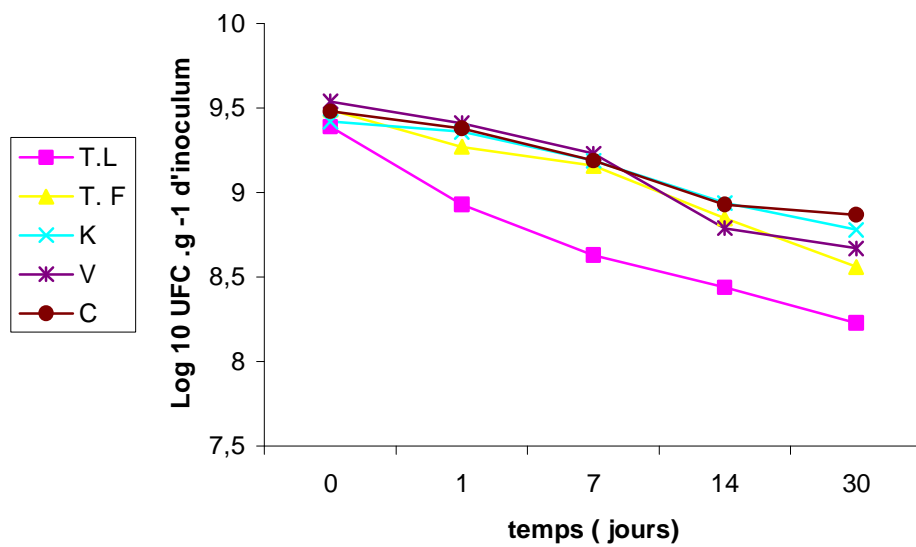


Figure 37 Nombre de cellules vivantes de l'isolat CP 39 sur les différents supports utilisés

Dans le cas de l'isolat IT sur la tourbe locale comme support, une croissance est observée après le deuxième jour, ce qui est due à l'adaptation des *Rhizobium* aux supports, pour ensuite décroître juste après et jusqu'à la fin de la période de conservation.

L'analyse des courbes montre également qu'il n'y a pas une différence significative entre les isolats choisis et la souche de référence. Ce facteur de ressemblance entre les souches a été également cité dans les travaux de Daza et al (2000) et Feng et al (2002).

La survie des isolats CP 39, OLB I, IT, BIS et LOCALE dans les différents supports utilisés a montré une bonne croissance des différents isolats ce qui indique que tous les supports utilisés sont aptes à servir de support d'inoculum.

3-L'inoculation des graines

Lors de nos travaux, deux méthodes d'inoculation ont été testées : l'enrobage suivant la méthode des pellets, et la méthode liquide à base de tourbe.

La méthode d'enrobage de la graine avec le support est très largement pratiquée pour les graines de petites tailles des plantes fourragères (Beck et al., 1993). Elle permet essentiellement la protection des graines de la lumière et la sécheresse (Somasegaran et Hoben., 1994) et ainsi une meilleure conservation des *Rhizobium* sur les graines en les protégeant également de l'acidité du sol et les fertilisants acides selon les résultats de Duquenne et al (1999). (Figure 38).

3-1- Le nombre de *Rhizobia* par graine enrobée

Le nombre de cellules vivantes par graine des isolats IT, BIS, LOCALE, OLB I ainsi que la souche témoin CP 39 est rapporté dans les tableaux 29, 32, 39, 41 et 34 (Annexe 3)



Figure 38 Graines enrobées par le support

Le nombre de *Rhizobium* par graine enrobée par les différents supports d'inoculum à l'aide d'une solution adhésive (gomme arabique 20% ou saccharose 10%) sont représentés graphiquement dans les figures 39 ; 40 ; 41 ; 42 ; 43.

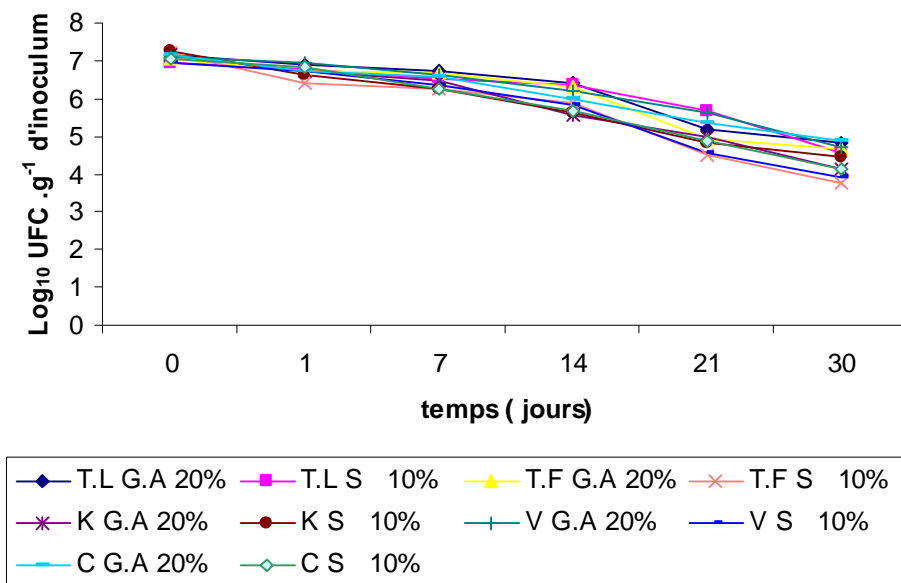


Figure 39 Survie de l'isolat IT sur les différents types de supports suivant les adhésifs utilisés

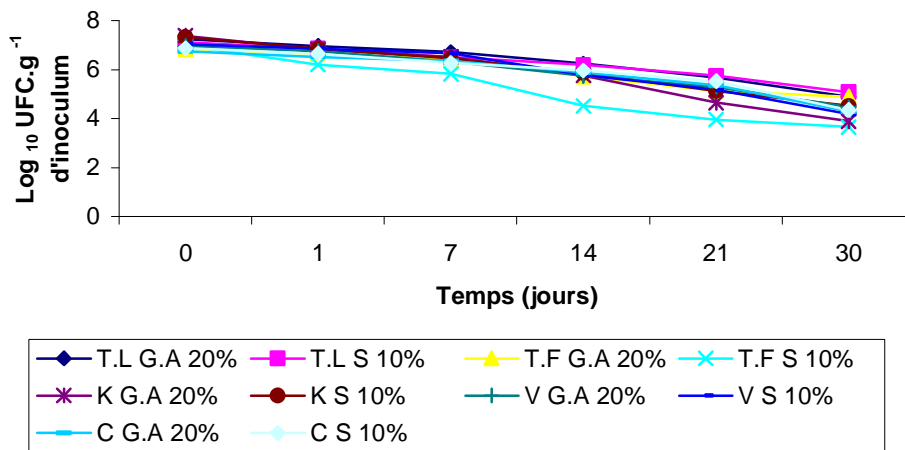


Figure 40 Survie de l'isolat BIS sur les différents types de supports suivant les adhésifs utilisés

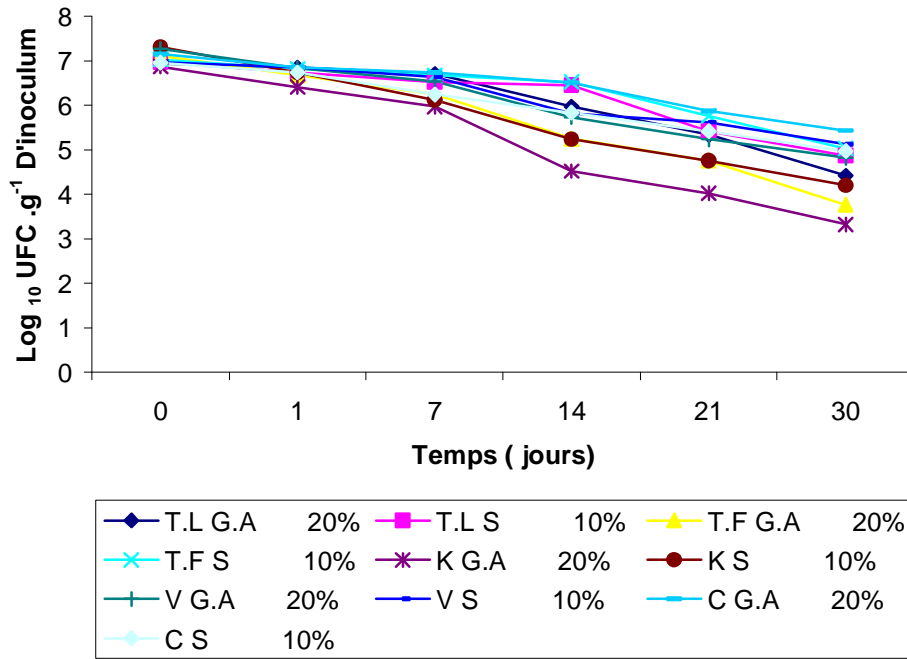


Figure 41 Survie de l'isolat LOCALE sur les différents types de supports suivant les adhésifs utilisés

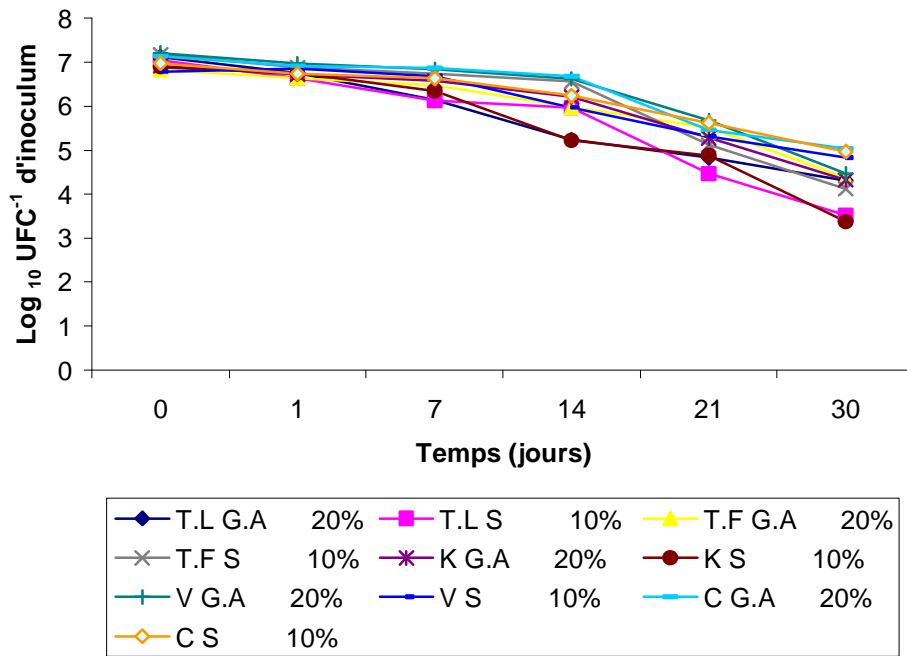


Figure 42 Survie de l'isolat OLB I sur les différents types de supports suivant les adhésifs utilisés

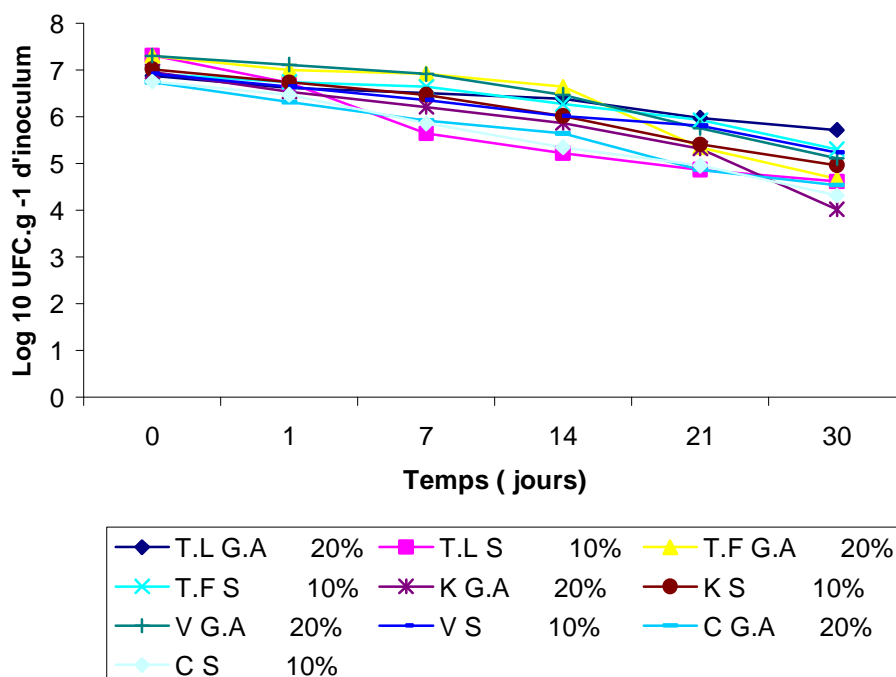


Figure 43 Survie de l'isolat CP 39 sur les différents types de supports suivant les adhésifs utilisés

L'examen des courbes représentées dans les figures 39 ; 40 ; 41; 42 ; 43 montre que la diminution du nombre de cellules par gramme des différents isolats : IT, BIS, LOCALE, OLB I ainsi que la souche témoin varie selon le type de support et de l'adhésif utilisés.

3-2- La méthode liquide à base de tourbe

La comparaison entre les deux méthodes utilisées (l'enrobage et la méthode liquide à base de tourbe) a montré que la méthode liquide à base de tourbe (tableau 25) donne une meilleure nodulation ce qui correspond aux résultats de l'étude faite par Islam et Afandi (1980) qui ont montré que l'inoculation par la méthode liquide à base de tourbe semble être la meilleure par rapport aux autres méthodes étudiées, car elle donne une meilleure nodulation (nombre et

Tableau 25 Influence de la méthode d'inoculation sur le nombre de nodules

	Nombre de nodules /plante				
	X88TH301	FLIP 85-55	ILC 482	ILC 3279	FLIP 84-92
Enrobage	20	23	20	24	19
Méthode liquide	25	26	24	29	23

poids sec nodulaire élevés) comparativement aux autres. Dans cette dernière, l'eau ajoutée à la culture semble assurer une meilleure distribution des Rhizobium dans la

rhizosphère, ce qui permet une meilleure nodulation. Ces résultats ont été également obtenus par Rupela et Saxena (1987).

4-Effets de différents facteurs sur la survie des bactéries dans l'inoculum

4-1- Effet du support

D'après les différentes figures 33 , 34 , 35 , 36 , 37 représentant la survie des inoculums sur les différents supports, on note qu'il n'existe pas de différences significatives dans l'utilisation des supports, ceci concorde avec les axes de recherches développés par Daza et al (2000) sur la tourbe et la perlite ainsi que les travaux de Temprano et al ., (2002) sur la vermiculite, la perlite et la tourbe.

D'après les travaux de Stephens et Rask (2000) il est noté que le support doit présenter deux propriétés fondamentales : permettre la croissance des microorganismes en place et les maintenir sur une période acceptable de conservation, par conséquent le support joue un rôle très important dans la qualité de l'inoculum produit.

4-2- Effet de la température de conservation :

La conservation des inoculums est faite à deux températures : 25°C et 4°C et les résultats sont rapportés dans le tableau 26

Tableau 26 Effet de la température de conservation sur la survie et la croissance des *Rhizobium*

Températures (C)	Moyennes de Log ₁₀ UFC. g ⁻¹ d' inoculum				
	IT	BIS	LOCALE	OLB I	CP 39
4°	9,51	8,89	9,49	9,14	8,95
25°	9,11	8,53	9,08	8,76	8,52

D'après le tableau, il apparaît une grande différence entre la conservation à 4°C et celle à 25°C. En effet, on note que les supports conservés à 4°C contiennent

un nombre plus important de cellules vivantes par gramme de support que ceux conservés à 25°C (Figure 44). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Daza et al (2000) indiquant que les supports à base de perlite ou de tourbe conservés à 4°C ont un nombre plus élevé en cellules vivantes que les supports conservés à 25°C . En effet, la température joue également un rôle très important dans la qualité de l'inoculum. La température de 4°C est plus favorable à la conservation de l'inoculum.

4-3- Effet du temps de conservation de l'inoculum sur le nombre de *Rhizobium* :

Le temps a un effet significatif sur le nombre de cellules vivantes par gramme d'inoculum (tableau 27 et figure 45).

Tableau 27 Effet de conservation de l'inoculum sur le nombre de *Rhizobium*

	Moyenne de Log UFC .g ⁻¹ d'inoculum				
	IT	BIS	OLB I	LOCALE	CP 39
0	9,65	9,38	9,52	9,64	9,42
1	9,25	8,87	9,02	9,21	8,96
7	9,55	9,24	9,34	9,52	9,11
14	9,24	8,96	8,94	9,29	8,91
30	9,10	8,86	8,89	9,02	8,76
45	8,95	8,78	8,83	8,95	8,63

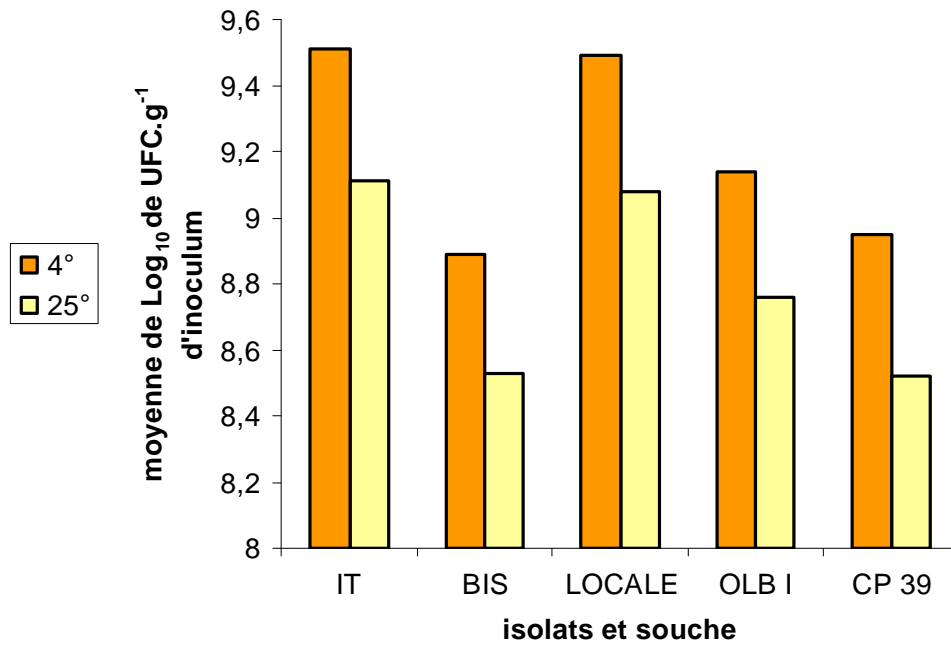


Figure 44 Effet de la température de conservation sur l'inoculum

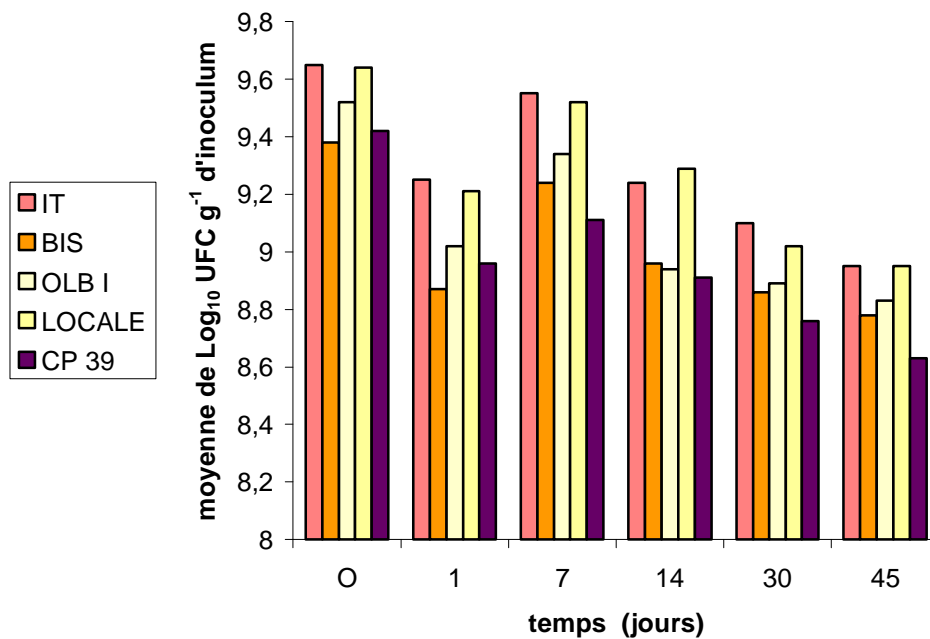


Figure 45 Effet du temps de conservation sur le nombre de bactéries dans l'inoculum

Le nombre de cellules vivantes par gramme d'inoculum décroît d'une façon importante pour tous nos isolats de même pour la souche témoin et cela après 45 jours de conservation. Cette décroissance est due, d'après les études de Feng et *al.*, 2002, à une diminution de l'humidité des supports et du manque d'oxygène ainsi que leur pauvreté en éléments nutritifs. Ces auteurs suggèrent que c'est un changement de milieu pour les bactéries qui est à l'origine de cette décroissance. En effet le milieu de culture propre à la croissance bactérienne est plus riche alors que celui substitué par le support d'inoculum est un milieu pauvre.

L'observation de la croissance des *Rhizobia* entre le deuxième jour et la deuxième semaine de conservation est probablement due à l'adaptation de la bactérie au nouveau milieu et à l'utilisation des éléments nutritifs disponibles. Enfin vient après une autre phase de décroissance qui est due cette fois-ci, d'après les résultats de Daza et *al.*, 2000, Temprano et *al.*, 2002 et Feng et *al.*, 2002, à l'épuisement des éléments nutritifs dans le milieu, à la dessiccation et à la concentration basse en oxygène dans les sachets d'emballage.

Discussion
Générale
Et
Conclusion

Discussion générale et Conclusion

Le premier objectif de notre travail a été d'isoler les souches de *Rhizobium* à partir des sols collectés dans différents sites de l'est et l'ouest Algérien et de les caractériser.

Les bactéries isolées présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux de la souche témoin CP 39 à croissance rapide cités par Jordan et al (1984) : la croissance sur milieu YMA + Rouge Congo a donné des colonies blanchâtres alors que sur milieu GPA + Pourpre de bromocrésol la croissance est presque inexistante et le milieu n'est pas acidifié. La coloration de Gram révèle des bâtonnets roses écartant ainsi toute contamination.

Ayant le même aspect morphologique sur milieu YMA, les deux genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* ont subi un test biochimique distinctif qui a sélectionné des souches qui ont donné des résultats négatifs au test de précipitation de Calcium-glycérophosphate.

L'identification des bactéries isolées doit obligatoirement passer par un test symbiotique en réalisant un test de nodulation pour authentifier les souches obtenues. Ces deux tests, de nodulation et la précipitation du Ca-glycérophosphate nous ont permis de sélectionner 14 souches : IT, CHA, KENT, BIS , DJ I, DJ II, BAT , AIN , KEN I, KEN II, OLB I , OLB II, ILC et LOCALE.

La détermination du temps de génération (entre 2 et 4 heures) a permis de classer les isolats dans la catégorie des bactéries à croissance rapide, ceci nous a permis de déterminer la vitesse de croissance des souches ainsi que le temps nécessaire pour la production d'inoculum : la souche la plus rapide est DJ I qui a atteint $270 \cdot 10^9$ *Rhizobium* /ml au bout de 24 heures.

Tous les caractères nutritionnels et biochimiques effectués sur les isolats (source de carbone, source d'azote, résistance aux antibiotiques, à la température, aux différents pH et aux concentrations élevées en NaCl) nous laisse penser qu'il s'agit du genre *Mesorhizobium* (Jarvis, 1997) :

Les tests nutritionnels ont montré la capacité des *Rhizobium* à utiliser une grande chaîne de glucides comme source de carbone et tous les acides aminés utilisés, mis à part la valine, ne constituent pas une bonne source d'azote.

La résistance aux antibiotiques des isolats testés a montré que la concentration minimale inhibitrice (CMI) est différente pour chaque isolat, et les souches : IT, BIS, OLB I, et LOCALE ont la plus forte résistance aux différents antibiotiques.

C'est l'effet de la température qui a permis une distinction entre les différentes souches et leurs sites de collecte. En effet, la température optimale de croissance varie de 28°C à 35°C alors que la température maximale observée varie de 35°C à 40°C , c'est le cas pour les souches : IT, CHA, KENT, BIS, BAT, AIN, KEN I, ILC et LOCALE.

L'analyse des caractéristiques phénotypiques des isolats a montré qu'ils ont une grande tolérance au stress salin : jusqu'à 10% pour les isolats KENT, BIS, DJ I, OLB I, ILC, LOCALE. Nous estimons que ces isolats pourraient sécréter des molécules osmoprotectrices leur permettant de résister à des fortes salinités (Nour et al ; 1995).

La plus part des souches : BIS, DJ I, BAT, AIN, KEN I, KEN II, OLB I, OLB II, ILC, LOCALE tolèrent beaucoup plus un pH alcalin qu'un pH acide.

L'indice de ressemblance de chaque isolat calculé à partir des résultats des tests culturaux, nutritionnels et biochimiques, nous a permis de classer nos isolats en 2 classes différentes suivants les travaux effectués par Maâtallah et al (2002) : la première classe avec un seuil de 70% -80% regroupe les isolats OLB I, KEN II et KENT et la deuxième classe avec un seuil de 80%-90% regroupe les souches :BIS, DJ II, LOCALE, DJ I, BAT, IT ,CHA, OLB II, ILC, AIN et KEN I .

Les tests morphologiques, culturaux, biochimiques et nutritionnels nous ont permis de choisir 4 isolats pour poursuivre notre travail dans la fabrication d'inoculum. Ces isolats sont : IT, BIS, LOCALE et OLB I.

La production d'inoculum liquide a été réalisée dans des fermenteurs, ce qui nous a permis de produire des inoculums de bonne qualité, que les différents tests de contrôle de qualité (coloration de Gram, croissance sur YMA+RC, contrôle du pH) ont prouvés.

Le nombre de *Rhizobium* /ml de milieu dépasse les normes standards de 10^4 *Rhizobium* /ml de milieu et la plupart des isolats ont atteint 10^{10} *rhizobium*/ ml de milieu.

Le suivi de la croissance et la survie des bactéries dans les différents supports de conservation est pratiquement comparable à celui de la souche de référence CP 39. Ceci nous permet de dire que les différents isolats sélectionnés ont une bonne capacité de survie dans l'inoculum particulièrement les isolats IT et LOCALE.

Malheureusement les tests sur l'effet du temps de conservation des *Rhizobium* dans l'inoculum ont prouvé qu'après deux jours à une semaine de

conservation, une décroissance significative du nombre de Rhizobium dans l'inoculum est observée. Cela nous amène à dire qu'une longue conservation (plus de deux jours) n'est pas recommandée pour l'obtention d'un inoculum de bonne qualité en rapport avec l'une des propriétés d'un bon support décrites par Montage et al. (1984).

Le test sur le support d'inoculum qui a porté sur les différents types : (la tourbe locale et importée, la kaolinite, la vermiculite et le chardon) a indiqué que la survie des bactéries n'est pas affectée par ces supports. Ceci indique qu'ils sont de bons supports pour la production d'inoculum.

La température de conservation la plus favorable est 4°C. A une température de 25°C, une décroissance significative du nombre de Rhizobium par gramme d'inoculum est observée.

L'inoculation des semis a été faite de deux façons : l'enrobage suivant la méthode des pellets et la méthode liquide a base de tourbe. Ces deux méthodes ont eu sensiblement le même résultat ($> 10^6$). Mais la méthode d'enrobage a été plus performante. Les supports choisis se sont avérés de bonne qualité pour l'inoculation des graines et cela en utilisant les deux types de solutions adhésives choisies (Saccharose 10% et gomme arabique 20%).

Les tests d'inoculation en pot ont montrés que tous les inoculums fabriqués ont provoqué la nodulation des plantes, mis à part le chardon qui n'a donné aucun nodule. Ceci peut être expliqué par une mauvaise manipulation.

Au terme de nos différentes expérimentations il serait intéressant de :

- ◆ Mesurer l'efficacité des bactéries (activité acétylène-réductase),
- ◆ Essayer la technique de la double inoculation avec les bactéries solubilisant le phosphate.

- ◆ Caractériser génétiquement le genre *Mesorhizobium* ce qui va permettre une meilleure compréhension des mécanismes de fixation de l'azote atmosphérique (gène *nif*), et réussir à transférer cette capacité aux plantes pour leur permettre de fixer elles-mêmes l'azote, ce qui éviterait l'usage d'engrais azotés.

Références Bibliographiques

Abbas M., Monib M. ,Rammah A. , Fayez M. , Hegazi N. 2001. Intercropping of (*Sesbania sesban*) and leuceana (*Leucaena leucocephala*) with five annual grasses under semi-arid conditions as affected by inoculation with specific rhizobia and associative diazotrophs . Agronomie 21 : 517-525.

Adjei M.B., Quesenberry K.H., Chambliss C.G., 2002. Nitrogen fixation and inoculation of forage legumes.

Alagawadi A.R., Gaur A.C.1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate – solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* .L Moench) in dry land . Trop.Agric .69:347-350.

Anonyme. 2004. [http:// bacterio.cict.fr](http://bacterio.cict.fr). List of bacterial. Site visité le 22.11.2004.

Anonyme. 2004. Techniques d'inoculation et d'enrobage des semences de légumineuses <Http://agroecologie-cirad .fr>

Anonyme a. 2003. Pois chiches (*Cicer Arietinum*). <www.Legume –sec.com>

Anonyme b. Legumineuses. Site visité le 22.12.03
<http://membres.lycos.fr/fafawaroux/legumine.htm>

Anonyme C. 2004. Information about the family leguminosea. International legume database & information service.<www.ILDIS.UK>

Anonyme d. 1994. Analyse statistique de l'évolution de la culture des principaux produits agricoles durant la période 1964-1994. DSAEE. Ministère de l'agriculture, Alger.

Anonyme e. Biological Nitrogen Fixation. Page web, consultée en janvier 2004:
<www.national forage and grasslands curriculum>

Anonyme f . 2004. Biologie moléculaire de l'interaction plante –Rhizobium. Page Web: <www .isv.cnrs-gif.fr>.

Anonyme g. 2004 .symbiotic nitrogen fixation [.www.nitrogen fixation /documents/fixation.htm](http://www.nitrogen fixation /documents/fixation.htm)

Anonyme h. 2004. Nitrogen fixation process. www.legume nitrogen fixation and transfer.com

Anonyme i. 2001. Cinquième conférence des états parties chargée de l'examen de la convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou aux toxines et sur leur destruction. BWC/CONF.V/4, 14 Sep 2001.

Anonyme J. 2004. The science of inoculation. Becker Underwood. www.beckerunderwood.com.

Anonyme k. 2003. Encyclopedie Encarta

Aouani M.E, Mhamdi R., Mars M., Elyeb M., Ghrir R. 1997. Potential for inoculation of common bean by effective rhizobia in Tunisian soil. *Agronomie* 17: 445-454.

Aouani M.E., Mhamdi R. , Jebara M . , Amaarger N. 2001. Characterisation of *rhizobia* nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie* 21:577-581.

Baraibar A., 2000. Rhizobium inoculants formulations, field performance and inoculation procedures.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. 1993. Practical *Rhizobium* –legume technology manual, .ICARDA (Ed), Syria, P.389.

Begum A., Gafur M.A. 2001. Studies on the root distribution and their effect on growth performance of fast growing tree species .*Bengladesh journal of botany* 18(1):51-56.

Belimov A.A.,Kojemiakov A.P., Chuvarliyeva C.V.1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate – solubilizing bacteria . *plant and soil* .173: 29- 37.

Bergersen F.J. 1980.Methods for evaluating biological nitrogen fixation .Edition John Wiley et sons.

Beuerlein J.2003. Ohio Soybean inoculation study. The Ohio state university.

Bisseling T., Geurts R., Franken C., Limpens E., Smit P. 2004. Nod factors perception and transduction . www.gbm-online.de

Bloem J.F., Botha W.J., Law I.J., Steyn P.L.2002. Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U45 , Microbial.Res. 157: 1-10.

Brick M.A., 2002. Fertilizing dry bean .Soil and crop. In www.ext.colostate.edu

Brockwell J., Gault R.R .,Chase D.L., Hely F.W., Zorin M and Corbin J.E.1980. An appraisal of practical alternatives to legume seed inoculation :field experiments on seed bed inoculation with solid and liquid inoculants .Aust.J.Agric.RES .31:47-60.

Brockwell J. 1982. Inoculation methods for field experiments and farmers P.211-227. In J.M. Vincent (Ed) , Nitrogen fixation in legumes .Academic Press. Australia.

Brockwell J., Bottomley P.J., and Thies J.E.1995.Manipulation of *Rhizobia microflora* for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant soil .174: 143-180.

Burton J.C.1981.*Rhizobium* inoculants for developing countries .Trop.Agric. (Trinidad) 58: 291-295.

Chen W.X. ; Yan G.H. ; LI J.L. (1988). Numerical taxonomic study of fast – growing Soybean *Rhozobia* and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen.nov.Int.J.Sy.Bacterial . 38:392-397.

Cleyet-Marel J. C., Dibonito R., Beck R. 1990. Chickpea and its root-nodule bacteria: implications of their relation ship for legume inoculation and biological nitrogen fixation, option Méditerranéenne – Série Séminaire N° 9 pp. 101-106.

Cleyet-Marel J. C. 1992. Evaluation du pouvoir de compétition des souches de *Rhizobium* pour la formation des nodosites. In FAO. (Ed.) , fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote. Rome.

Date R.A. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of tropics. *Field Crops Res.* 65: 123-136.

Daza A. , Santamaria C. , Rodriguez-Navarro D. N. Camacho M . , Temprano F. 2000 . Perlite as carrier for bacterial inoculants . *Soil Biol . & Biochem .* 32 : 567 – 572.

Dedio W. , Kaltsikes P.J., Larter E.N., 1969. Numerical chemo taxonomy in the genus *secale*. *Can. J.Bot* : 1175-1180.

Denarie J., 2000. Les symbioses racinaires, dans le monde végétal, du génome à la plante entière. Académie des sciences, rst n° 10. Editions TEC et DOC.

Dilworth M.J., 1966 . Acetylen reduction by nitrogen –fixing preparations from *clostridium pasteurinum*.*Biochem.Biophys.Acta-Oxford.V.127.P.285-294.*

Dovel R.L., Vietor D.M., Weaver R., 1993. Effects of media N content and rhizobial strain on N₂ fixation and partitioning in *Leucaena seedlings*. *J. Range Manage* 46 : 512-515.

Duquenne P., Chenu C.,Richard G.,Cataroux G. 1999. effect of carbon source supply and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. *FEMS.Microbiol.Ecol*: 29:331-339.

Elmerich C., 2003. Fixation de l'azote et interactions bacteries-plantes. www.pasteur.fr

Evers G.W. 2003. Nitrogen fixation process. Site web: www.legume nitrogen fixation and transfer.com

Feki S., Aouani M.E., Mhamdi R., Jebara M., Mars M., Ghrir R. 1998. In fixation symbiotique de l'azote et developpement durable dans le bassin méditerranéen. Carthage, 1998 et Montpellier, 2000 (Ed) INRA, Paris 2003 (les colloques, n° 100).

Feng L. , Roughley R.J. , Copeland L. 2002. Morphology changes of *Rhizobium* in peat cultures . Appl. Environ . Microbiol. 68: 1067 -1070.

Gaur Y.D., Sen A.N., 1981. Cross inoculation group specificity in Cicer Rhizobium symbiosis .New Physiology ,83:745-754.

Gibson A.H. 1980. Methods for legumes in glass houses and controlled environment cabinets. P. 139- 184 in F.J. Bergersen . (Ed.) .Methods for evaluating biological nitrogen fixation . John Wiley & Sons Ltd.

Giller K.E. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems 2end Ed., CAB. International Walling Ford, ISBN : 0859472.p. 423.

Glick B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria.Can.J.Microbiol. 41:109-117.

Graham P.H. 1992. Commercialization of soil microbial technologies .In Blaine .F et Metting .JR. (Ed) . Soil Microbial Ecology. Application in agricultural and Environmental Management .Marcel Dekker .INC., New York. P.595-618.

Graham P.H. (1994). Legume nodule symbiosis: In Methods of soil analysis .Part 2. Microbiol and Biochemical properties book series n°5., pp199-222.

Graham P.H., Vance C.P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use, plant physiol. 131 : 872-877.

Graham-Weiss L., Bennett M.L. Paau A.S., 1987. Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. Appl. Environ. Microbiol .53:2138-2140.

Groppa .M.D., Zawoznik .M.S., Tomaro.M.L. 1998. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants.Eur.J.Soil biol. 34: 75 -80.

Gunasekaran S., Balachandar D., 2000. Rhizobium and phosphobacteria: an avenue for increasing productivity in pulses.

Halliday J. 1981. Agrotechnologies based on symbiotic systems that fix nitrogen. Chapter IX .

Hamadache A et Ait Abdallah F. 1998. Lutte contre les adventices en culture du pois chiche d'hiver : un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce .céréaliculture N°33 ISSN 1011-9582.

Hamadache A., Boulafa H., Aknine M., 1997. Mise en évidence de la période de sensibilité maximale du pois chiche d'hiver envers les mauvaises herbes annuelles dans la zone littorale. Céréaliculture. 31 :25-28.

Hamaoui B ., Abbadi J.M. , Burdman S. , Rashid A. ,Sarig S. , Okon Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions .Agronomie 21: 553-560.

Herridge D., Gemell G., Hartley E. 2002. Legume inoculants and quality control in: Herridge D. (Ed) Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam, ACIAR proceeding 109e .pp. 105-115.

Hoben H.J., Aung N.N., Somasegaran P. ET Kang U. 1991.Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. And *Bradyrhizobium* spp . on inoculated seeds, World j.Microbiol.Biotech. 7: 324-330.

Hopkins W.G., 1999. Introduction to plant physiology, second edition. John Wiley and sons, Inc.

İçgen B. , Ozcengiz G. ,et Alaeddinoglu N . G. 2002. Evaluation of symbiotic effectiveness of various *Rhizobium cicer* strains , Res .Microbiol. 153 : 369- 372.

Igual J.M. , Valverde A., Cervantes E . Velázquez E. 2001. Phosphate- solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study . *Agronomie* 21: 561-568.

Islam R. and Afandi F. (1980). Effect of methods of inoculation on nodulation and yield of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 2: 18-19.

Jarvis B.D.W., Vanberkim P., Cher X ., Nour S.M. ; Fernandez M.P. ; Cleyet-Marel J.C., Cillis M. 1997. transfer of *Rhizobium loti* , *Rhizobium huakuri*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneums* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. *Int.j.Syst .bacteriol.* 49, 895-898.

Jebara M., Drevon J.J., Aouani M.E. 2001. Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native Rhizobia from Tunisian soils , *Agronomie* 21: 601-605.

Jordan D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae .In *Bergey's manual of systematic Bacteriology* .Vol 1. Edited by N.R.Krieg and J.G.Holt .Williams &Wilkins., Baltimore, Ed ., p243-256

Jordan D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen .nov. a genus of slow-growing , root nodule bacteria from leguminous plants , *Int.J.Syst. Bacteriol.*32:136-139.

Journet E.P. 2004. symbioses racinaires . Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais . [www .crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr)

Kannaiyan S., Govindarajan K., Kumar K., Chendrayan K., 2000. Use of biofertilizers for increasing pulse production.

Kerstens K., Deley J. 1984. Genus III .*Agrobacterium*. Conn 1942.P.224-225 in B.Holt.,J.C.Krieg.,P.H.A.Sneath , J.F.Staley.,S.T.Williams.(ed), *Bergeys manuel of systematic bacteriology*.9th edition .the Williams and Wilkins CO.Baltimore.

Khavazi K., Rejali F. 2000. Perlite as a carrier for soybean inoculant. Xth international colloquium for the optimization of plant nutrition .Cairo, Egypte.

Kloepper J.W. , Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, in : Gibert- clarey , tours publishing .Proceedings on the IVth International conference on plant pathogenic bacteria , Vol.2 , station de pathologie végétale et phytobacteriologie.INRA ,Angers , France.pp :879-882.

Kyei-Bohan S., Sllnkard A.E. ET Walley F. L. 2002. Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. Agronomie. J. 94: 851- 859.

Lindstrom K., Lehtomki S.1988.Metabolic properties, maximum growth, temperature and phage sensitivity.

Liu P.H., Gan Y., Warkentin T., McDonald C. 2003. Morphological plasticity of chickpea in a semiarid environment. Crop Sci. 43:426-429.

Loynachan T. 2003. Nitrogen fixation by forage legumes.page Web visitée le 14 decembre 2003.

Lupwayi N.Z., Olsen P.E., Sande E.S., Keyser H.H., Collins M.M., Singleton P.W et Rice W.A. 2000. Inoculant quality and its evaluation .Field crops Res .65: 259-270.

Maâtallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C.2002. Phenotypic characterization of Rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in moroccan soils. J.Agro.22:321-329.

Madsen E.L., Alexander.M.1982.Transport of Rhizobium and pseudomonas through soil. Soil Sci .Soc .Am.J.46: 557-560.

Mazliak P., 1981. Physiologie végétale, nutrition et métabolisme .Chapitre 4 : nutrition azotée. Ed Hermann. pp174-237.

McDermott T.R., Graham P.H. 1989. Bradyrhizobium japonicum inoculant, mobility, nodule occupancy and acetylene reduction in soybean root system. *Appl Environ Microbiol.* 55:2493-2498.

Minchin F.R., Summerfield R.J., Hadly P., Robert E.H. 1980. Growth, longevity, and nodulation of roots in relation to seed yield in chickpeas (*Cicer arietinum L.*) . *Exp. Agri.*, 16: 241-261.

Montanez A., 2000. Overview and case studies on biological nitrogen fixation: perspectives and limitations.

Montange D., Beunard P. 1984. Croissance des Rhizobiums dans les fermenteurs IRAT, suivie dans les inoculums. *Agronomie tropicale.* , pp 39-42.

Nour S. M, Fernandez M. P. Normand P. et Cleyet-Marel J. C. , 1994. rhizobium ciceri sp. Nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicer arietinum L.*) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. Nov. *Int. J. Syst Bacteriol* 45 : 640-648.

Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P., Fernandez M.P. 1995. genotypic heterogeneity of strains nodulating Chickpea (*cicer arietinum L.*) and description of *Rhizobium Mediterraneum* sp.nov .*Int.J.Syst.Bacteriol.*, 45:640-648.

Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Beck D., Effosse A., Fernandez M.P. (1994) . Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum L.*) . *Can .J.Microbiol.*, 40: 345-354.

OECD. 2004. Guidance Document on Methods for Detection of Micro-organisms Introduced into the Environment: Bacteria .In ENV/JM/MONO(2004)7. JT00165979.

Paterson A.H., Bowers J.E., Burow M.D., Draye X., Elsik C.G., Jiang C.X., Catherine S.K., Lan T.H., Lin Y.R., Ming R. et Wright R.J. 2000. Comparative genomics of plant chromosomes. *plant cell.* 12 :1523-1539.

Prin Y., Galiana A., Ducouso M., Dupy N., De Lajudie P., Neyra M. 1993. Les Rhizobium d'acacia .biodiversité et taxonomie .bois et foret des tropiques., 238 (4) : 237-399.

Rees D.S., Kim J., Georgiadis M., Chan M.K., Kimo H., Komiya H., Woo D., Chirino A.J., Schlessman J. HSU B.T. 1993. Structure and fonctions of the nitrogenase proteins P.83-89 in R. Palacios et al (Ed), new horizons in nitrogen fixations. Kluwer Academic Publishers . The Netherlands.

Richter Gerhard. 1993. Métabolisme des végétaux , physiologie et biochimie .Ed .press polytechniques et universitaires Romandes.526p.

Roughley R.J., 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and soil 32 :675-701.

Roughley R.J., Gemell L.G., Thompson J.A and Brockwell J. 1993. The number of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. Soil Biol . Biochem. 25: 1453-1458.

Rupela O.P. Saxena M.C. (1987). Nodulation and nitrogen fixation in the Chickpea. pp, 191-206 In The chickpea. Ed .Saxena M.C. and Singh K.B. Wallingford, UK , UK: CAB International.

Saint-Macary .H., Neyra .M. 1992. Sélection et conditionnement d'un support pour inoculum. In FAO (Ed) , fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote .Rome.

Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. and Lara M. 1991. Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 507-528.

Saxena M.C. 1984. The physiology of tropical fields crops.ed.John Wiley and Sons Ltd , London , pp:419-452.

Schutze M., Kondorosi A., 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Gent* 32:33-57.

Simms E.L., Taylor D.L., 2002. Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legume and Rhizobia. *Integ. And Comp. Biol.*, 42:369-380.

Singh K.B. 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field crops research*, 53(1-3): 161-170.

Singleton .P., Keyser .H. ET Sande. E. 2002. Development and evaluation of liquid inoculants in: *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam* (Ed.) Herridge, D. ACIAR proceeding 109e pp. 86-94.

Slattery J., Pearce D., 2002. Development and Evaluation of Liquid inoculants in: *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam* (Ed). Herridge, D. ACIAR Proceedings 109e pp. 86-94.

Smith R.S. 1996. Legume inoculant formulation and application. *Can.J.Microbiol.* 38:485-492.

Smithson J.B.; Thompson J.A. and Summerfield R.J. 1985. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) .eds. R.J.SUMMERFIELD and ROBERTS H.J. Collins , London .pp.312-390.

Somasegaran P., Hoben H.J. 1985. Methods in legumes –rhizobium technology. P:1-331. Niftal. University.

Somasegaran P., Hoben H.J. 1994. Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology .P.450. Springer-Verlag. new York.

Spaink H.P., 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54 : 257-88.

Sprent J., Zahram H.H. 1988. Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. In *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean*

agriculture. Developments in plant and soil sciences. Edited by D . P Beck and L . M . Materon ., 32: 145-151.

Sprent J.I., 1984. Nitrogen fixation in: Advanced plant physiology. Ed Malcolm B Wilkins.

Stephens J.H.G., Rask H.M. 2000. Inoculant production and formulation Field crops Res .65: 249-258.

Summerfield R.J., Hadley P., Roberts E.H., Minchin F.R. and Rawsthorne S. 1984. Sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to hot temperatures during the reproductive period. Exp. Agri, 20: 77-93.

Summerfield R.J and Roberts. (1985). (*Cicer arietinum*.L) .Reprinted with permission from: Handbook of flowering .Ed. Halevy A.H., C.R.S. Press INC, Boca Raton, Florida .Vol.1:92-99.

Swaminathan R et Prasad N.N.,1982. Effect of pH moisture and temperature on the survival of Rhizobium in sterile soil .In :Aspects of biological Nitrogen Fixation.

Temprano T., Albareda M., Camacho M., Daza A., Santamaria C., Rodriguez-Navarro D. N. 2002. Survival of *Rhizobium* / *Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seed, Microbial.5: 81-86.

Thies J.E., Singleton P.W.and Bohloow B.1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field grown legumes. Applied and environmental Microbiology. 57:19-28.

Trevaskis B., Colebatch G., Desbrosses G., Wandrey M., Wienkoop S., Saalbach G., Udvardi M., 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. Comp Funct Genom : 3: 151-157.

Van Der Maesen L.J.G. 1987. origin , history and taxonomy of chickpea, p .11-34. In :Saxena , M.C. et Singh, K.B. (ed) the chickpea.

Venkateswaralu B., 1997. Water stress and biological nitrogen fixation in legumes. IND.J.Dryland Agric.Res.Dev., 12:51-53.

Vikman P.A., Vessey K. 1992. The decline in N₂ fixation rate in common bean with the onset of pod-filling : fact or artificat. Plant soil 147: 95-105.

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria.IBP. Handbook n°15 – Blackwell scientific publishers, Oxford.

Wery J., Silim S.N., Kinght E.J., Malhotra R.S. and Cousin R. 1994. Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. Euphytica, 73 : 73-83.

Wolyn D.J., Attewell J., Ludden P.W and Bliss F.A. 1989. Indirect measures of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions : the role of lateral root nodules . Plant soil 113:181-187.

Young J.P.W. 1996 .Phylogeny and taxonomy of Rhizobia .Plant and soil, 186:45-52.

Zakhia F., et De Lajudie P. 2001. Taxonomy of Rhizobia, Agronomie 21:569-576

Zhang K.O.,Harpo R.,Karisto M.,Lindstrom K.1991.diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminosarum trees. Int.J.Syst.Bacteriol, 41:104-113.

Annexes

Annexe 1 : milieux de cultures et solutions nutritives utilisées

Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10 g
K HPO	0,5 g
MgSO ₄ H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g

L'ajustement du pH a 6,8 se fait avec du NaOH 0,1N.

Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970)

15 g d'agar sont ajoutés à un litre de YMB pour solidifier le milieu.

Yeast Mannitol Agar + Red Congo (YMA + RC) (Vincent, 1970)

1000 ml de YMA + 10 ml de rouge de Congo (Solution stock *)

Yeast Mannitol Agar + bromothymol blue (YMA + BTB) (Vincent, 1970)

1000 ml de YMA + 5 ml de BTB (Solution stock *)

Glucose Peptone Agar+ Bromocresol purple (GPA + BcP) (Vincent, 1970)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
BcP (Solution stock *)	10 ml

Tryptone Yeast (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	3 g
CaCl ₂ 6 H ₂ O	0,87 g

Pour solidifier le milieu ajouter 12 g d'Agar /l de milieu

*** les solutions stocks :**

- Rouge de Congo

250 ml de Rouge de Congo dissous dans 100 ml d'eau distillée

- Bromocresol purple

1 g de BcP dissous dans 100 ml d'éthanol.

- Bromothymol bleu

0,5 g de BTB dissous dans 100 ml d'éthanol.

Solution nutritive de Fahraeus (1957) :

Macro éléments :

KH ₂ PO ₄	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,12 g
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	0,15 g
Citrate de Fer	0,005 g
Micro éléments solution stock	1 ml

Micro éléments :

H ₃ BO ₄	2,86 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,14 g

Milieu de Bergersen et al., (1980):

Glycerol	43 mM
Inositol	5,6 mM
Na Succinate	25 mM
Glutamine	1-2 mM
K ₂ HPO ₄	30 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,7 mM
Mg Cl ₂	0,14 mM
Mn SO ₄	58 µM
H ₃ BO ₄	82 µM
Zn SO ₄ 7H ₂ O	3,5 µM
KI	6 µM
Cu SO ₄ 5H ₂ O	0,8 µM
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,4 µM
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,4 µM
Fe SO ₄ 7H ₂ O	54 µM
Na ₂ EDTA	54 µM

ANNEXE 2 : résultats

Tableau 28 : Densité optique ($\lambda = 540$ nm) des différents isolats et de la souche de référence CP 39 durant une incubation de 96 heures a une température de 28° sur milieu YMB

	IT	CHA	KENT	BIS	DJ I	DJ II	BAT	CP 39
T=0	0,01	0,009	0,002	0,042	0,012	0,034	0,016	0,003
2	0,016	0,012	0,005	0,067	0,029	0,056	0,087	0,006
4	0,022	0,018	0,009	0,103	0,098	0,109	0,095	0,014
8	0,131	0,078	0,013	0,145	0,244	0,456	0,176	0,026
12	0,412	0,214	0,045	0,324	0,456	0,765	0,346	0,102
18	0,612	0,449	0,103	0,785	0,876	0,987	0,564	0,389
24	0,841	0,734	0,431	0,986	1,131	1,009	0,745	0,554
36	1,231	0,945	0,765	1,034	1,091	0,989	0,948	0,735
48	0,823	1,009	0,987	1,185	0,898	0,675	0,996	0,952
72	0,743	1,107	1,013	1,006	0,654	0,564	1,009	0,911
96	0,301	0,904	0,965	0,897	0,567	0,453	0,897	0,742

Tableau 28 suite : Densité optique ($\lambda = 540$ nm) des différents isolats et de la souche de référence CP 39 durant une incubation de 96 heures a une température de 28° sur milieu YMB

	AIN	KEN I	KEN II	OLB I	OLB II	LOCALE	ILC	CP 39
T=0	0,034	0,045	0,029	0,030	0,078	0,008	0,010	0,003
2	0,076	0,078	0,067	0,086	0,104	0,056	0,076	0,006
4	0,098	0,099	0,098	0,099	0,346	0,095	0,101	0,014
8	0,143	0,190	0,205	0,408	0,675	0,184	0,314	0,026
12	0,205	0,467	0,409	0,654	0,875	0,295	0,564	0,102
18	0,865	0,789	0,756	0,896	0,983	0,457	0,701	0,389
24	1,078	0,987	0,987	1,087	1,094	0,793	1,014	0,554
36	1,123	0,903	1,056	1,198	0,943	1,345	1,127	0,735
48	0,986	0,657	0,878	0,987	0,753	1,145	0,984	0,952
72	0,675	0,598	0,765	0,765	0,649	0,985	0,763	0,911
96	0,565	0,467	0,654	0,465	0,547	0,783	0,654	0,742

Tableau 29

Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche IT

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$20 \cdot 10^4$	5,30
2	$28 \cdot 10^4$	5,45
4	$50 \cdot 10^5$	6,69
8	$9 \cdot 10^6$	6,95
12	$105 \cdot 10^6$	8,02
18	$203 \cdot 10^8$	10,3
24	$267 \cdot 10^8$	10,42
36	$301 \cdot 10^9$	11,48
48	$252 \cdot 10^9$	11,40
72	$207 \cdot 10^8$	10,31
96	$57 \cdot 10^8$	9,75

Tableau 30 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche CHA

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$12 \cdot 10^4$	5,08
2	$9 \cdot 10^5$	5,95
4	$15 \cdot 10^5$	6,17
8	$12 \cdot 10^6$	7,07
12	$20 \cdot 10^6$	7,30
18	$60 \cdot 10^6$	7,78
24	$104 \cdot 10^6$	8,02
36	$102 \cdot 10^8$	10,00
48	$203 \cdot 10^8$	10,30
72	$263 \cdot 10^9$	11,42
96	$96 \cdot 10^8$	9,98

Tableau 31 : Nombre de rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche KENT

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$18 \cdot 10^4$	5,25
2	$30 \cdot 10^4$	5,47
4	$13 \cdot 10^5$	6,11
8	$53 \cdot 10^5$	6,72
12	$20 \cdot 10^6$	7,30
18	$80 \cdot 10^6$	7,90
24	$108 \cdot 10^6$	8,03
36	$103 \cdot 10^8$	10,01
48	$140 \cdot 10^8$	10,14
72	$203 \cdot 10^9$	11,30
96	$83 \cdot 10^9$	10,91

Tableau 32 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche BIS

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$15 \cdot 10^5$	6,17
2	$60 \cdot 10^5$	6,78
4	$165 \cdot 10^5$	7,22
8	$59 \cdot 10^6$	7,77
12	$80 \cdot 10^6$	7,90
18	$89 \cdot 10^7$	8,95
24	$175 \cdot 10^8$	10,24
36	$203 \cdot 10^9$	10,30
48	$240 \cdot 10^9$	11,38
72	$183 \cdot 10^9$	11,26
96	$169 \cdot 10^8$	10,22

Tableau 33 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche DJ I

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	191.10^4	5,27
2	23.10^4	5,36
4	19.10^5	6,27
8	59.10^5	6,77
12	65.10^6	7,82
18	105.10^8	10,02
24	270.10^9	11,43
36	225.10^9	11,35
48	113.10^8	10,05
72	59.10^6	7,77
96	41.10^5	6,61

Tableau 34 : Nombre de rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche DJ II

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	4.10^5	5,6
2	20.10^5	6,30
4	23.10^6	7,36
8	52.10^6	7,71
12	93.10^6	7,96
18	149.10^8	10,17
24	224.10^9	11,35
36	252.10^8	10,40
48	154.10^8	10,18
72	197.10^6	8,29
96	76.10^5	6,88

Tableau 35 : Nombre de *rhizobium* par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche BAT

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	21.10^5	6,32
2	54.10^5	6,73
4	87.10^6	7,93
8	133.10^6	8,12
12	83.10^7	8,91
18	42.10^8	9,62
24	52.10^8	9,71
36	97.10^9	10,98
48	162.10^9	11,21
72	263.10^9	11,42
96	83.10^8	9,92

Tableau 36 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche AIN

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	8.10^4	4,90
2	18.10^4	5,25
4	20.10^5	6,30
8	28.10^5	6,44
12	62.10^5	6,79
18	96.10^6	7,98
24	220.10^8	10,34
36	259.10^9	11,41
48	140.10^8	10,14
72	123.10^6	8,09
96	55.10^5	6,74

Tableau 37: Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

La souche KEN I

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	59.10^4	5,77
2	24.10^5	6,38
4	58.10^5	6,76
8	87.10^6	7,93
12	93.10^7	8,96
18	172.10^7	9,23
24	259.10^8	10,41
36	151.10^7	9,17
48	76.10^6	7,88
72	52.10^6	7,71
96	34.10^5	6,53

Tableau 38 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heurs d'incubation

La souche KEN II

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	20.10^4	5,30
2	26.10^5	6,41
4	96.10^5	7,98
8	102.10^6	8
12	96.10^7	8,98
18	103.10^8	10,01
24	196.10^9	11,29
36	203.10^8	11,30
48	176.10^6	10,24
72	59.10^6	8,77
96	64.10^5	7,80

Tableau 39 : Nombre de *rhizobium* par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

Tableau 40 : Nombre de Rhizobium par millilitre de milieu durant 96 heurs d'incubation

La souche OLB I

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$20 \cdot 10^4$	5,30
2	$10 \cdot 10^5$	6
4	$63 \cdot 10^5$	6,79
8	$87 \cdot 10^6$	7,94
12	$192 \cdot 10^6$	8,28
18	$122 \cdot 10^8$	10,08
24	$203 \cdot 10^8$	10,30
36	$256 \cdot 10^9$	11,40
48	$196 \cdot 10^8$	10,29
72	$87 \cdot 10^7$	8,94
96	$59 \cdot 10^6$	7,77

La souche OLB II

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$62 \cdot 10^4$	5,79
2	$20 \cdot 10^5$	6,30
4	$56 \cdot 10^5$	6,74
8	$102 \cdot 10^6$	8,01
12	$85 \cdot 10^7$	8,93
18	$182 \cdot 10^8$	10,26
24	$201 \cdot 10^9$	11,30
36	$173 \cdot 10^8$	10,23
48	$86 \cdot 10^6$	7,93
72	$57 \cdot 10^6$	7,75
96	$25 \cdot 10^5$	6,39

Tableau 41 : Nombre de Rhizobium par millilitre durant 96 heures d'incubation

La souche LOCALE

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$17 \cdot 10^4$	5,23
2	$38 \cdot 10^4$	5,59
4	$43 \cdot 10^5$	6,63
8	$72 \cdot 10^5$	6,85
12	$20 \cdot 10^6$	7,30
18	$53 \cdot 10^6$	7,72
24	$83 \cdot 10^8$	9,92
36	$304 \cdot 10^9$	11,48
48	$269 \cdot 10^9$	11,42
72	$206 \cdot 10^9$	11,31
96	$63 \cdot 10^7$	8,79

Tableau 42 : Nombre de Rhizobium par millilitre durant 96 heures d'incubation

La souche ILC

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$32 \cdot 10^4$	5,50
2	$67 \cdot 10^4$	5,82
4	$35 \cdot 10^5$	6,54
8	$87 \cdot 10^5$	6,93
12	$108 \cdot 10^6$	8,03
18	$27 \cdot 10^8$	9,43
24	$197 \cdot 10^9$	11,29
36	$267 \cdot 10^9$	11,42
48	$128 \cdot 10^8$	10,10
72	$72 \cdot 10^6$	7,85
96	$24 \cdot 10^6$	7,38

Tableau 43 : Nombre de *rhizobium* par millilitre de milieu durant 96 heures d'incubation

Souche CP 39

Temps (h)	Nombre de cellules	Log du nombre de cellules
0	$5 \cdot 10^4$	4,70
2	$42 \cdot 10^4$	5,63
4	$15 \cdot 10^6$	7,20
8	$22 \cdot 10^7$	8,34
18	$105 \cdot 10^7$	9,02
12	$209 \cdot 10^7$	9,32
24	$35 \cdot 10^8$	9,54
36	$74 \cdot 10^8$	9,87
48	$12 \cdot 10^9$	10,11
72	$27 \cdot 10^9$	10,43
96	$13 \cdot 10^9$	10,13

Annexe 3

Nous désignons sous les initiales de :

TL : pour tourbe locale

TF : pour tourbe de France

K : kaolinite

V : vermiculite

C : chardon

Tableau 44 : estimation du nombre de Rhizobium dans l'inoculum en fin de production (Après 72 heures)

l'inoculum	IT	BIS	OLB I	LOCALE	CP 39
Log des Rhizobium /ml de milieu	10,55	9,98	10,38	10,55	9,04

Tableau 45 : nombre de cellule vivante de l'isolat IT (log₁₀ UFC. g⁻¹ d'inoculum)

Support	0	1	7	14	30
T.L	9,65	9,75	9,64	9,62	9,21
T. F	9,45	9,41	9,27	9,12	8,98
K	9,64	9,54	9,39	9,26	9,13
V	9,51	9,42	9,23	9,11	8,95
C	9,64	9,54	9,34	9,27	9,14

Tableau 46: nombre de cellule vivante de l'isolat BIS (log₁₀ UFC. g⁻¹ d'inoculum)

Support	0	1	7	14	30
T.L	9,54	9,47	9,36	9,23	8,87
T. F	9,46	9,39	9,34	9,24	8,96
K	9,51	9,40	9,36	9,22	9,09
V	9,52	9,46	9,39	9,28	9,13
C	9,65	9,56	9,37	9,25	9,08

Tableau 47 : nombre de cellule vivante de l'isolat LOCALE (\log_{10} UFC. g^{-1} d'inoculum)

Support	0	1	7	14	30
T.L	9,60	8,97	9,37	9,14	8,92
T. F	9,56	9,45	9,32	9,09	8,69
K	9,62	9,49	9,28	8,95	8,68
V	9,38	9,27	9,12	8,84	8,67
C	9,53	9,47	9,32	9,29	9,04

Tableau 48 : nombre de cellule vivante de l'isolat OLB I (\log_{10} UFC . g^{-1} d'inoculum)

Support	0	1	7	14	30
T.L	9,57	9,48	9,36	9,13	8,93
T. F	9,65	9,49	9,32	9,17	8,84
K	9,47	9,29	9,12	8,96	8,59
V	9,64	9,49	9,32	9,16	8,94
C	9,56	9,37	9,26	9,12	8,89

Tableau 49 : nombre de cellule vivante de l'isolat CP 39 (\log_{10} UFC. g^{-1} d'inoculum)

Support	0	1	7	14	30
T.L	9,39	8,93	8,63	8,44	8,23
T. F	9,49	9,27	9,16	8,85	8,56
K	9,42	9,36	9,19	8,94	8,78
V	9,54	9,41	9,23	8,79	8,67
C	9,48	9,38	9,19	8,93	8,87

Annexe 4

Tableau 50 : Comparaison entre l'effet des deux différents adhésifs utilisés sur la survie de l'inoculum **IT** sur la graine du pois chiche enrobée

		0	1	7	14	21	30
T.L	G.A 20%	7,15	6,89	6,71	6,42	5,18	4,82
T.L	S 10%	6,95	6,79	6,51	6,34	5,67	4,54
T.F	G.A 20%	7,02	6,75	6,65	6,32	4,95	4,67
T.F	S 10%	7,18	6,43	6,25	5,86	4,52	3,75
K	G.A 20%	7,14	6,74	6,46	5,57	4,96	4,12
K	S 10%	7,27	6,63	6,24	5,62	4,83	4,47
V	G.A 20%	7,11	6,96	6,64	6,22	5,62	4,74
V	S 10%	6,92	6,75	6,34	5,82	4,54	3,92
C	G.A 20%	7,17	6,72	6,56	5,97	5,34	4,87
C	S 10%	7,02	6,81	6,25	5,67	4,78	4,12

Tableau 51 : Comparaison entre l'effet des deux différents adhésifs utilisés sur la survie de l'inoculum **BIS** sur la graine du pois chiche enrobée

		0	1	7	14	21	30
T.L	G.A 20%	7,23	6,96	6,71	6,24	5,67	4,89
T.L	S 10%	7,12	6,86	6,51	6,19	5,74	5,07
T.F	G.A 20%	6,84	6,65	6,43	5,71	5,12	4,89
T.F	S 10%	6,97	6,21	5,82	4,51	3,95	3,65
K	G.A 20%	7,38	6,81	6,52	5,75	4,65	3,89
K	S 10%	7,32	6,86	6,47	5,86	5,13	4,52
V	G.A 20%	6,96	6,75	6,32	5,74	5,28	4,46
V	S 10%	7,04	6,85	6,67	5,78	5,17	4,17
C	G.A 20%	6,74	6,52	6,36	5,87	5,34	4,28
C	S 10%	6,87	6,65	6,27	5,96	5,52	4,34

Tableau 52 : Comparaison entre l'effet des deux différents adhésifs utilisés sur la survie de l'inoculum **LOCALE** sur la graine du pois chiche enrobée

		0	1	7	14	21	30
T.L	G.A 20%	6,94	6,85	6,71	5,97	5,34	4,42
T.L	S 10%	6,97	6,74	6,52	6,45	5,42	4,87
T.F	G.A 20%	7,12	6,67	6,24	5,25	4,76	3,76
T.F	S 10%	7,03	6,82	6,67	6,52	5,76	5,03
K	G.A 20%	6,87	6,41	5,95	4,52	4,02	3,32
K	S 10%	7,31	6,74	6,12	5,24	4,76	4,20
V	G.A 20%	7,27	6,84	6,53	5,73	5,24	4,82
V	S 10%	6,97	6,86	6,64	5,82	5,62	5,12
C	G.A 20%	7,15	6,85	6,73	6,51	5,87	5,43
C	S 10%	6,96	6,74	6,24	5,83	5,42	4,97

Tableau 53 : Comparaison entre l'effet des deux différents adhésifs utilisés sur la survie de l'inoculum **OLB I** sur la graine du pois chiche enrobée

		0	1	7	14	21	30
T.L	G.A 20%	7,12	6,75	6,14	5,24	4,83	4,31
T.L	S 10%	7,05	6,63	6,13	5,96	4,46	3,52
T.F	G.A 20%	6,83	6,64	6,47	5,98	5,51	4,36
T.F	S 10%	7,17	6,88	6,74	6,56	5,12	4,12
K	G.A 20%	6,92	6,72	6,57	6,21	5,28	4,32
K	S 10%	6,89	6,75	6,34	5,22	4,88	3,37
V	G.A 20%	7,21	6,97	6,84	6,62	5,67	4,46
V	S 10%	6,79	6,86	6,67	5,97	5,32	4,83
C	G.A 20%	7,14	6,92	6,87	6,67	5,46	5,03
C	S 10%	6,98	6,74	6,63	6,24	5,62	4,97

Tableau 54 : Comparaison entre l'effet des deux différents adhésifs utilisés sur la survie de l'inoculum **CP 39** sur la graine du pois chiche enrobée

		0	1	7	14	21	30
T.L	G.A 20%	6,88	6,62	6,51	6,39	5,98	5,72
T.L	S 10%	7,32	6,73	5,64	5,22	4,87	4,62
T.F	G.A 20%	7,31	7,01	6,93	6,64	5,35	4,67
T.F	S 10%	6,92	6,75	6,64	6,27	5,93	5,31
K	G.A 20%	6,97	6,54	6,21	5,87	5,32	4,02
K	S 10%	7,02	6,74	6,43	6,02	5,41	4,97
V	G.A 20%	7,31	7,11	6,92	6,47	5,76	5,12
V	S 10%	6,93	6,62	6,36	6,02	5,81	5,24
C	G.A 20%	6,74	6,31	5,92	5,64	4,87	4,54
C	S 10%	6,76	6,47	5,86	5,35	4,96	4,32

Résumés

Résumé :

Quatorze souches de *Rhizobium* nodulant cinq cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum*.L) ont été isolées de différentes régions de l'est et l'ouest algérien .ces isolats ont été caractérisées sur le plan phénotypique. L'analyse de leurs caractéristiques culturales et symbiotiques ainsi que leur résistance aux antibiotiques, leur tolérance à la salinité, aux pH acides et alcalin et aux températures élevées ont permis de mettre en évidence une large diversité physiologique au sein de ces populations de *Rhizobium* nodulant le pois chiche. L'analyse numérique de ces caractéristiques phénotypiques a montré que ces souches bactériennes sont réparties en deux groupes distincts suivant le palier d'indice de similarité. Des souches intéressantes pour la fabrication d'inoculum ont été sélectionnées, leurs capacité de survie a été évalués, elle est plus élevées quant la température de conservation est de 4°C. Des supports différents ont été testés : tourbe (locale et importée), kaolinite, vermiculite et le chardon néanmoins il y a pas de différence significative entre eux quand a la conservation du nombre de bactéries /ml de milieu mais le temps de conservation ne doit pas dépasser deux jours pour l'obtention d'un inoculum de bonne qualité.

Mots-clés : *Rhizobium*, Inoculum, Supports, *Cicer arietinum*, caractérisation phénotypique

Abstract

Phenotypic characteristics of fourteen Rhizobia strains isolated from root nodules of five of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars growing in soils collected from different areas of eastern and western parts of Algeria were studied. Cultural and symbiotic characteristics as well as resistance to antibiotics and tolerance to salinity, acid and alkaline pHs and high temperatures allowed the description of a wide physiological diversity among tested isolates. Numerical analysis of the phenotypic characteristics showed that isolates fell into two groups in accordance to the level of similarity. A number of potential isolates have been identified for inoculation production. Their ability of survival was evaluated. The ability of rhizobial survival is better when the storage temperature is 4°C; different carriers were tested and we show that there is no significant difference between them; however the storage time must exceed two days.

Key words: *Rhizobium*, Inoculums, carriers, *Cicer arietinum*, phenotypic characterisation

ملخص

(و المزروعة نماطق *Cicer arietinum* 1 ريزوبيا مكونة للعقد الجذرية ل5 أصناف من الحمص (4تم عزل مختلفة بشرق و غرب الجزائر. تم فحص المظهر الخارجي للريزوبيا و اظهر تحليل مميزاتها الزراعية و التعايشية ومقاومتها لدرجات الحموضة و درجات الحرارة العالية وجود تباين فيزيولوجي كبير بين أنواع الريزوبيا. مكننا حساب دليل تشابه الخصائص الظاهرية من تصنيف الريزوبيا إلى مجموعتين و قمنا باختيار أصناف مناسبة تم اختبار لإنتاج لقاح و تمت دراسة قدرتها على العيش و ألتي ترتفع عندما تكون درجة الحرارة 4 درجات مئوية. *Kaolinite vermiculite* . (محلية و مستوردة)،*tourbe*حوامل لقاح عديدة : امل من الوسط لكن وقت الحفظ لا يجب إن لاحظنا عدم وجود فرق بين الحوامل في حفظ عدد البكتيريا/*Chardon* يتجاوز يومين للحصول على لقاح من نوع جيد.

- خصائص ظاهرية *Cicer arietinum*الكلمات المفتاحية : ريزوبيا- لقاح- حوامل-

Nom : Maougal	Date de soutenance
Prénoms : Rym Tinhinen	
Titre : Techniques de production d'inoculum rhizobial .Etude du cas pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.) : Inoculation et nodulation	
Magister en biotechnologies végétales	
Résumé :	
<p>Quatorze souches de <i>Rhizobium</i> nodulant cinq cultivars de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.) ont été isolées de différentes régions de l'est et l'ouest algérien .ces isolats ont été caractérisées sur le plan phénotypique. l'analyse de leurs caractéristiques culturales et symbiotiques ainsi que leur résistance aux antibiotiques, leur tolérance à la salinité, aux pH acides et alcalin et aux températures élevées ont permis de mettre en évidence une large diversité physiologique au sein de ces populations de <i>Rhizobium</i> nodulant le pois chiche. L'analyse numérique de ces caractéristiques phénotypiques a montré que ces souches bactériennes sont réparties en deux groupes distincts suivant le palier d'indice de similarité. Des souches intéressantes pour la fabrication d'inoculum ont été sélectionnées, leurs capacité de survie a été évalués, elle est plus élevées quant la température de conservation est de 4°C. Des supports différents ont été testés : tourbe (locale et importée), kaolinite, vermiculite et le chardon néanmoins il y a pas de différence significative entre eux quand a la conservation du nombre de bactéries /ml de milieu mais le temps de conservation ne doit pas dépasser deux jours pour l'obtention d'un inoculum de bonne qualité.</p>	
Mots-clés : <i>Rhizobium</i> , Inoculum, Supports, <i>Cicer arietinum</i> , caractérisation phénotypique	
Laboratoire de recherche : Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales Université Mentouri Constantine	
Directeur de recherche : Djekoun A	Prof.Univ. Constantine
Membres du jury :	
Présidente :	Ykhlek N M .C. Univ. Constantine
Examineurs :	Benguedouar A M .C.Univ. Constantine
	Dehimat L M.C .Univ.Constantine

