

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش – الجزائر

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A) El Harrach - Alger

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

**Option** : Phytopathologie: Biotechnologie appliquée à la protection des végétaux

## Thème

Nutrition azotée sous déficience en phosphore chez le Niébé

(*Vigna unguiculata* sub.sp.*unguiculata* L.walp.)

Présenté par BENAGGAB - AMAR Radhia

Devant le jury d'examen :

Président	M <sup>r</sup> GUEZLANE A	Maître de conférences
Examineur	M <sup>r</sup> BOUZNAD Z	Professeur
Examineur	M <sup>me</sup> OUNANE G	Maître de conférences
Examineur	M <sup>me</sup> DJEBARA M	Maître assistante
Directeur	M <sup>r</sup> OUNANE S.M	Maître de conférences

Soutenue, le 20 janvier 2011

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie **Dieu tout puissant** qui m'a donné la force et la foi et de m'avoir permis d'arriver à ce stade là.

Au terme de cette étude, je tiens à adresser ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenue, aidée, encouragée toute au long de ce travail.

Je tiens à exprimer m'a profonde reconnaissance à M<sup>f</sup> Ounane, Professeur et chef de département de phytotechnie à l'ENSA qui a assuré la direction scientifique du sujet ; comme je le remercie pour son encadrement et sa disponibilité,

Je remercie vivement et sincèrement, M<sup>f</sup> Guezlane, maître de conférences à l'ENSA pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.

J'exprime ma gratitude à M<sup>f</sup> Bouznad, professeur et chef de département de botanique à l'ENSA, M<sup>me</sup> Ounane G, maître de conférences à L'ENSA et M<sup>me</sup> Djebara M, chargée de cours à l'USTHB d'avoir accepté d'examiner ce travail.

## DEDICACES

A mes parents  
Pour leurs affections et leurs prières

A mon mari  
Pour sa compréhension et son soutien sans faille  
A mes beaux parents pour leurs soutiens

A mes sœurs (Malika, chahrazed, Nacima)  
Pour l'intérêt qu'ils ont toujours porté à mes études

A mes frères et mes belles sœurs  
Ainsi qu'à mes deux filles adorées Kenza et Imène

A m<sup>er</sup> Dahimene chef de service de l'EHEV  
Pour ses conseils et aides morales

A tous mes collègues de l'EHEV

A mes copines (Samira, Assia, Zahira).

## Liste des abréviations

<b>MSP</b>	Microorganismes solubilisant les phosphates
<b>BSP</b>	Bactéries solubilisant les phosphates
<b>PVK</b>	Milieu Pikovskaya
<b>NBRIP</b>	National Botanical Research Institute's growth medium Phosphate
<b>CE</b>	Conductivité Electrique
<b>C</b>	Carbone
<b>N</b>	Azote
<b>P</b>	Phosphore
<b>PN</b>	Phosphate Naturel
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>YEMA</b>	Yeast-Extract Manitol Agar
<b>µmoles</b>	Micromoles
<b>NF</b>	Nombre de feuilles
<b>HT</b>	Hauteur de la tige
<b>NR</b>	Nombre de rameaux
<b>NFL</b>	Nombre de fleurs
<b>SF</b>	Surface foliaire
<b>PF</b>	Poids frais
<b>PS</b>	Poids sec
<b>NN</b>	Nombre de nodules
<b>NG/P</b>	Nombre de gousse par plante
<b>NGr/G</b>	Nombre de graines par gousse

<b>NGr/P</b>	Nombre de graines par plant
<b>PCG</b>	Poids de cent graines
<b>RDT</b>	Rendement en grains
<b>TPs</b>	Teneur du sol en phosphore assimilable
<b>TPf</b>	Teneur des feuilles en phosphore total
<b>TNf</b>	Teneur des feuilles en azote total.

## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

**Tableau 1 :** Caractéristiques physico-chimique du sol

**Tableau 2 :** Effet des isolats sur la variation du pH du milieu liquide (NBRIP)

**Tableau 3 :** Liste des isolats rhizobiens

**Figure 1 :** Transformation biologique du phosphore

**Figure 2 :** Plant du niébé

**Figure 3 :** Graines de dolique à œil noir

**Figure 4 :** Effet des isolats sur la solubilisation des phosphates en milieu solide (PVK)

**Figure 5 :** Effet des isolats sur le nombre de feuilles au stade végétatif

**Figure 6 :** Effet des isolats sur le nombre de feuilles au stade floraison

**Figure 7 :** Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade végétatif

**Figure 8 :** Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade floraison

**Figure 9 :** Effet des isolats sur le nombre des rameaux primaires au stade floraison

**Figure 10 :** Effet des isolats sur le nombre de fleurs par plante

**Figure 11 :** Effet des isolats sur la surface foliaire au stade végétatif

**Figure 12 :** Effet des isolats sur le nombre de nodules par plante

**Figure 13 :** Effet des isolats sur le poids frais de la partie racinaire

**Figure 14 :** Effet des isolats sur le poids sec de la partie racinaire

**Figure 15 :** Effet des isolats sur le poids frais de la partie aérienne

**Figure 16 :** Effet des isolats sur le poids sec de la partie aérienne

**Figure 17 :** Effet des isolats sur le nombre de gousse par plante

**Figure 18 :** Effet des isolats sur le nombre graine par gousse

**Figure 19 :** Effet des isolats sur le nombre de graine par plante

**Figure 20 :** Effet des isolats sur le poids de cent graines

**Figure 21 :** Effet des isolats sur le rendement en grains

**Figure 22 :** Effet des isolats sur la teneur du sol en phosphore

**Figure 23 :** Effet des isolats sur la teneur des feuilles en phosphore

**Figure 24 :** Effet des isolats sur la teneur de l'azote des feuilles

**Figure 25 :** Représentation des couples symbiotiques en deux dimensions

**Figure 26 :** Dendrogramme des couples symbiotiques en fonction des différents caractères étudiés

**Figure 27 :** Arbre de répartition des couples symbiotiques en fonction des caractères étudiés.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Etat des connaissances sur les formes et la mobilité du phosphore dans le sol</b>	
I.1. Les formes du phosphore dans le sol	3
<b>II. Le phosphore dans le végétal</b>	<b>3</b>
II.1. Rôle physiologique du phosphore	3
II.2. Importances du phosphore dans la nutrition des légumineuses alimentaires	3
II.3. La biodisponibilité du phosphore	4
II.4. Effet de la déficience phosphatée sur la croissance et le développement des plantes	4
II.5. Facteurs influençant les prélèvements du phosphore par la plante	4
<b>III. Transformation microbienne du phosphore</b>	<b>5</b>
I.3.1. Minéralisation microbienne du phosphore organique	5
I.3.2. Immobilisation microbienne du phosphore minéral	5
I.3.3. Solubilisation microbienne des phosphates insolubles	6
<b>IV. Les phosphates naturels</b>	<b>9</b>
IV.1. Solubilisation de la roche phosphatée	9
IV.2. Conclusion	11
<b>V. Interaction Légumineuse-Rhizobium</b>	<b>11</b>
V.1. Le macrosymbionte	11
V.1.1 Importance du niébé dans les systèmes de production	12
V.1.2. Les aptitudes physiologiques du niébé	12
V.2 Le microsymbionte	13
V.3. Interaction rhizobium-légumineuses	13

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES**

<b>1. Données relatives sur le milieu de culture</b>	<b>16</b>
<b>2. Matériel végétal et l'inoculum</b>	<b>16</b>
2.1. Matériel végétal	18
2.2. Les isolats rhizobiens	18
2.2.1. Evaluation de l'activité solubilisatrice des isolats	19
2.3. Préparation des inoculums	20
2.4 Mise en place de l'essai	20
2.5 Dispositif expérimental	20
<b>3. Suivi de l'essai</b>	<b>21</b>
<b>4. Les paramètres étudiés</b>	<b>21</b>
4.1. Au stade végétatif	21
4.2. A la floraison	21
4.3. A la maturité	22
4.4. Après la récolte	22
<b>5. Traitements statistiques des données</b>	<b>23</b>

## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Caractéristiques physico-chimiques du sol	24
II. Effet des isolats sur la solubilisation des phosphates	25
III. Effet des isolats sur les paramètres de croissance	26
III.1. Nombre de feuilles par plante au stade végétatif	27
III.2. Nombre de feuilles par plante au stade floraison	28
III.3. Hauteur de la tige principale au stade végétatif	28
III.4 Hauteur de la tige principale au stade floraison	29
III.5. Nombre de rameaux primaires au stade floraison	30
III.6. Nombre de fleurs	31
III.7. Surface foliaire	32
III.8. Poids frais des racines	33
III.9. Poids sec des racines	34
III.10. Poids frais des tiges et feuilles	34
III.11. Poids sec des tiges et feuilles	35

<b>IV. Réponse à l'inoculation</b>	<b>36</b>
IV.1. Nombre de nodules	36
IV.2. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène	38
<b>V. Effet des isolats sur le rendement et ses composantes</b>	<b>38</b>
V.1. Nombre moyen de gousses par plante	38
V.2. Nombre moyen de graines par gousse	39
V.3. Nombre moyen de graines par plante	40
V.4. poids de cent graines	40
V.5. Rendement en grains	41
<b>VI. Effet des isolats sur la teneur en éléments minéraux</b>	<b>42</b>
V.1. Teneur du sol en Phosphore assimilable	42
V.2. Teneur des feuilles en phosphore total	43
V.3. Teneur des feuilles en azote total	45
<b>VII. Regroupement des isolats rhizobiens</b>	<b>45</b>
<b>4- Conclusion générale</b>	<b>49</b>
<b>5- Références bibliographiques</b>	<b>51</b>
<b>6- Annexes</b>	<b>62</b>

# Introduction

Le phosphore est un des éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des plantes. Bien que, la plupart des sols agricoles contiennent de larges réserves en phosphore, une grande partie (95-99%) se trouve sous forme insoluble inaccessible aux végétaux (Khan *et al.*, 2009). De plus la majorité du phosphore soluble ajouté au sol est, soit adsorbé (immobilisé) par le calcium, soit précipité par les formes libres de fer ou d'aluminium et ce selon le type du sol (Choudhury *et al.*, 2007).

En Algérie une grande partie des terres cultivées situées dans les zones céréalières se caractérise par des pH alcalins, avec des risques importants d'insolubilisation du phosphore (Zemoura, 2005). Toutefois, l'insolubilisation n'est pas irréversible (Brhada, 2006). En effet, la modification du pH, l'action de la matière organique, l'activité microbienne, peuvent créer des conditions favorables à sa solubilisation notamment en milieu calcaire (Schvartz *et al.*, 2005).

L'utilisation des bactéries solubilisatrices des phosphates (BSP) s'avère un moyen très prometteur (Chang et Yang, 2009). Les BSP colonisent la rhizosphère, contribuant ainsi à la mobilisation des phosphates (Souchie *et al.*, 2006).

L'utilisation des BSP comme inoculum, en plus de leur capacité à fixer l'azote, augmenterait simultanément l'absorption du phosphore et le rendement des cultures (Yazdani *et al.*, 2009). Plusieurs espèces de bactéries, sont capables de solubiliser les phosphates *in vitro* et la plus part vivent dans la rhizosphère des plantes. Les BSP sont souvent utilisés comme des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Marchner, 2008), par la production des acides aminés, de vitamines et de phytohormones comme l'acide gibbérellique (AG), et l'acide indole acétique (AIA) (Ponmurugan et Gopi, 2006).

L'acidification de la rhizosphère des légumineuses, résultant de la fixation symbiotique de l'azote, a pour conséquence une augmentation significative de la biodisponibilité de P dans le sol (Behi, 2003). Cette réaction s'explique par le rôle majeur que joue l'azote dans le bilan des cations et anions prélevés par la plante et, "*in fine*", dans la modification du pH de la rhizosphère à la suite de l'excrétion de protons compensant un excédent de cations dans le bilan (Hinsinger *et al.*, 2003). En utilisant  $N_2$  au lieu  $NO_3^-$ , les légumineuses peuvent acidifier davantage leur rhizosphère, qui se traduit par une augmentation de la biodisponibilité de p (Alkama *et al.*, 2009).

D'autres études ont montré que la solubilisation des phosphates dans le milieu est due à la production des acides organiques (Vega, 2007). L'acide citrique et oxalique sont les deux acides organiques produits en grande quantités (Xie, 2008). L'acide citrique est le principal acide car c'est le plus

efficace dans la solubilisation (Babana, 2003 ; Akhtar et Siddiqui, 2009). La quantité et la nature des acides organiques produits dépendent des souches, de la composition du milieu, et des conditions de croissances (Chen et *al.*, 2006).

De nombreux chercheurs ont travaillé sur la variabilité génétique vis-à-vis de l'efficacité d'utilisation de phosphore (EUP) chez les légumineuses, efficacité qu'ils ont attribuée à l'origine géographique des cultivars testés. Ils ont suggéré que les génotypes ayant un bon rendement en conditions limitantes en P seraient les plus efficaces pour l'utilisation de cet élément (Lie et *al.*, 2003 ; Tang et *al.*, 2009).

Les BSP sont des biofertilisants qui minimisent les coûts de production en préservant l'environnement (Afzal et Bano, 2008). Par ailleurs, la mise en place d'une agriculture durable, la protection des ressources naturelles et l'exploitation des ressources minérales peuvent aussi contribuer à la restauration du contenu en phosphore du sol. Les roches phosphatées sont reconnues pour leur utilisation potentielle comme une alternative à la fertilisation phosphatée (Ivanova et *al.*, 2006 ; Sabannavar et Lakshman, 2009). Elles peuvent être utilisées en tant que matière première pour la fabrication industrielle des engrais phosphatés solubles, ou pour l'application directe en agriculture (FAO, 2001).

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité solubilisatrice vis-à-vis des phosphates naturels chez quelques isolats rhizobiens nodulant le niébé (*Vigna unguiculata* L.walp.). Dans ce contexte nous nous sommes proposé de sélectionner des inoculum de BSP capables d'assurer une bonne nutrition phosphatée des plantes et de bons rendements, réduisant par la même occasion les coûts de production.

# SYNTHESE BIBIOGRAPHIQUE

## **I. Etat des connaissances sur les formes et la mobilité du phosphore dans le sol**

### **I.1. Les formes du phosphore dans le sol**

Le phosphore dans le sol existe sous deux formes principales: inorganique et organique (Rodriguez et *al.*, 2006 ; Xie, 2008 ; Joseph et Jisha, 2009). Le phosphore organique provient des débris de végétaux ou animaux et des microorganismes. Les principales formes sont: la phytine, les nucléoprotéines et les acides nucléiques, les phospholipides et les sucres phosphorilés (Dommergues et Manganot, 1970). Les phytates sont les plus dominants dans la fraction organique du sol (Marchner, 2008). Les résidus de récoltes peuvent libérer dans le sol des teneurs importantes de phosphore.

Le phosphore inorganique constitue la fraction minérale du phosphore totale (Gros, 1979). Il peut être libre dans la solution du sol ou associé à d'autres minéraux ou encore intégré dans des combinaisons minérales (phosphore insolubles) (Rodriguez et *al.*, 2006) .

## **II. Le phosphore dans le végétal**

### **II.1. Rôle physiologique du phosphore**

Le phosphore est un des éléments essentiels entrant dans la constitution de toutes les cellules vivantes, ou il est impliqué dans l'édification des molécules organiques, la synthèse du matériel génétique, et dans le déroulement des processus d'accumulation et de transfert d'énergie. Il constitue un des éléments majeurs dans les fumures (Schvartz et *al.*, 2005).

Selon Daoui (2007), environ 50% de P total est absorbé avant que la plante n'ait atteint 20% de sa croissance. Le développement racinaire est également favorisé par une bonne nutrition phosphorique, c'est un facteur de précocité (Gros, 1979). Il accroît la résistance de la plante au froid et aux maladies (Khan et *al.*, 2009). Le phosphore est un facteur de qualité, c'est un élément régulateur de la végétation, il favorise la phase de végétation, fécondation, maturité et migration des réserves (Gros, 1979 ; Khan et *al.*, 2009).

### **II.2. Importances du phosphore dans la nutrition des légumineuses alimentaires**

Les légumineuses disposent d'un système racinaire moins développé par rapport aux graminées, ce qui limite l'absorption du phosphore qui diffuse très lentement à travers la solution du sol vers la rhizosphère (Munns et Mosse, 1980).

Le phosphore augmente la croissance des plantes, le poids sec de la plante, la surface foliaire, le nombre et le poids sec de nodules, l'activité nitrogénasique (A.R.A), et le contenu en phosphore dans les racines et les feuilles (Olivera et *al.*, 2003). Dans une expérimentation sur différentes légumineuses (pois, haricot et fève), Koala (1986), a trouvé que l'augmentation des apports de P augmente le nombre et le poids des nodules parallèlement à l'amélioration de la matière sèche des

racines et de la plante entière. Ce qui suggère que le phosphore améliore la fixation biologique d'azote par l'amélioration de la biomasse de la plante par la suite la mise en place des photoassimilats pour la fixation biologique d'azote (Daoui, 2007). La disponibilité du phosphore dans le sol et surtout sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur sa capacité à fixer l'azote atmosphérique (Ben Khaled, 2003 ; Khan *et al.*, 2009). Tang *et al.* (2001), en étudiant l'effet de la déficience phosphatée chez la luzerne, ont conclu que le phosphore joue également un rôle dans le fonctionnement des nodules. En effet, l'activité de l'enzyme nitrogénase requiert 21 moles d'ATP pour réduire une mole d'azote en ammonium (Khan *et al.*, 2009). Selon les mêmes auteurs, généralement, les nodules contiennent deux à trois fois de phosphore par unité de matière sèche que les racines sur lesquelles elles sont fixées.

### **II.3. La biodisponibilité du phosphore**

La biodisponibilité du P est la fraction du P susceptible d'être prélevée par la plante (Morel *et al.*, 2002 ; Maire, 2005). D'après Zamoura (2005), la fraction biodisponible du P est la somme du P dissous et de la fraction du P minéral susceptible de passer en solution sous l'effet d'un gradient de concentration.

### **II.4. Effet de la déficience phosphatée sur la croissance et le développement des plantes**

Une déficience en phosphore chez les légumineuses n'affecte pas seulement l'établissement de la culture et sa croissance mais aussi la nodulation et la fixation biologique d'azote (Olivera *et al.*, 2003) ; une carence de P diminue la masse et la taille des nodosités (Tang *et al.*, 2001).

La déficience phosphatée entraîne également la réduction de la biomasse racinaire et aérienne de la plante (Olivera *et al.*, 2003 ; Daoui, 2007). En réponse à la déficience en phosphore, les plantes établissent des mécanismes avec lesquelles elles peuvent acquérir le phosphore tel que l'acidification de la rhizosphère, l'exsudation des anions organiques et la sécrétion des phosphatases par les racines (Hinsinger *et al.*, 2005 ; Richardson *et al.*, 2005). Comme pour la déficience phosphatée, l'excès de P peut aussi nuire à la fixation biologique d'azote (Daoui, 2007).

### **II.5. Facteurs influençant les prélèvements du phosphore par la plante**

Le prélèvement de phosphore par les plantes se fait essentiellement sous forme ionique à partir de la solution du sol (Xie, 2008 ; Khan *et al.*, 2009). L'alimentation phosphatée des végétaux dépend donc étroitement des facteurs qui influent sur la libération du phosphore assimilable à partir des formes inorganiques et organiques (Daoui, 2007).

#### **● Effet de l'état hydrique du sol**

L'amélioration des performances des cultures en réponse à l'apport de P en conditions de limitation hydrique s'expliquerait par les points suivants:

\* le phosphore améliorant l'enracinement prédispose la plante à une meilleure exploration du sol lui conférant la possibilité d'utilisation de l'eau des horizons profonds (Daoui, 2007).

\* l'augmentation de la concentration en P soluble au niveau de la rhizosphère. Ce qui améliore la disponibilité de cet élément pour la culture (Daoui, 2007).

#### ●Effet des exsudats racinaires

Dans les conditions de déficience phosphatée, notamment dans les sols riches en calcaire ou le phosphore serait très lié aux ions  $\text{Ca}^{+2}$ , il a été démontré que les plantes sécrètent au niveau de la rhizosphère des acides organiques pour mobiliser le phosphore fixé (Chen et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009). Chez le pois chiche (*Cicer arietinum*), comparativement à d'autres cultures par exemple, on a observé une grande capacité d'acidification du sol. Cette acidification, qui permet un meilleur prélèvement de P, est induite par sécrétion des acides organiques par les racines, principalement l'acide citrique (Sharma et *al.*, 2007). La quantité des acides organiques varie selon les espèces, les cultivars ou même entre les différents tissus de la plante (Khan et *al.*, 2009).

#### ●Interaction avec d'autres éléments minéraux

Les prélèvements en P peuvent être soit améliorés soit réduits selon les éléments minéraux en jeu (Daoui, 2007). Le type de source azotée joue sur la quantité de P absorbée par les plantes. Chez le haricot, Chaillou et *al.* (1986), en comparant l'effet de la forme d'azote nitrique ou ammoniacale sur, les prélèvements du phosphore, ont trouvé que les plantes ayant reçu  $\text{NH}_4^+$  avaient des teneurs relativement plus élevées en P que les plantes ayant reçu  $\text{NO}_3^-$ .

### III. Transformation microbienne du phosphore

La nutrition phosphatée des végétaux se fait à partir des ions de la solution du sol (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Xie, 2008). Ces ions proviennent en définitive de la solubilisation des formes minérales insolubles et de la minéralisation des formes organiques (Khan et *al.*, 2009) (Figure1).

#### III.1. Minéralisation microbienne du phosphore organique

Pour être utilisé par les végétaux, le phosphore organique doit au préalable être minéralisé (Schvartz et *al.*, 2005) ; les microorganismes responsables de la minéralisation du phosphore organique appartiennent à de nombreuses espèces de bactéries et champignons (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Xie, 2008 ; Khan et *al.*, 2009). Le principal mécanisme de la minéralisation du phosphore organique dans le sol est la production des phosphatases (Rodriguez et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009), et des phytases (Rodriguez et *al.*, 2006).

L'inoculation du sol avec des microorganismes augmente les prélèvements du phosphore des phytates, suggérant que les microorganismes jouent un rôle important dans la mobilisation du phosphore des phytates (Richardson *et al.*, 2001).

### **III.2. Immobilisation microbienne du phosphore minéral**

Lorsque les microorganismes se multiplient, ils immobilisent dans leurs cellules une partie du phosphore assimilable du sol. A la suite de l'incorporation au sol d'un substrat à rapport C/P très élevé, une prolifération importante des microorganismes telluriques, peut provoquer une baisse de la teneur du phosphore assimilable, donc l'apparition de carences phosphatées ayant pour origine l'immobilisation microbienne du phosphore inorganique (Dommergues et Mangenot, 1970). Cependant l'assimilation du phosphore soluble dans la biomasse microbienne empêche les risques d'adsorption et fixation du phosphore (Khan *et al.*, 2009).

### **III.3. Solubilisation microbienne des phosphates insolubles**

Un faible pourcentage de phosphore appliqué est utilisé par les plantes, ce qui nécessite des applications continues d'engrais chimiques (Rajankar *et al.*, 2007 ; Xie, 2008 ; Yazdani *et al.*, 2009). La solubilisation microbienne peut cependant améliorer l'efficacité des fertilisants minéraux (Khan *et al.*, 2009). Mikanova *et al.* (2002) ont montré que l'activité solubilisatrice des phosphates minérales est génétiquement codée par un gène situé dans le plasmide des microorganismes possédant cette activité.

Plusieurs champignons et bactéries sont connus pour leur capacité à solubiliser les phosphates inorganiques, rendant ainsi cet élément disponible pour les plantes (Gynesswar *et al.*, 2002 ; Xie, 2008 ; Khan *et al.*, 2009). Le nombre des microorganismes solubilisant les phosphates (MSP) est toujours important dans le sol rhizosphérique que dans un sol non rhizosphérique (Akhtar et Siddiqui, 2009), et le nombre d'espèces bactérienne solubilisant les phosphates (BSP) est plus important que les champignons (Chen *et al.*, 2006 ; Xie, 2008 ; Khan *et al.*, 2009).

Tiwari *et al.* (1989), ont trouvé un effet plus marqué de l'inoculation des plantes avec des MSP dans les sols déficients en phosphore. L'inoculation des graines ou du sol avec les MSP est bénéfique pour la plante par l'augmentation de la disponibilité du phosphore des sources insolubles (Akhtar et Siddiqui, 2009).

Des chercheurs ont montré que l'association des racines des plantes et les MSP peut jouer un rôle important dans la nutrition phosphatée dans la plus part des agrosystèmes naturels (Khan *et al.*, 2009 ; Akhtar et Siddiqui, 2009).

De nombreuses recherches ont été menées impliquant l'isolement et la caractérisation des MSP dans le but de développer des biofertilisants du phosphore qui peuvent accomplir les mêmes fonctions que la fixation biologique d'azote (Goldstein et Krishnaraj, 2003 ; Rodriguez et *al.*, 2006).

#### ▣ **Microorganismes responsables**

La rhizosphère des plantes est le siège le plus propice pour rechercher les effets bénéfiques des microorganismes (Akhtar et Siddiqui, 2009). Les rhizobactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus*, et *Rhizobium*, sont parmi les bactéries les plus puissantes dans la solubilisation du phosphate (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Igual et *al.*, 2001). Il a été démontré que certaines souches de rhizobium peuvent solubiliser même les phosphates organiques (Rashid et *al.*, 2004).

#### ▣ **Mécanismes de la solubilisation microbienne**

Le principal mécanisme de la solubilisation du phosphate minéral est la production des acides organiques (Babana, 2003 ; Chen et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009 ).

Les phosphates de calcium sont solubilisés à différents degrés en présence d'une large gamme d'acides organiques produits par les microorganismes (Goldstein, 2000 ; Xie, 2008). L'association entre les racines des plantes et la solubilisation microbienne des phosphates minérales joue un rôle important dans la nutrition phosphatée des plantes (Akhtar et Siddiqui, 2009 ; Khan et *al.*, 2009).

Nautiyal et *al.* (1999) confirment que la production des acides organiques est un mécanisme important dans la solubilisation du P. Cependant d'autres mécanismes tel que la chélation des ions, la production des acides inorganiques et les réactions d'échanges jouent un rôle dans la solubilisation des phosphates par les MSP (Halder et *al.*, 1991 ; Khan et *al.*, 2009), mais ils sont moins efficaces que les acides organiques (Rashid et *al.*, 2004).

L'acidification artificielle du milieu de culture par ajout d'acide minéral industriel, a provoqué une dissolution inférieure à celle obtenue en utilisant les microorganismes (Babana, 2003).

#### ▣ **Facteurs affectant la solubilisation des phosphates inorganiques**

Tous les facteurs agissant sur les microorganismes rhizosphérique occasionnent des variations de la solubilisation des phosphates inorganiques, ces facteurs relèvent à la fois du sol et des facteurs extérieurs au sol et sont de trois ordres : physiques, chimiques et biologiques (Morel, 1996).

##### ● **Facteurs physiques**

L'activité microbienne, croit avec la teneur en eau, avec un maximum se situant au voisinage de 60% ; et un optimum d'activité entre 25°C et 40°C. Cependant, on a démontré que l'activité microbienne d'une saison donnée est principalement orientée par la combinaison humidité et température du sol (Morel, 1996).

### ●Facteurs chimiques

Le pH du sol et principalement de la rhizosphère joue un rôle important dans l'activité des microorganismes dissolvant les phosphates inorganiques ; un pH relativement faible favorise l'activité de ces microorganismes (Hedley, 1982).

Le contenu en calcium du sol joue un rôle important dans la dissolution des phosphates inorganiques (Babana, 2003). En plus, les microorganismes du sol requièrent pour leur croissance un ensemble d'éléments chimiques (Morel, 1996). Nahas (2003), a constaté qu'un niveau élevé de source de carbone et un niveau bas d'azote et de phosphore sont des exigences pour la production d'acide citrique impliqué dans la solubilisation des phosphates.

### ●Effet des espèces de plantes

Certaines espèces de plante montrent des mécanismes localisés dans la rhizosphère qui permettent l'utilisation efficace du phosphore à travers la dissolution de la roche phosphatée (Arcand et Schneider, 2006). Selon Chien et Menon (1995), étudiant l'effet de différentes plantes sur la solubilisation des phosphates inorganiques, certaines plantes favorisent la solubilisation des phosphates naturels par une forte absorption du calcium. Les racines des plantes excrètent également des acides organiques, tel l'acide citrique, qui favorise la solubilisation du phosphore (Djadjaglo et Richter, 2008). En utilisant l' $N_2$  au lieu  $NO_3^-$  les légumineuse peuvent acidifier davantage leur rhizosphère, entraînant ainsi une dissolution accrue du phosphate naturel et par conséquent une augmentation de la biodisponibilité du phosphore (Behi, 2003).

### ▣ Isolement des microorganismes solubilisant les phosphates

Les microorganismes de la rhizosphère sont isolés par épuisement sur gélose en boîte de Pétri, avec comme milieu de base le milieu Pikovskaya (PVK) (1948) in Babana (2003). Le test d'efficacité des isolats à solubiliser les phosphates permet de sélectionner des microorganismes capables de produire des zones claires autour de leurs colonies (Babana, 2003 ; Xie, 2008). Ces zones claires sont dues à la production des acides organiques dans le milieu (Chen et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009).

La solubilisation du précipité du phosphate tricalcique dans le milieu solide a été largement utilisée comme un critère initial pour l'isolement des MSP (Ramachandran et *al.*, 2003).

Malgré l'obtention de bons résultats par cette méthode, d'autres chercheurs ont montré que, plusieurs microorganismes incapables de produire des zones claires autour de leurs colonies, peuvent solubiliser les phosphates inorganiques en milieu liquide (Xie, 2008).

Nautiyal (1999), a mis au point un milieu de culture très efficace pour étudier la solubilisation des phosphates naturels. Ce milieu est connu sous le nom (NBRIP) : National Botanical Research Institutes's growth medium phosphate (Babana, 2003).

Fankem et *al.* (2006) ; Xie (2008), confirment que le critère pour isoler les MSP efficaces basé sur la formation d'un visible halo de solubilisation dans l'agar n'est pas le seul critère de sélection, d'ailleurs ils ont observé que les meilleures souches qui solubilisent le phosphate dans le milieu liquide n'ont pas pu montrer la zone claire dans le milieu solide.

#### ▣ Contribution des microorganismes solubilisant le P à la croissance des plantes

L'application des MSP peut augmenter le nombre de nodules, le poids sec de nodules, les composantes du rendement, le rendement en grains, et les éléments du sol (Son et *al.*, 2006).

Elles produisent aussi de l'acide indole acétique et des phytohormones impliqués dans l'initiation racinaire et la division cellulaire (Ponmurugan et Gopi, 2006 ; Marschner, 2008).

Plusieurs expériences réalisées en serre et au champ, ont montré une forte croissance et une augmentation intéressante de la production des plantes inoculées avec les MSP (Babana, 2003 ; Khan et *al.*, 2009).

L'inoculation par les MSP stimule l'activité de la nitrogénase, favorise la fixation de l'azote atmosphérique et la solubilisation des phosphates naturels (Antoun, 1996). La plus grande activité solubilisatrice du phosphate est obtenue avec des souches de *Rhizobium leguminosarum bv.phaseoli*. L'effet de la solubilisation des phosphates apparaît le plus important mécanisme favorisant la croissance des plantes dans les sols moyennement fertiles (Babana et Antoun, 2006 ; Sharma et *al.*, 2007 ; Afzal et Bano., 2008).

### IV. Les phosphates naturels

Plusieurs facteurs peuvent affecter la disponibilité du phosphore contenu dans la roche phosphatée. Une première série de facteurs se rapportent au phosphate de roche lui-même. Il s'agit des caractéristiques chimiques et physiques de la roche (sa composition minérale, sa surface active). Une deuxième série de facteurs se rapportent aux conditions dans lesquelles on l'utilise. Il s'agit du type de sol (sa texture, son contenu en certains minéraux, son pH, son niveau d'activité biologique) et des espèces végétales que l'on veut produire (Duval, 1993).

#### IV.1. Solubilisation de la roche phosphatée

Le phosphore exporté par les cultures peut significativement réduire le phosphore soluble labile dans le sol et diminuer ainsi le phosphore total du sol sans alimentation externe, l'application de la roche phosphatée augmenterait le phosphore total avec un potentiel de réapprovisionnement du phosphore labile et la disponibilité du phosphore pour les plantes (Arcand et Schneider, 2006). De plus l'addition de la roche phosphatée avec des cultures microbiennes améliore beaucoup la croissance des plantes, la symbiose et les prélèvements des nutriments.

En conjugaison avec les microorganismes solubilisant les phosphates, la roche phosphatée procure une source moins chère de fertilisant phosphaté pour la production des cultures (Zaidi et Khan, 2005), sa solubilisation fournit plus de phosphore et d'une façon continue pour la croissance optimale des plantes (Supanjani et al., 2006).

La capacité de la solubilisation des phosphates *in vitro* n'est pas souvent corrélée avec la mobilisation du phosphore pour les plantes (Srivastava et al., 2003). Le phosphate de roche est riche en complexe de (Ca-P) qui va être solubilisé dans des sols acides, leur dissolution entraîne une libération lente de P dans le sol. Cependant l'utilisation de la roche reste limitée à cause de nombreux facteurs contrôlant sa dissolution dans le sol et sa disponibilité pour les plantes (Srivastava et al., 2003). Anderson et al. (1985), ont trouvé que 75% du phosphore disponible aux plantes provenant de la dissolution de la roche dépend des caractéristiques du sol: le pH, le Ca<sup>2+</sup>, la concentration du H<sup>+</sup> et le contenu en matière organique. De même Ivanova et al., (2006), rapportent que la solubilisation de la roche dépend de : la concentration du phosphate dans le milieu nutritif, de la taille granulométrique du phosphate tricalcique, de la diminution du pH, de la production des acides et de l'isolat utilisé. Pour les plantes et les microorganismes, les deux mécanismes primaires attribués à la solubilisation de la roche sont : l'excrétion des protons (H<sup>+</sup>) et la production d'acide organique (Arcand et Schneider, 2006).

#### ● Excrétion de protons (H<sup>+</sup>) et dissolution de la roche phosphatée

Les légumineuses qui fixent l'azote atmosphérique prélèvent plus de cations que d'anions contribuant à la libération de protons (Hinsinger et al., 2003), qui favorisent la solubilisation de la roche, et par conséquent la libération du P dans le sol (Arcand et Schneider, 2006).

L'excrétion de H<sup>+</sup> due à l'assimilation de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est une alternative métabolique pour la solubilisation du P insoluble (Goldstein et Krishnaraj, 2003).

Durant l'assimilation de l'NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, les racines des plantes libèrent des protons ce qui entraîne une diminution du pH (Arcand et Schneider, 2006). Gahoonia et al. (1992), ont trouvé que le pH de la rhizosphère de ray gras diminue de 1,6 unité quand il est fertilisé avec NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, alors qu'il diminue de 0,6 unité avec NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; comme les plantes l'excrétion de H<sup>+</sup> par les microorganismes est le résultat d'une assimilation de cations. On utilisant le milieu de culture au laboratoire il a été observé que la roche est plus solubilisée quand on utilise l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) au lieu du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> comme source d'azote (Nahas, 2003). Pour quelques microorganismes, la libération de H<sup>+</sup> due à l'assimilation de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> paraît le seul mécanisme favorisant la dissolution de la roche (Arcand et Schneider, 2006).

#### ● Production d'acides organiques et dissolution de la roche phosphatée

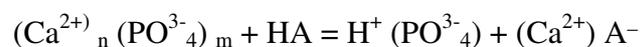
Plusieurs MSP solubilisent le complexe de phosphate de calcium par la sécrétion des acides organiques (Srivastava et al., 2003; Rashid et al., 2004; Vassilev et al., 2006; Khan et al., 2009).

Les acides organiques produits par les microorganismes sont les acides gluconique, oxalique et citrique (Richardson, 2001) ; par contre les plantes produisent les acides ; citrique, oxalique et malique (Djadjaglo et Richter, 2008).

La capacité des acides organiques à solubiliser la roche phosphatée est attribuée aux mécanismes suivants : acidification et chélation (Omar, 1998).

#### ■ Acidification

Dans la plupart des sols, les réactions de substitution des protons est conduite par la production microbienne des acides organiques (Goldstein et *al.*, 2000 ; Pradhan et Sukla, 2005) représentée par l'équation suivante :



Les acides organiques contribuent à la diminution du pH de la solution du sol (Arcand et Schneider, 2006). L'acide gluconique et citrique sont impliqués dans la solubilisation des roches phosphatées (Reyes et *al.*, 2001). Certaines souches bactériennes à gram négatif dissolvent les phosphates de calcium par la production des acides gluconiques et 2-ketogluconiques, et par des enzymes localisées dans l'espace périplasmique (Goldstein et *al.*, 1999) ; de ce fait leur production entraîne la solubilisation de la roche phosphatée (Gyneshwar et *al.*, 2002).

#### ■ Chélation

En plus de la réduction du pH, les anions des acides organiques peuvent solubiliser les roches à travers des réactions de chélation; les anions des acides organiques ont la capacité de former des complexes stables avec les cations tel que :  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  (Khan et *al.*, 2009 ).

## IV.2. Conclusion

A travers la production des ions ( $H^+$ ) et les acides organiques, les plantes et les microorganismes sont les deux capables de solubiliser la roche phosphatée. Les plantes qui peuvent mobiliser le phosphore des roches peuvent être utilisées comme engrais vert par l'incorporation de leur biomasse dans le sol, la minéralisation subséquente des résidus de plantes peut aider à réapprovisionner le phosphore labile et le phosphore de la solution du sol, et améliorer la fertilité des sols (Arcand et Schneider, 2006).

Le principal avantage de la roche phosphatée est son coût peu élevé, il devrait surtout être utilisé pour bâtir les réserves en phosphore du sol à long terme et non pas pour satisfaire les besoins immédiats des cultures. Si on veut l'utiliser comme source de phosphore à court terme, il faut se disposer d'un sol relativement acide avec une bonne activité biologique (Behi, 2003).

## **V. Interaction Rhizobium-légumineuse**

### **V.1. Le macrosymbionte**

Parmi les principales cultures devant conduire à la sécurité alimentaire figure le niébé (cornille, dolique à œil noir), est l'une des légumineuses à graines la plus cultivée en Afrique occidentale. Son taux élevé de protéine et son importance dans le régime alimentaire des populations, font de cette culture un élément important de la sécurité alimentaire (Allogni et *al.*, 2004).

Le niébé occupe une place importante dans les zones soudano-sahélienne et guinéenne, il contient 3400 calories et 230 g de protéines par kg, soit deux fois plus que le mil et le sorgho, (FAO, 2000). En plus de ses qualités nutritionnelles, le niébé est peu exigeant en engrais et tolérant à la sécheresse. Il améliore la fertilité des sols par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique (Allogni et *al.*, 2004).

Au cours de ces deux dernières décennies, le niébé est passé dans plusieurs pays d'une culture de subsistance à une culture de rente assez importante. La production a atteint 100.000T, 300.000 et 200.000T dans la plupart des pays africains notamment au Bénin, au Burkina Faso et au Ghana respectivement (FAO, 2000).

Le niébé est originaire de l'Afrique du Sud-Est. Il est cultivé et consommé extensivement en Asie, en Amérique du Sud et du Centre, dans les Caraïbes, aux Etats Unis, dans le Moyen Orient et en Europe centrale. Le niébé est un aliment de base apprécié en Afrique car ses feuilles, gousses vertes et graines sèches peuvent être consommées et commercialisées (FAO, 2000).

La superficie totale mondiale de production est estimée à 10,13 millions d'hectares avec une production annuelle de 3,9 millions de tonnes (FAO, 2005). Les principaux pays producteurs en Afrique de l'Ouest sont le Nigeria, le Niger, le Mali, le Burkina Faso, le Sénégal et le Ghana (FAO, 2000). Le Nigéria est le premier producteur mondial avec 2,3 millions de tonnes et une superficie cultivée de 5,3 millions d'hectares (FAO, 2005).

En Algérie, cette espèce communément appelé niébé (nom vernaculaire : loubia Kabyle en Kabylie, Tadelaght dans les oasis du sud ou loubia arebi dans la région d'EL Kala) est cultivée et consommée traditionnellement dans certaines région telles la Kabylie, la zone Est de la wilaya d'EL Taref et les oasis du sud. Cette espèce qui semble liée aux vieilles cultures berbères, n'est plus cultivée que sur des superficies très restreintes ; ce qui peut causer à long terme son extinction et par conséquent sa disparition totale (Ghalmi et *al.*, 2004).

## ● Importance du niébé dans les systèmes de production

Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par les légumineuses, puis par les cultures suivantes (Allogni *et al.*, 2004). Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Allogni *et al.*, 2004).

## ● Les aptitudes agronomiques du niébé

Du point de vue agronomique, le niébé est bien adapté aux conditions climatiques, édaphiques, et socioéconomiques de l'Afrique Sub-saharienne. Son intérêt particulier en Afrique réside dans : (i) une adaptation à la sécheresse ; (ii) un haut potentiel de fixation biologique de l'azote dans les aires de cultures traditionnelles dont les sols sont pauvres (faible teneur en matière organique <0,2 %), haute composante de sable (>85 %), et une adaptation à une gamme large de pH (4,5 – 9,0) ; (iii) une tolérance aux hautes températures durant son stade végétatif ; (iv) un bon comportement sous l'ombrage ; (v) une croissance végétative rapide ; (vi) de multiples usages comme légume vert, graines sèches et fourrage (Allogni *et al.*, 2004).

## V.2. Le microsymbionte

Les microorganismes peuvent former des associations intimes avec les racines soit à l'intérieur du tissu racinaire, à la surface des racines, ou bien dans le sol collé immédiatement sur les racines (Andriankaja, 2001).

Les bactéries qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses, sont appelées collectivement rhizobium (Raven *et al.*, 2000). Du point de vue phylogénétique, ces bactéries appartiennent aux protéobactéries, de type Gram négatif, aérobies et en forme de bâtonnet. Ils forment des colonies incolores, blanches ou de couleur crème, sur le milieu de culture contenant du mannitol et extrait de levure (Duhoux et Nicole, 2004).

Les souches de rhizobium associées à vigna appartiennent au genre *Bradyrhizobium* dans lequel plusieurs espèces sont actuellement reconnues, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* (Duhoux et Nicole, 2004).

## V.3. Interaction rhizobium-légumineuses

La rhizosphère est généralement définie comme étant le sol qui est sous l'influence directe des racines (Seddiki, 1999 ; Akhtar et Siddiqui, 2009). Elle est le siège d'échanges intenses entre les

racines et le sol. Ces échanges sont d'ordre physique, chimique et biologique (Seddiki, 1999).

Dans la réaction symbiotique Rhizobium/ plante-hôte, deux critères sont à prendre en compte :

L'aptitude à noduler ou infectivité, et l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique ou effectivité.

Ces deux critères peuvent être appréciés du point de vue bactéries ou de la plante-hôte et sous

l'influence des conditions environnementales (Duhoux et Nicole, 2004).

Au sein de l'association symbiotique entre les bactéries et les légumineuses, les bactéries procurent

aux plantes une forme d'azote utilisable pour la synthèse de leurs protéines. De son côté, la plante

procure aux bactéries d'une part l'énergie indispensable à la fixation de l'azote et, d'autre part

les molécules carbonées nécessaires à la production de leurs propres molécules azotées (Raven et *al.*, 2000).

### ● **Importance de la fixation biologique de l'azote atmosphérique**

La fixation biologique de l'azote marque un point déterminant dans le domaine de la production

agricole. Elle est envisagée pour procurer des économies dans la pratique de la fertilisation. Elle

semble correspondre à une alternative aux producteurs des pays en voie de développement souffrant

d'un accès limité aux intrants (Andriankaja, 2001). Les bactéries symbiotiques sont de loin les plus

importantes si l'on tient compte des quantités totales d'azote fixé (Duhoux et Nicole, 2004).

### ● **Mécanisme de la fixation biologique de l'azote**

La fixation biologique de l'azote est l'œuvre de bactéries. Elle constitue l'une des voies biologique de

restitution de l'azote atmosphérique au niveau de la terre (Andriankaja, 2001).

L'azote est un des éléments les plus importants pour la vie des plantes. Toutefois, la plupart d'entre

elles n'utilisent que l'azote combiné avec d'autres atomes (tels ammonium, nitrates). Pourtant, la plus

grande concentration d'azote sur terre est celle de l'atmosphère (environ 80%) (Gros, 1979).

Le mécanisme biologique de cette restitution est la réduction de l'azote moléculaire par les bactéries

(symbiotique associative ou libre) par l'action d'une enzyme qui catalyse la fixation: la nitrogénase

qui utilise de grandes quantités d'ATP comme source d'énergie, ce qui fait de la fixation de l'azote

un processus métabolique onéreux (Duhoux et Nicole, 2004).

L'azote est d'abord réduit en ammoniac (Raven et *al.*, 2000 ; Duhoux et Nicole, 2004), qui sera

incorporé dans les squelettes carbonés pour former des acides aminés.

### ● **Nodulation**

L'apparition de nodules au niveau des racines est le critère de détermination de l'activité des agents

fixateurs (Andriankaja, 2001). Les nodules racinaires des légumineuses sont composés d'un cortex

mince entourant une zone centrale contenant des cellules infectées et des cellules indemnes de

bactéroïdes (Duhoux et Nicole, 2004).

### **- Les premiers signaux**

Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol (Raven et *al.*, 2000). Certaines d'entre elles appartiennent aux groupes des flavonoïdes tels les flavones, isoflavones, flavonones (Andriankaja, 2001 ; Duhoux et Nicole, 2004).

A la suite de leur sécrétion, il y a accumulation de bactéries autour des poils absorbants. Ce phénomène correspond à un effet rhizosphérique exercé par les racines des plantes, ensuite les poils se recourbent sous l'infection des bactéries. Par hydrolyse de la paroi cellulaire, celles-ci pénètrent à l'intérieur des racines, au niveau des poils absorbants (Andriankaja, 2001).

### **- La production des facteurs de nodulation**

Les flavonoïdes sont en fait des mélanges d'inhibiteur ou d'inducteurs du gène de la nodulation (Raven et *al.*, 2001). En réponse à ces flavonoïdes, les bactéries sécrètent des facteurs de nodulation. Ces facteurs sont codés par les gènes des bactéries. Comme il s'agit également d'un mélange de facteurs, leur composition va déterminer la reconnaissance du *Rhizobium* par la plante (Duhoux et Nicole, 2004). Certains facteurs peuvent être actifs positivement alors que d'autres antagonistes. L'équilibre entre ces facteurs détermine la reconnaissance du *Rhizobium* par la plante. Cette reconnaissance est essentielle pour la plante. En effet, puisque la symbiose représente une dépense énergétique pour la plante, il lui faut déterminer avec certitude le partenaire idéal, capable de lui fournir l'azote nécessaire (Andriankaja, 2001).

#### **● Spécificité souche-plante**

Certaines souches sont capables de s'associer à un large spectre de plante alors que d'autres ne le sont pas. Cela dépend de leur affinité respective. Ainsi, la connaissance de cette spécificité pour chaque plante et pour chaque souche bactérienne capable de former avec elle un complexe de fixation, s'avère donc nécessaire. Étant donné le nombre élevé de microorganismes dans le sol, l'établissement du complexe de fixation est le résultat d'une compétition entre les agents fixateurs et les autres microorganismes. Il faut donc que les bactéries fixatrices spécifiques de la plante soient présentes et capables de s'exprimer face à cette masse microbienne. Pour cela, un mécanisme sélectif est exercé par la plante, afin de déterminer la bactérie susceptible de se constituer en un complexe symbiotique avec elle. Cette sélection s'effectue par l'intermédiaire des facteurs de nodulation émis par la bactérie (Andriankaja, 2001).

# MATERIELS ET METHODES

## **1. Données relatives sur le milieu de culture**

### **1.1. Localisation de l'essai**

L'essai est mené dans des pots en matière plastique contenant 10 kg d'un mélange de terre, sable de rivière et fumier, ce mélange est stérilisé 3 fois à l'autoclave à 150°C pendant 20 mn avec un intervalle de temps de 24 heures.

L'expérimentation est réalisée au niveau du département phytotechnie (ENSA).

### **1.2. Caractéristiques édaphiques du milieu**

Les pots sont remplis d'une terre provenant d'une parcelle située à Staouéli, ayant comme précédent cultural une jachère. Les échantillons sont prélevés sur une profondeur de 20cm. Les échantillons recueillis, sont séchés à l'air et passés au tamis à mailles 5mm pour éliminer les cailloux, puis sur tamis à mailles 2mm.

Pour définir les caractéristiques physico-chimiques du sol, un échantillon moyen est prélevé après un mélange de terre, sable et fumier afin de déterminer les caractéristiques suivantes : Granulométrie, pH eau, la conductivité électrique, le calcaire total, le carbone organique, l'azote total, et le phosphore assimilable.

- **L'analyse granulométrique**

Elle s'effectue par la méthode Internationale à la pipette de ROBINSON. Elle consiste à :

- Détruire la matière organique, en éliminant les éléments en agrégats par de l'eau oxygénée ;
- Disperser l'argile enrobant les particules, et en les sondant en agrégats par l'hexamétaphosphate de sodium et par agitation mécanique ;
- Faire des prélèvements au cours de la sédimentation, à une profondeur et à des moments précis pour isoler les éléments non tamisables: argile, limons fins et grossiers, puis séparer par tamisage les sables grossiers et fins.

- **pH eau**

La mesure du pH s'effectue à l'aide d'un pH-mètre sur une solution contenant 20g de terre fine (2mm) et de 50ml d'eau distillée, avec agitation mécanique pendant 5mn.

- **La conductivité électrique de l'extrait aqueux 1/5**

- Peser 20g de terre tamisée (2mm) dans un bécher de 250ml, et ajouter 100ml d'eau distillée ;
- Agiter 2mn sur l'agitateur magnétique ;

- Passer les solutions d'étalonnage de la cellule en notant la température ;
- Calculer la conductivité électrique à 25C°

- **Calcaire total**

Le dosage est réalisé par la méthode volumétrique au calcimètre de BERNARD

- Décomposer le carbonate de calcium par l'acide chlorhydrique, et mesurer le volume de CO<sub>2</sub> obtenu.

- **Le carbone organique**

Elle s'effectue par la méthode (ANNE)

- Le carbone organique est oxyde par du bichromate de potassium en excès, en milieu sulfurique. L'excès de bichromate non réduit par le carbone organique est alors titre par une solution de sel de MOHR (qui réduit le bichromate), en présence de diphénylamine dont la couleur passe du bleu foncé au bleu vert.

**Matière organique = Carbone organique x 1, 72.**

- **L'azote total**

L'attaque de la matière organique par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, qui agit comme oxydant en présence d'un catalyseur qui abaisse la température d'action de l'acide sulfurique. L'ammoniac formé est déplacé par la soude, distillée, retenu dans l'acide borique et titré par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- **Le phosphore assimilable**

Cette méthode utilise une solution 0,2 N d'oxalate d'ammonium, avec une agitation rotative de 02 heures, puis filtré la solution par un filtre plissé. Puis on prépare :

**La gamme étalon :**

- Peser 1,917 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et l'introduire dans un ballon jaugé de 1l, le faire dissoudre dans de l'eau chaude, puis complété avec de l'eau distillée, et homogénéiser.
- Dans un ballon jaugé de 200ml, prélever 10ml de la solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, et complété à 200ml avec de l'eau distillée et homogénéiser (cette solution fille sera utilisée dans la gamme).
- Mettre 14,2g d'oxalate d'ammonium dans 1l d'eau distillée chaude, et vérifier le pH= 6,5-7.
- On prépare la solution : 0,5g d'acide ascorbique avec 500ml d'eau distillée.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Oxalate d'NH <sub>4</sub>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Réactif sulfomolybdique	2	2	2	2	2	2	2	2
Acide ascorbique	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6,0	5,9	5,8

### L'échantillon du sol

Solution d'extraction	1,5	1
Réactif sulfomolybdique	2	2
Acide ascorbique	6,5	7

- On fait passer la gamme étalon et l'échantillon du sol au bain marie pendant 10mn à 85C<sup>0</sup>.
- La lecture se fait par le spectrophotomètre à 430nm.

## 2. Matériel végétal et l'inoculum

### 2.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur une population locale de *Vigna unguiculata* cultivée au niveau de la région d'EL Kala. La dénomination de cette population correspond au nom de l'agriculteur qui l'a fournie. La population de Boussaha Nadji à graines blanches, et hile marron est utilisée dans cet essai. Le choix de cette espèce de vigna est basé sur le faite, qu'elle est cultivée sur des superficies très restreintes; ce qui peut causer à long terme son extinction et par conséquent sa disparition totale.

### 2.2. Isolats rhizobiens

Quatre isolats rhizobiens sont retenus au cours de cette étude, dont deux à croissance rapide et deux à croissance lente. Ces isolats sont isolés à partir de nodules d'arachide.

Le choix des isolats est basé sur le faite, que les isolats R3 et R6 ont entraîné la solubilisation des phosphates dans le milieu solide, et que les isolats R1 et R5 sont capable de noduler le vigna.

**Tableau 3 :** Liste des isolats rhizobiens

<i>Isolats</i>	<i>Caractéristique</i>
R1	Isolat à croissance lente
R3	Isolat à croissance rapide
R5	Isolat à croissance lente
R6	Isolat à croissance rapide

Pour la culture et la conservation à court terme des isolats rhizobiens, nous avons utilisé le milieu YMA.

### **2.2.1. Evaluation de l'activité solubilisatrice des isolats**

Certaines BSP qui ne produisent pas d'halo de solubilisation sur milieu solide peuvent solubiliser efficacement le phosphore en milieu liquide. Pour cela, on a effectué deux tests : le premier en milieu solide, et le deuxième en milieu liquide.

#### **-Test de solubilisation en milieu solide**

Pour évaluer leur activité solubilisatrice, les isolats rhizobiens sont testés sur milieu PVK gélosé coulé en boîte de pétri (Pikovskaya, 1948 in Pradhan et Sukla, 2005), incubé pendant 7 jours à 28°C. Le milieu PVK contient le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore.

L'activité solubilisatrice est visualisée par la formation d'une zone claire autour des colonies (Babana, 2003 ; Xie, 2008).

#### **-Test de solubilisation en milieu liquide**

Chaque isolat provenant d'une culture jeune sur milieu (PVK) gélosé est utilisé pour inoculer des erlen-meyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu (NBRIP) liquide avec le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore (Nautiyal, 1999) ; les milieux inoculés sont placés dans un incubateur agitateur (200 tours/mn) à 28°C, pendant 7 jours, ensuite, le pH des milieux de cultures est déterminé (Trivedi et *al.*, 2003).

On peut estimer la quantité de phosphore solubilisé dans le milieu liquide par la lecture de la densité optique à 430nm par le spectrophotomètre.

### **2.3. Préparation de l'inoculum**

Selon la méthode Vincent, (1970), l'inoculum est obtenu après ensemencement par une culture bactérienne récente d'un milieu de culture YMB (Annexe I), réparti à raison de 5 ml dans des tubes à essai, ces derniers sont incubés sous agitation rotative à 200 tours/mn à 28°C pendant 5 jours pour les souches à croissance lente et 48h pour les souches à croissance rapide. Cette pré-culture est ensemencées dans des erlen-meyers de 500 ml contenant 100 ml de YMB avec 2 répétitions pour chaque isolat ; les erlen-meyers sont ensuite incubés sous agitation rotative à 200 tours/mn à 28°C jusqu'à l'obtention des inoculums à aspect trouble correspondante à une concentration cellulaire de  $10^9$  cellules/ ml de culture pour les souches à croissance rapide et  $10^{10}$  pour les souches à croissance lente.

Les inoculums ainsi obtenus sont mélangés avec de la tourbe à raison de 2 erlen-meyers d'inoculum avec 2 erlen-meyers de tourbe (environ 200g) pour chaque isolats ; ce mélange ainsi obtenu est alors humidifié à 60% par l'inoculum.

Le traitement témoin a reçu la même tourbe non bactérisée ramenée à la même humidité avec de l'eau distillée.

### **2.4. Mise en place de l'essai**

Les pots remplis du mélange ont reçu le phosphate naturel à raison de 12,2 % de P total, ce qui équivaut à une dose d'application de 0,05g/kg de sol, une pré irrigation a été faite un jour avant le semis.

Avant l'inoculation, les graines sont stérilisées dans de l'eau de javel pendant 5mn puis lavées à 10 reprises avec de l'eau stérilisée.

Le semis a été réalisé le 23/04/08 à raison de 5 graines/pot inoculées directement avec le mélange (inoculum et tourbe stérilisée).

### **II.2.5. Dispositif expérimental**

L'essai a été réalisé en pots suivant un dispositif expérimental aléatoire complet avec quatre blocs, quatre répétitions par traitement, et deux témoins dont un témoin sans inoculum et fertilisé avec le phosphate naturel (TS0), et un témoin non inoculé et non fertilisé (T).

## **3. Suivi de l'essai**

Après complète germination, un éclaircissage est effectué en ne gardant qu'un seul plant/pot.

Les arrosages sont réalisés régulièrement tous les 3 jours. Cette fréquence d'irrigation appliquée est fonction du stade de la plante et du climat.

On a traité avec le Métaldéhyde granulé contre les limaces, et avec le pychlorex contre les pucerons à une dose de 2 ml/ l.

#### **4. Les paramètres étudiés**

##### **4.1. Au stade végétatif**

Le nombre de feuilles, la hauteur de la tige principale et la surface foliaire sont mesurés.

La hauteur de la tige principale des plants est mesurée en centimètres à partir du collet jusqu'à la dernière feuille pour chaque plant.

La surface foliaire est estimée par la méthode de Paul et *al.* (1979).

##### **4.2. Au stade floraison**

La hauteur de la tige principale, le nombre de feuilles, le nombre de rameaux primaires, le nombre de fleurs, le nombre de nodule, l'activité réductrice d'acétylène, le poids frais et le poids sec de la partie aérienne et racinaire sont mesurés.

La fixation de l'azote est estimée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A) directement dans le pot par la méthode « in situ » mise au point par Balandreau et Dommergues (1971).

La partie racinaire est isolée de la partie aérienne de la plante, en couvrant le pot par un sac en plastique bien fermé au niveau du collet. A l'aide d'une seringue, un volume de 10 ml d'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) est injecté dans le pot à travers le sac en plastique. Après 30 mn d'incubation, un volume de 5 ml de mélange gazeux est prélevé, stocké dans des tubes venoject. L'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) produit est dosé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Bergersen, 1980).

$$\text{ARA } (\mu\text{mols de C}_2\text{H}_4/\text{h/plant}) = \text{H éch} \times \text{V1} \times \text{V2} \times \text{V4} \times \text{V5} \times 60 \times 10^6 / \\ \text{H ethy} \times 24500 \times \text{V2} \times \text{V3} \times \text{V6} \times \text{T}$$

V1: volume éthylène étalon, V2: volume injection à la chromatographie, V3: volume flacon étalon, V4: volume venoject, V5: volume du pot, V6: volume prélèvement de l'échantillon, T: Temps d'incubation.

### 4.3. Au stade maturité

Au stade maturité des gousses les paramètres suivants sont mesurés :

- ◆ Nombre de gousses/plante
- ◆ Nombre de graines/gousse
- ◆ Nombre de graines/plante
- ◆ Poids de 100 graines
- ◆ Rendement en grains.

### 4.4. Après la récolte

Nous avons procédé à une analyse chimique du sol concernant le phosphore assimilable, et une analyse des tissus foliaires pour le phosphore total et l'azote total.

Le contenu en phosphore total des matières sèches végétales du niébé est déterminé par colorimétrie, après incinération de la partie aérienne des plantes. Le phosphore est déterminé par le réactif Vanadomolybdique (Méthode OLSEN). La lecture de la densité optique (DO) est faite à 430 nm. La teneur en azote total est déterminée par la méthode kjeldhal.

Le phosphore assimilable du sol est déterminé par la méthode Joret-Hebert.

#### **Dosage du phosphore total du végétal (méthode OLSEN)**

- Faire incinérer les feuilles dans le four à moufle à 550C° pendant 4h, et laisser refroidir.
- Peser 0,5g de la poudre végétale et transvaser dans un bécher avec 2 a 3 ml de HCL (12N), et agiter (2-3mn).
- Porter à ébullition (100ml30sc), laisser refroidir, filtrer sans cendre dans une fiole de 100ml et rincer le papier filtre, puis compléter à 100ml et mélanger bien.
- Prélever 10ml d'extrait filtré avec 10ml du réactif de vanadomolybdique.

#### **Réactif vanadomolybdique (couleur jaune):**

- **Solution A** transparente contenant : 100g d'heptamolybdate d'ammonium et 10ml d'ammoniac, puis ajuster à 1l, et chauffer légèrement.
- **Solution B** orange contenant : 400ml d'eau bouillante avec 2,35g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  et 5ml de  $\text{HNO}_3$  concentré, puis ajuster à 1l.
- Faire le mélange de A et B, et rajouter 90ml de  $\text{HNO}_3$  concentré, puis compléter à 1l.
- On prépare une solution mère avec  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,916g), et 1l de l'eau distillée, puis on prélève 10ml de la solution mère , et on rajoute 100ml d'eau distillée (solution fille).

### La gamme étalon :

Tubes	0	1	2	3	4	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100mg/l de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0	2	4	6	8	10
Eau distillée	10	8	6	4	2	0
Réactif vanadomolybdique	10	10	10	10	10	10
Quantité finale en P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

On conserve les tubes à essai de la gamme au maximum 1h, le temps de préparer les échantillons.

- On fait passer la gamme étalon, et l'échantillon du sol au bain marie pendant 10mn à 85C<sup>0</sup>.
- La lecture se fait par le spectrophotomètre à 430nm.

### 5. Traitements statistiques des données

Les résultats recueillis pour l'ensemble des paramètres étudiés ont été soumis à une analyse de la variance avec le logiciel STATITCF. Ce logiciel nous a permis de faire l'analyse de la variance et le classement des moyennes.

L'analyse de la variance permet d'estimer le degré de signification entre les différents traitements étudiés. Le test de Newman et Keuls au seuil 5% permet de constituer des groupes homogènes.

Une analyse en composantes principales (ACP) avec le logiciel (WINSTAT) est effectuée. Son objectif est de voir comment se structurent nos variables, quelles sont celles qui sont associées et celles qui ne le sont pas ? Et comment se répartissent nos isolats : quels sont ceux qui se ressemblent et ceux qui sont dissemblables ?

# RESULTATS ET DISCUSSION

## I. Caractéristiques physico-chimiques du sol

Les caractéristiques physico-chimiques du sol sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Caractéristiques physico-chimiques du sol.

Paramètres	Unités	Résultats	Méthodes d'analyse	Interprétations
Argile	%	55	Méthode Internationale à la pipette de Robinson	Sol à texture argileuse
Limon fin		20		
Limon grossier		15,9		
Sable fin		8,8		
Sable grossier		0,3		
pH eau	-	7,4	PH-MÈTRE sur une suspension sol/eau de 1/2,5	pH légèrement alcalin
CE	mmho /cm	0,72	Au conductimètre sur une suspension terre/liquide de 1/5	Sol légèrement salé
Calcaire total	%	20,73	Méthode volumétrique au calcimètre de BERNARD	Sol modérément calcaire
N total	%	0,7	Méthode KJELDHAL	Sol bien pourvu en azote.
C	%	4,1	Méthode ANNE	Sol riche en matière organique
P (assimilable)	ppm	240	Méthode Joret-hebert	Sol moyennement pourvu
C/N	-	5,85		Minéralisation rapide de la matière organique

D'après les résultats de l'analyse du sol, il ressort que ce dernier est argileux, avec un taux de matière organique élevé, le rapport C/N indique une minéralisation rapide de la matière organique. Pour le pH, le calcaire et la salinité, le sol est légèrement alcalin, renfermant peu de calcaire et une faible salinité. Il est bien pourvu en azote et moyennement riche en phosphore assimilable (Annexe III).

## **II. Effet des isolats sur la solubilisation des phosphates**

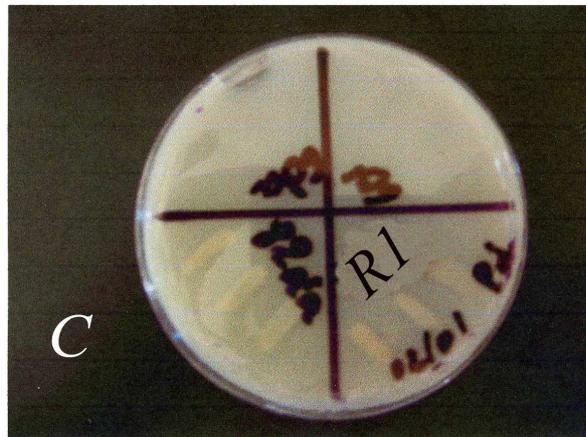
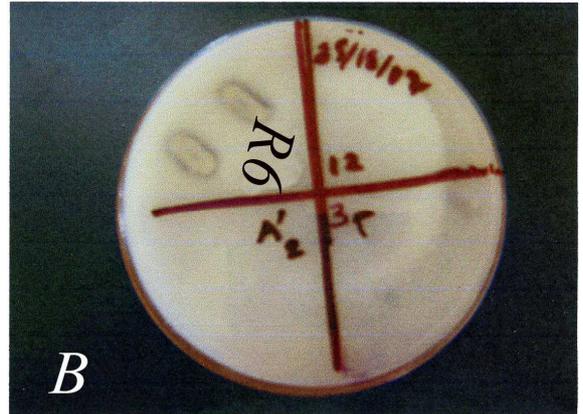
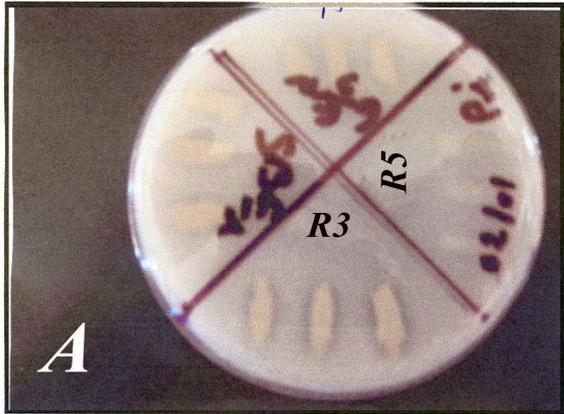
### **II.1. En milieu solide**

Les isolats R3 et R6 semblent solubiliser plus efficacement le phosphate tricalcique par la formation d'une zone claire autour de leur colonie. Par contre aucune zone claire n'a été observée pour les isolats R1 et R5 (figure 4). Selon Ramachandran et *al.*, (2003), les microorganismes produisant des zones claires sont capables de solubiliser les phosphates tricalciques.

La formation de la zone claire indique la dissolution des phosphates tricalciques en phosphates monocalciques due à la sécrétion d'acides organiques par les isolats (Trivedi et *al.*, 2003 ; Chen et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009.).

D'après Fankem et *al.* (2006), les meilleures souches qui solubilisent le phosphore dans le milieu liquide n'ont pas pu montrer de zone claire autour de leur colonie dans le milieu solide ; ce qui montre bien que la formation de la zone claire n'est pas le seul critère pour sélectionner les microorganismes solubilisant les phosphates. Mais selon Ramachandran et *al.* (2003), la solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu solide a été largement utilisée comme critère initial pour l'isolement des MSP.

D'après Alam et *al.* (2002), la plupart des microorganismes solubilisant les phosphates, perdent leur capacité de formation de la zone claire dans le milieu après des repiquages répétés. De ce fait, la conservation de la capacité de solubilisation des phosphates après plusieurs repiquage devrait être le premier critère de sélection des BSP (Igual et *al.*, 2001 ; Xie , 2008). Puisque la solubilisation des phosphates est couplée à l'acidification du milieu réactionnel (Babana 2003 ; Xie, 2008). Un deuxième test en milieu liquide a été effectué.



**Figure 4:** Effet des isolats sur la solubilisation des phosphates en milieu solide (PVK)

## II.2. En milieu liquide

La variation du pH du milieu de culture pour chaque isolat testé est présentée dans le tableau 2 :

**Tableau 2** : Effet des isolats sur la variation du pH du milieu liquide (NBRIP)

Isolats	R1	R3	R5	R6	Milieu de culture
pH	6,5	5,8	6,7	5,2	7,0

Le pH le plus bas est obtenu avec l'isolat R6 suivi par l'isolat R3 (Tableau 2). Nos résultats corroborent ceux obtenus par Babana (2003) ; Ponmurugan et Gopi (2006) ; Chen et *al.* (2006), rapportent qu'en milieu liquide, la croissance des isolats est toujours accompagnée d'une baisse de pH du milieu de culture. De plus, une corrélation positive significative a été observée entre la production d'acide et la quantité de P solubilisé dans le milieu (Babana, 2003 ; Rashid et *al.*, 2004 ; Pradhan et Sukla, 2005; Ivanova et *al.*, 2006).

En milieu liquide, la corrélation entre le pH et la quantité de P solubilisé avait déjà été rapportée par Kucey et *al.*, (1983).

Des résultats similaires ont été obtenus par Hafeez et *al.* (2006), qui observent une diminution du pH du milieu liquide de 7 à 4,8 due à une activité des BSP. De même, Trivedi et *al.*, 2003 ; Rashid et *al.*, 2004 ; Fankem et *al.*, 2006 ; Ivanova et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009, rapportent que l'activité solubilisatrice des bactéries entraîne une baisse du pH du milieu liquide indiquant la production d'acides organiques.

*In vitro*, la solubilisation du phosphore dans le milieu liquide est causée par l'acidification du milieu nutritif et la production de différents types d'anions carboxyliques (Xie, 2008). Le pH est fortement diminué dans le milieu de culture par la production de phosphatases et d'acides carboxyliques tel que l'oxalate, le tartrate, le succinate, et le gluconate (Fankem et *al.*, 2006 ; Khan et *al.*, 2009).

## III. Effet des isolats sur les paramètres de croissance

L'évaluation de l'effet des isolats sur la croissance et le rendement des plantes a porté sur les caractères suivants : le nombres de feuilles, la hauteur de la tige principale, le nombre de rameaux

primaires, le nombre de fleurs, la surface foliaire, le nombre de nodules, l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A), le poids frais et le poids sec de la partie aérienne et racinaire, le nombre moyen de gousses par plante, le nombre moyen de graines par gousse, le nombre moyen de graines par plante, le poids de cents graines, et le rendement en grains.

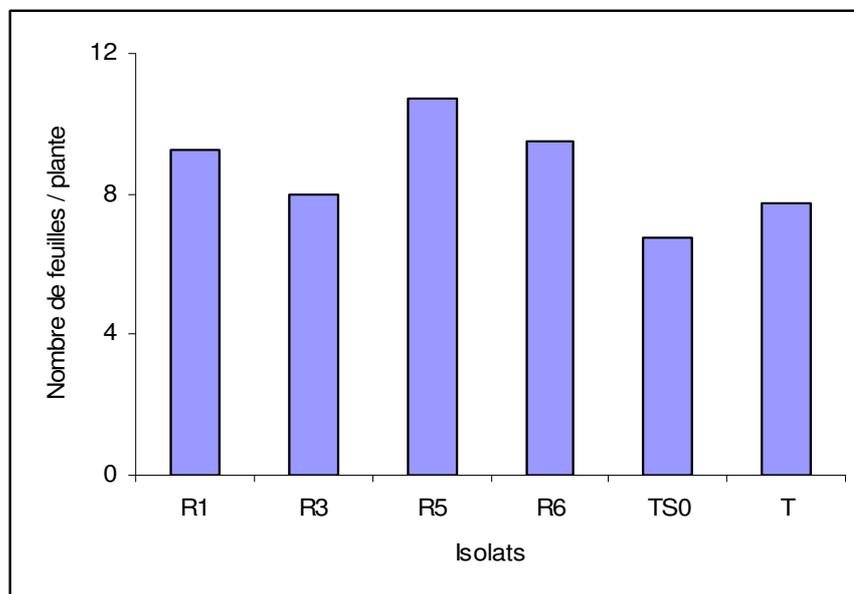
La durée du cycle de développement de vigna a été de 135 jours :

- ◆ Le stade végétatif s'est étalé sur une période de 62 jours.
- ◆ Le stade floraison a duré 45 jours.
- ◆ Le stade gousse s'est échelonné sur une période de 28 jours.

### III.1. Effet des isolats sur le nombre de feuilles au stade végétatif

Le nombre le plus élevé est obtenu chez les plantes inoculées avec l'isolat R5 (figure 3), soit une augmentation de 59,25% par rapport au témoin non inoculé, et une augmentation de 38,70% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

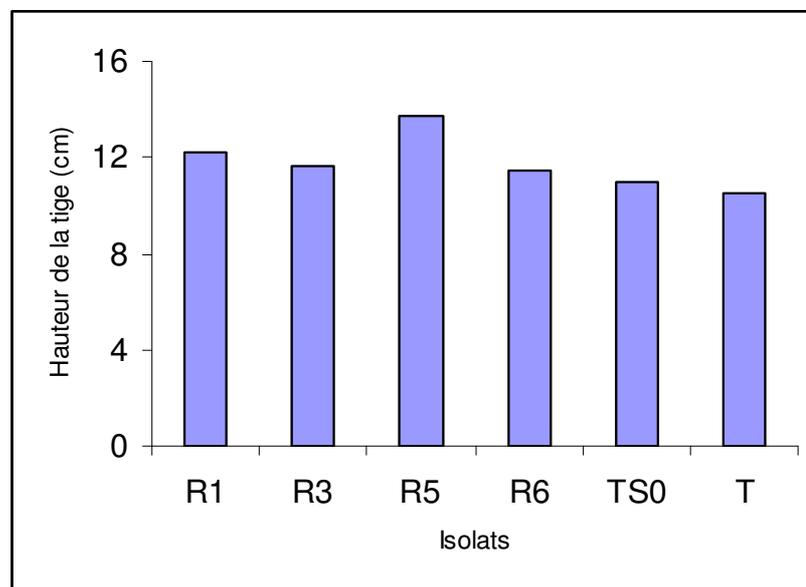


**Figure 5 :** Effet des isolats sur le nombre de feuilles au stade végétatif

### III.2. Effet des isolats sur le nombre de feuilles au stade floraison

Les plantes inoculées avec les isolats R1 et R5 ont donné le nombre le plus élevé de feuilles (figure 4), soit une augmentation de 17,94 % par rapport au témoin non inoculé et de 53,33% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

Cependant l'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les différents traitements (annexe II).



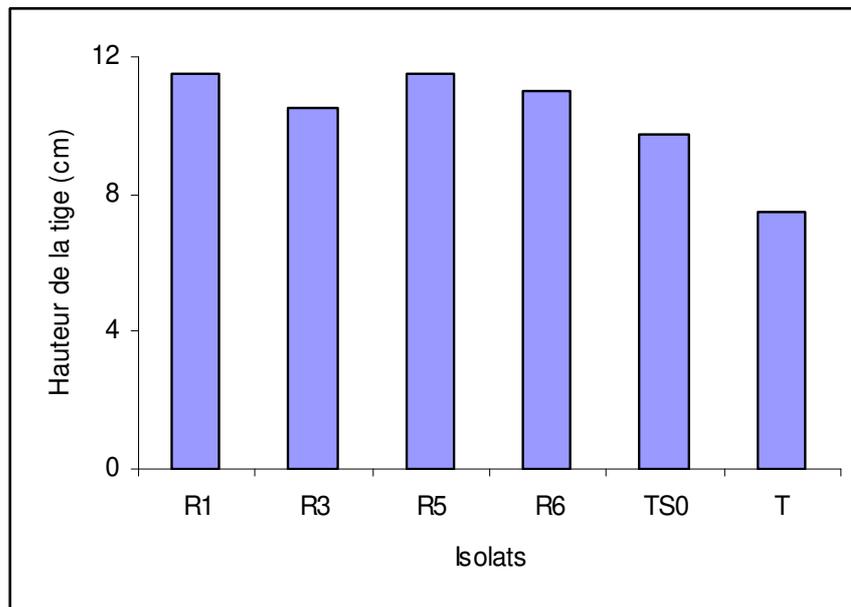
**Figure 6 :** Effet des isolats sur le nombre de feuille au stade floraison

### III. 3. Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade végétatif

La hauteur la plus élevée est obtenue chez les plantes inoculées avec l'isolat R5 (figure 5), soit une augmentation respectivement de 34,33 % et de 30,07 % par rapport aux témoins TS0 et T.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les différents traitements (annexe II).

Nos résultats ne rejoignent pas ceux obtenus par Babana et Antoun (2006), qui ont révélé une augmentation significative de la croissance en hauteur des plantes inoculées avec les BSP par rapport au témoin non inoculé.



**Figure 7 :** Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade végétatif

#### **III.4. Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade floraison**

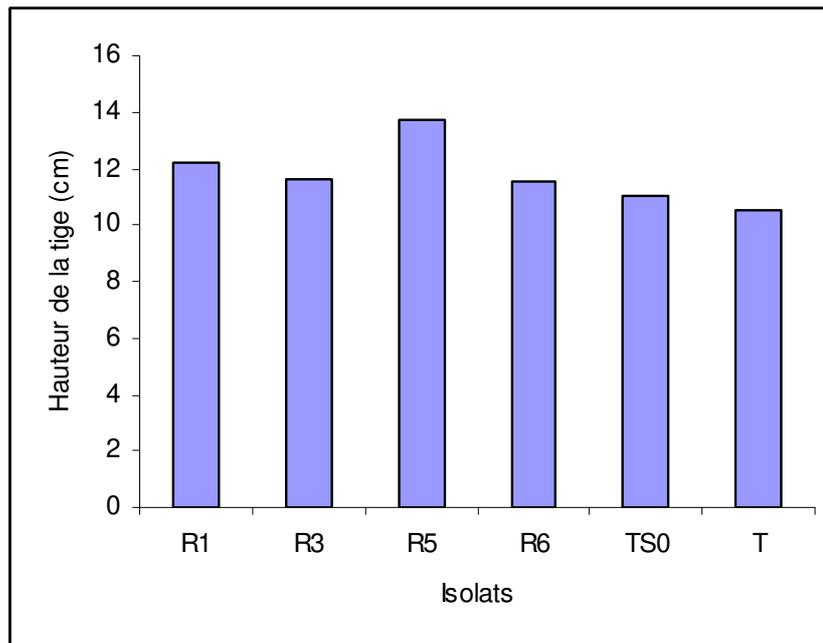
Une augmentation de la hauteur de la tige principale est observée chez toutes les plantes inoculées (figure 6) ; la hauteur la plus élevée est obtenue avec l'isolat R5, soit une augmentation de 25% par rapport au témoin non inoculé et de 30,95% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

Des résultats similaires obtenus par Afzal et Bano, (2009), qui ont révélé une amélioration de la hauteur des plantes inoculées par des rhizobiums comparativement aux plantes non inoculées.

Martinez (2003), a trouvé que l'inoculation par les BSP a permis d'augmenter la hauteur des plantes en comparaison avec le traitement non inoculé. Il a montré que les BSP isolés de la rhizosphère sont des générateurs excellents de vitamines B12, et les auxines produites par ces bactéries peuvent jouer un rôle dans l'expansion des tiges.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Han et Lee (2005), qui ont démontré que l'application de la roche phosphatée sans inoculum n'a pas amélioré significativement la hauteur des plantes.

Cependant l'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les différents traitements (annexe II). De même, nos résultats corroborent ceux obtenus par Hachemi et Kemoum (1997), mettant en évidence un effet non significatif de l'inoculation sur la hauteur des plants de pois.

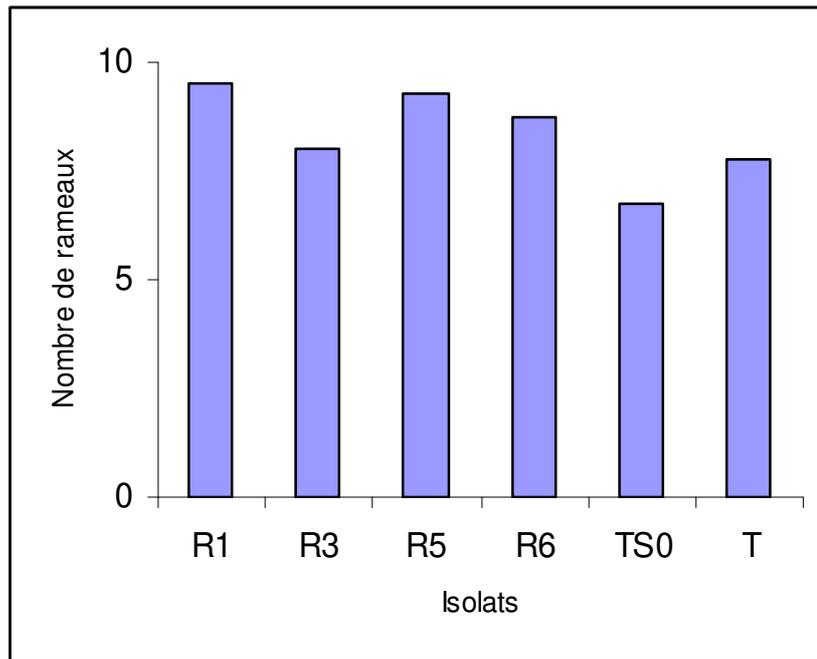


**Figure 8 :** Effet des isolats sur la hauteur de la tige principale au stade floraison

### **III.5. Effet des isolats sur le nombre de rameaux primaires au stade floraison**

Toutes les plantes inoculées ont donné un nombre de rameaux primaires supérieur aux témoins (figure 7) ; le nombre le plus élevé est obtenu avec l'isolat R1, soit une augmentation de 40,74% par rapport au témoin non inoculé et de 22,58% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II). En revanche, des résultats similaires sont obtenus par Meftah (2006), sur une culture de l'arachide ; il rapporte que l'inoculation a induit une augmentation du nombre de rameaux par rapport aux plantes témoins.

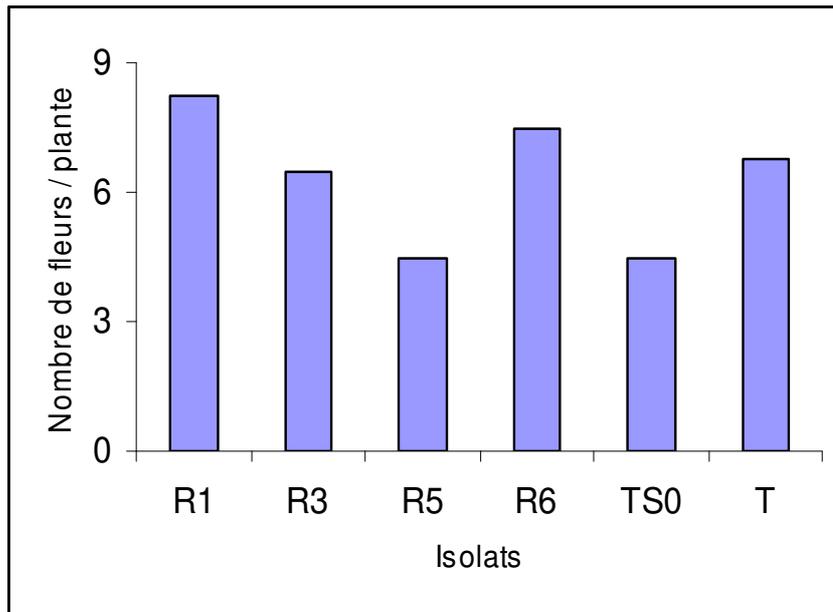


**Figure 9 :** Effet des isolats sur le nombre de rameaux primaires au stade floraison

### III.6. Effet des isolats sur le nombre de fleurs

Les plantes inoculées avec l'isolat R1 ont donné le nombre le plus élevé de fleurs (figure 8), soit une augmentation respectivement de 83,33% et 22,22% par rapport aux témoins TS0 et T.

Les plantes inoculées avec l'isolat R5 ont donné le même nombre de fleurs que le témoin non inoculé. De ce fait, nos résultats rejoignent ceux obtenus par Meftah (2006), qui rapporte que les plantes inoculées et les plantes témoins ont le même nombre de fleurs. L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

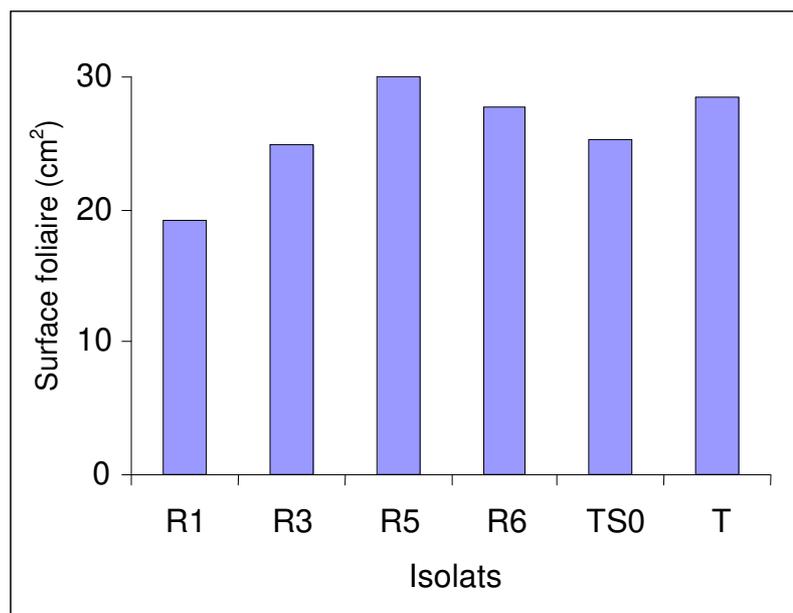


**Figure 10** : Effet des isolats sur le nombre de fleurs

### III.7. Effet des isolats sur la surface foliaire

Les plantes inoculées avec l'isolat R5 ont donné la surface foliaire la plus élevée (figure 9), soit une augmentation de 18,48% par apport au témoin non inoculé et de 5,16% par apport au témoin non inoculé et sans phosphore. Les isolats R1 et R3 ont un effet négatif par rapport aux deux témoins. L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux de Supanjani et *al.* (2006), qui rapportent que la combinaison de la roche phosphatée et les bactéries solubilisant les phosphates augmente significativement la surface foliaire par apport au témoin non inoculé.

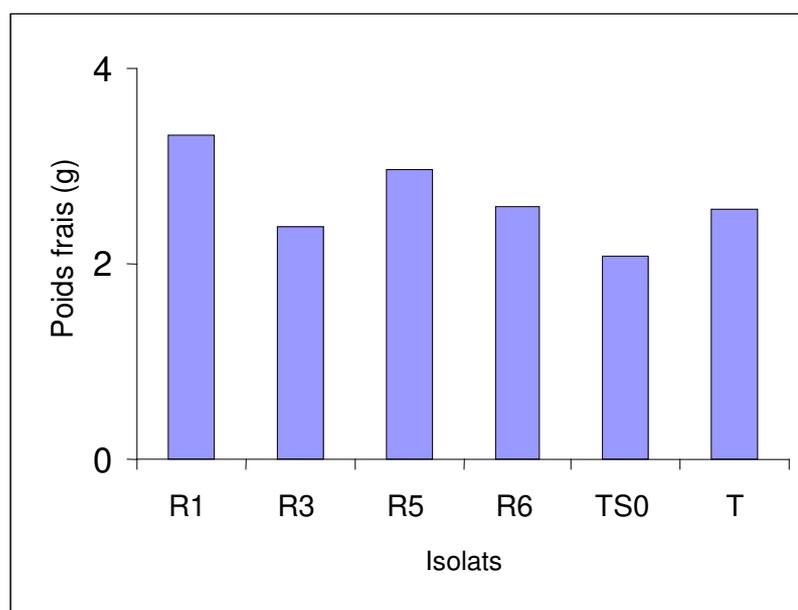


**Figure 11** : Effet des isolats sur la surface foliaire

### III.8. Effet des isolats sur le poids frais de la partie racinaire

Le poids frais des racines le plus élevé est obtenu chez les plantes inoculées avec l'isolat R1 (figure 10), soit une augmentation de 42,78% et par rapport au témoin non inoculé et de 29,68% par rapport au témoin T.

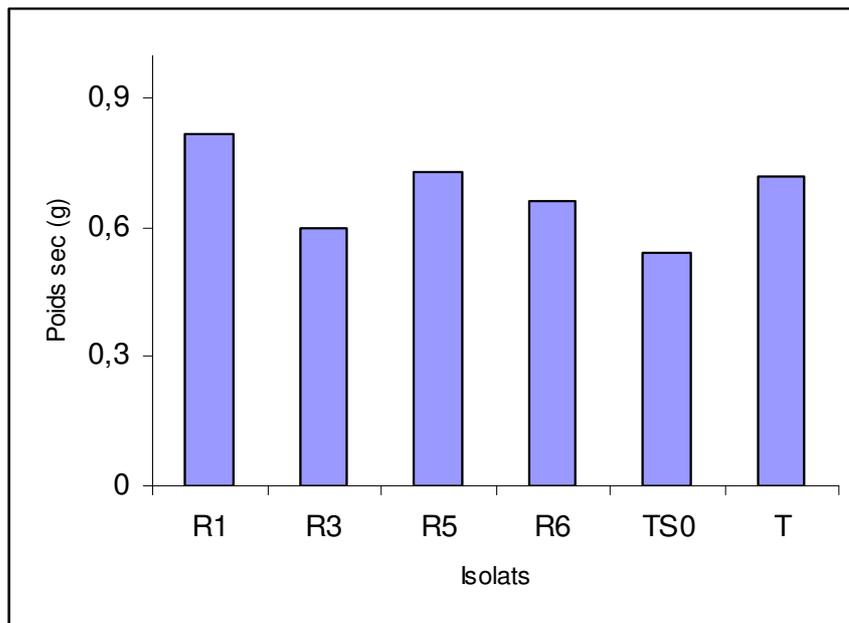
L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).



**Figure 12** : Effet des isolats sur le poids frais de la partie racinaire

### III.9. Effet des isolats sur le poids sec de la partie racinaire

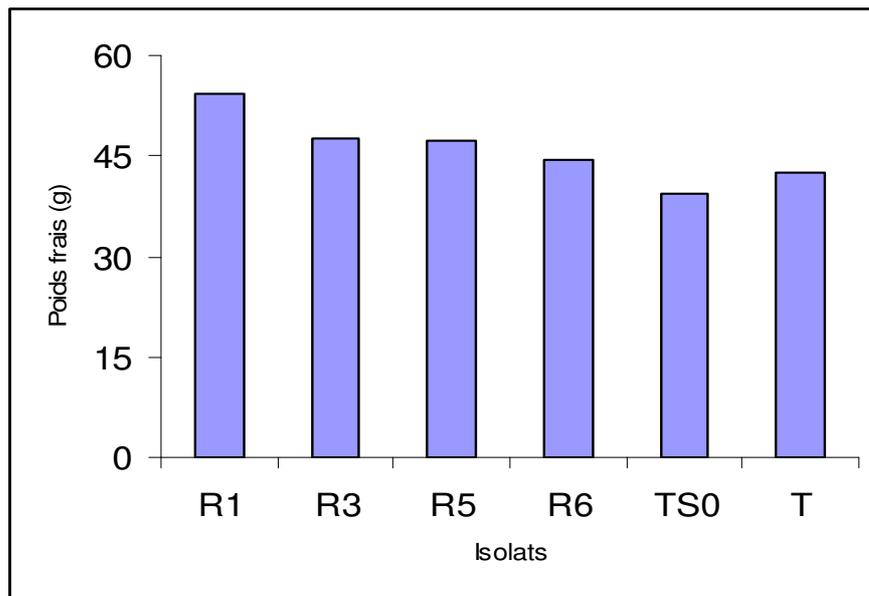
Les plantes inoculées ont donné un poids sec supérieur à celui du témoin non inoculé (figure 11) ; le poids le plus élevé est obtenu avec l'isolat R1, soit une augmentation respectivement de 51,85% et 13,88% par rapport aux témoins TS0 et T. Cependant l'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).



**Figure 13:** Effet des isolats sur le poids sec de la partie racinaire

### III.10. Effet des isolats sur le poids frais de la partie aérienne

Une augmentation du poids frais est obtenue pour l'ensemble des traitements (figure 12) ; le poids le plus élevé est obtenu avec l'isolat R1, soit une augmentation respectivement de 38,61% et 27,68% par rapport aux témoins TS0 et T. L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).



**Figure 14 :** Effet des isolats sur le poids frais de la partie aérienne

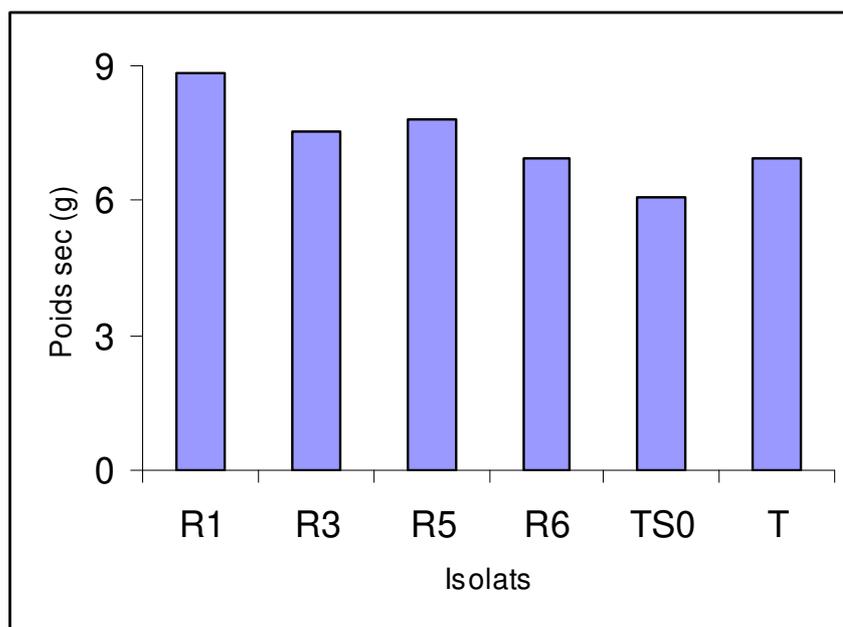
### III.11. Effet des isolats sur le poids sec de la partie aérienne

Une augmentation du poids sec de la partie aérienne par plant est observée chez les plantes inoculées (figure 13) ; le poids frais le plus élevé est obtenu par l'isolat R1, soit une augmentation de 46,11% et de 27,01% respectivement par rapport aux témoins TS0 et T.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Patel et Thakur (1997) ; Maatallah (2002), sur l'arachide, ils rapportent que l'inoculation permet l'obtention d'un rendement en matière sèche aérienne et racinaire supérieur au témoin. Sur le pois chiche, Akhtar et Siddiqui (2009), ont montré une augmentation du poids sec de la partie aérienne sous l'effet de l'inoculation avec les rhizobiums. Des résultats similaires ont été obtenus par Han et Lee, (2005) ; Supanjani *et al.* (2006), qui ont montré que la combinaison de la roche phosphatée et l'inoculation par les BSP augmente le poids sec de la partie aérienne.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Ramachandran *et al.* (2003), qui constatent que l'inoculation avec les BSP et le traitement avec la roche phosphatée augmente la croissance de la partie aérienne.



**Figure 15 :** Effet des isolats sur le poids sec de la partie aérienne

#### **IV. Réponse à l'inoculation**

##### **IV.1. Effet des isolats sur le nombre de nodules**

L'inoculation a un effet favorable sur la nodulation. Le nombre moyen de nodules formés sur le système racinaire varie suivant les isolats considérés (figure 14) ; il est de 7,75 nodules/plant pour l'isolat R1 qui s'est révélé le plus infectif, et de 1,5 nodules/plant pour les isolats R3 et R6, qui se sont révélés les moins infectifs.

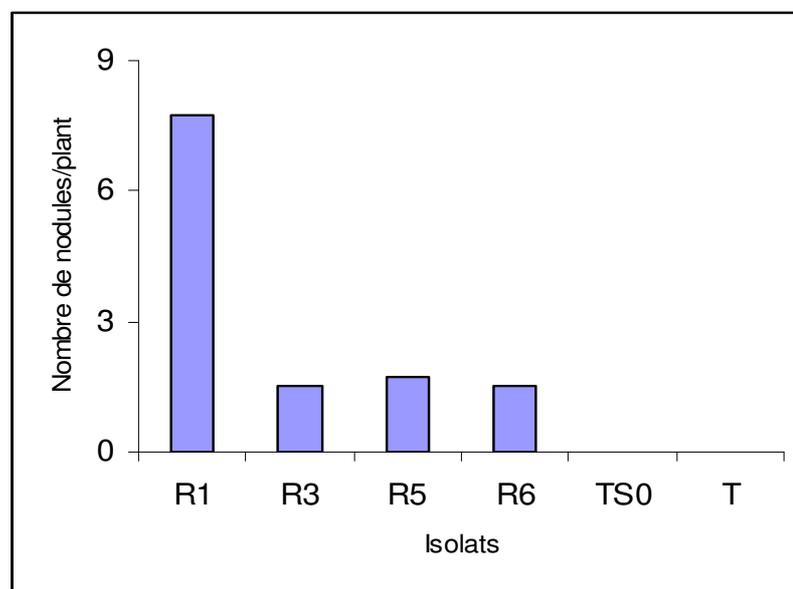
Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Wasule et *al.* (2003) sur le soja, qui rapportent que le nombre de nodules augmente significativement au niveau du système racinaire des plantes inoculées par les rhizobiums par rapport au témoin non inoculé. De même, Zaidi et Khan (2006) ; Akhar et Siddiqui (2009), ont constaté que le nombre de nodules chez le pois chiche a été significativement plus élevé chez les plantes inoculées par les rhizobiums en comparaison avec les plantes non inoculées.

L'analyse de la variance pour ce paramètre montre un effet significatif entre les traitements (annexe II), leur classement selon le test de Newman et Keuls de 5%, les réparties en deux groupes homogènes (annexe II).

- Groupe A : regroupe les plantes qui représentent le nombre de nodules le plus élevé.
- Groupe B : contient les plantes qui présentent le nombre de nodules le plus faible.

Pour expliquer le faible taux de nodulation, nous émettons quelques hypothèses :

- Qu'il y'aurait une incompatibilité entre les isolats et la plante hôte (Andriankaja, 2004)
- Les bactéries n'arrivaient pas à coloniser efficacement la rhizosphère du niébé ; ce manque d'efficacité peut s'expliquer par le fait que la bactérie utilisée comme inoculum n'arrive pas bien à se multiplier soit par ce qu'elle a une faible capacité de survie et de se disséminer dans la rhizosphère, soit à cause du manque d'éléments nutritifs ou de la présence dans la rhizosphère de substances défavorisant sa croissance (Babana, 2003).
- l'inhibition des isolats dans le sol par des substances chimiques tel que les traitements utilisés durant cet essai par l'insecticide Pychlorex et occidior, pourrait avoir un effet létal ou limitatif sur nos isolats.
- on a compté en moyenne 1 nodule par plant, ce ci peut être expliqué par la minéralisation de la matière organique, puisque le rapport C/N indique une minéralisation rapide, connue par son action inhibitrice sur la nodulation en perturbant l'infection des poils absorbants ou l'initiation du nodule (Ndiane, 1986).
- Durant la solubilisation des phosphates naturels, des niveaux de quelques métaux lourds (Cd, Ni, Pb, Zn, Cu) peuvent affecter la croissance, la physiologie et le métabolisme des microorganismes solubilisant les phosphates (Souchie et *al.*, 2006).



**Figure 16 :** Effet des isolats sur le nombre de nodules par plante

## **IV.2. Effet des isolats sur la fixation symbiotique de l'azote**

Une activité réductrice d'acétylène (ARA) de 32,5  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plant}$  est enregistrée chez les plantes inoculées avec l'isolat R1. Ce taux est faible par rapport à ceux obtenus par Lazali (2009) sur l'arachide inoculé.

De même Tejera *et al.*, (2005), ont enregistré une A.R.A de 110  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plant}$  chez le haricot. En effet, les quantités d'azote fixées par l'association symbiotique légumineuses- rhizobium sont très dépendantes des conditions du milieu (Siddiki 1999 ; Schvartz *et al.*, 2005).

L'A.R.A dépend essentiellement du nombre de nodules (Zaoui 1989). *In vitro*, les isolats authentifiés sur le pois chiche avec un taux de nodulation de 1 à 7 nodules/plant se sont révélés moins effectifs, par rapport à ceux dont le taux est de 10 à 20 nodules/plant (Bacha *et al.*, 2005).

Chez vigna, la fixation de l'azote est dépendante de l'aptitude de la plante à développer des nodules efficaces (Drevon ,1994). L'efficacité de la symbiose dépend à la fois des nodosités, de leur poids (Zaoui , 1989), et le fonctionnement optimum de la nitrogénase (Zaoui ,1989 ; Ounane *et al.*, 2005).

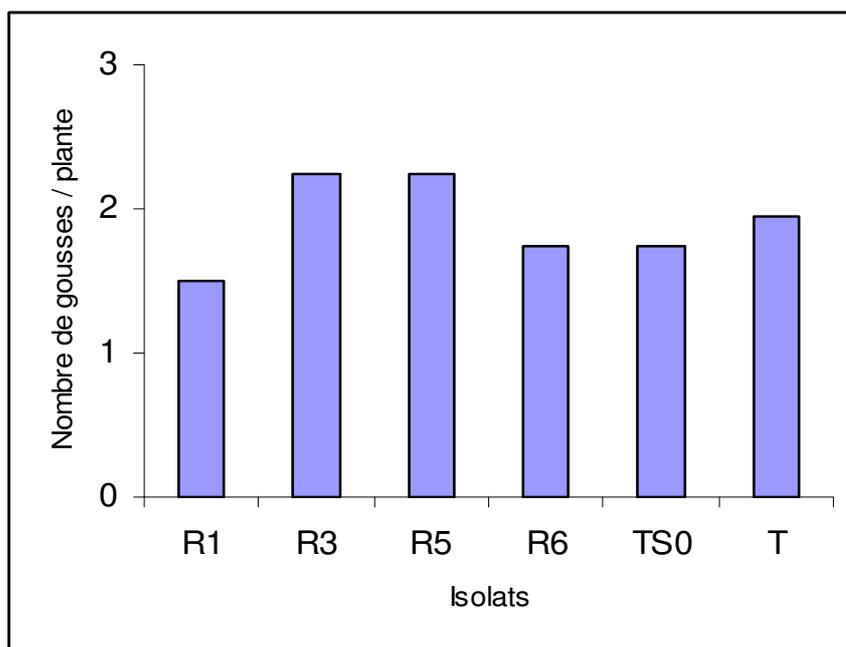
Le faible taux de l'A.R.A pourrait trouver une explication dans la nodulation qui est faible, et dans la minéralisation de la matière organique qui serait à l'origine d'une libération importante de l'azote minéral inhibiteur de l'activité fixatrice de l'azote.

## **V. Effet des isolats sur le rendement et ses composantes**

### **V.1. Effet des isolats sur le nombre moyen de gousses par plante**

Le nombre de gousses/plant le plus important est celui obtenu par les plantes inoculées avec les isolats R3 et R5 (figure 15), soit une augmentation respectivement de 28,57% et 15,38% par rapport au témoin non inoculé.

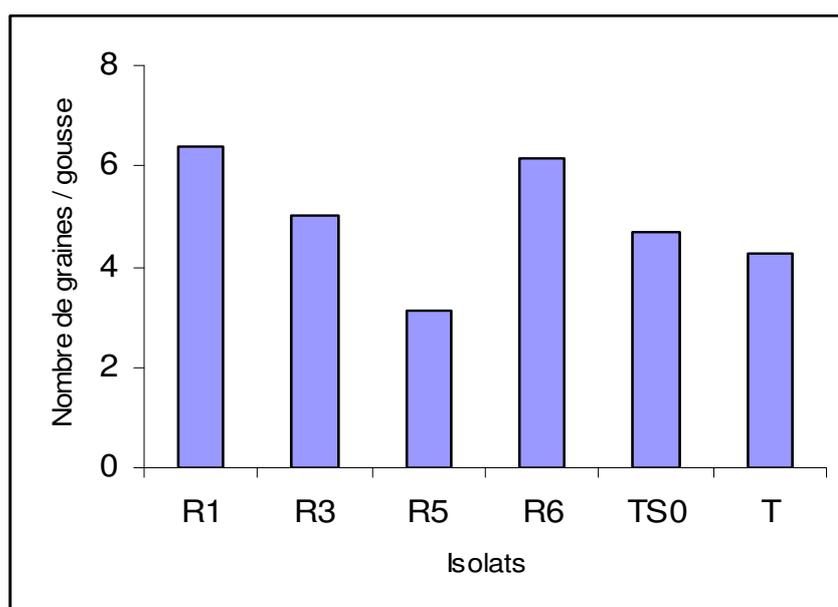
L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).



**Figure 17 :** Effet des isolats sur le nombre moyen de gousses par plante

## V.2. Effet des isolats sur le nombre moyen de graines par gousse

Les plantes inoculées avec l'isolat R1 ont donné le plus grand nombre de graines par plant (figure 16), soit une augmentation respectivement de 35,53% et 49,88% par rapport aux deux témoins TS0, T. Cependant l'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

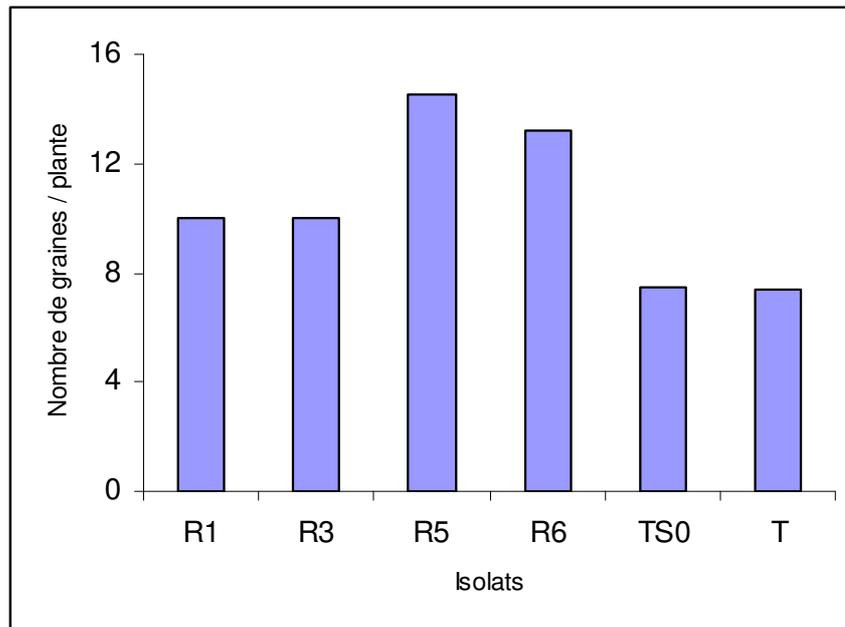


**Figure 18 :** Effet des isolats sur le nombre moyen de graines par gousse

### V.3. Effet des isolats sur le nombre moyen de graines par plante

Toutes les plantes inoculées ont donné un nombre moyen de graines supérieur à celui du témoin non inoculé (figure 17) ; le nombre de graines le plus élevé est obtenu avec l'isolat R5, soit une augmentation de 93,33% par rapport au témoin non inoculé et de 96,47% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

Cependant l'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).



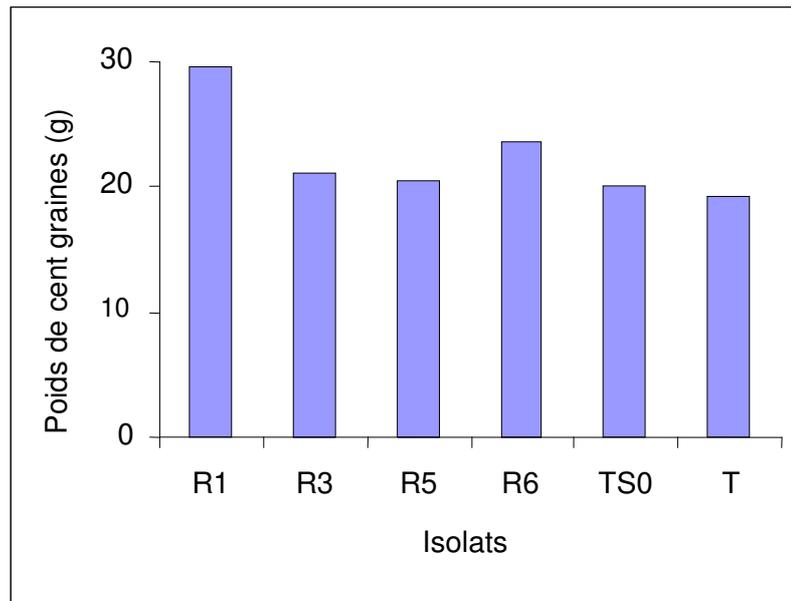
**Figure 19 :** Effet des isolats sur le nombre moyen de graines par plante

### V.4. Effet des isolats sur le poids de cent graines

L'inoculation se traduit par une augmentation du poids de cent graines chez toutes les plantes inoculées (figure 18) ; la valeur la plus élevée est obtenue chez les plantes inoculées avec l'isolat R1, soit une augmentation de 47,57% par rapport au témoin non inoculé et de 53,79% par rapport au témoin non inoculé et sans phosphore.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Akhtar et Siddiqui (2009), sur une culture de pois chiche. Ils constatent que l'inoculation avec les rhizobiums entraîne une augmentation du poids de cent graines par rapport au témoin.



**Figure 20 :** Effet des isolats sur le poids de cent graines

#### V.5. Effet des isolats sur le rendement en grains

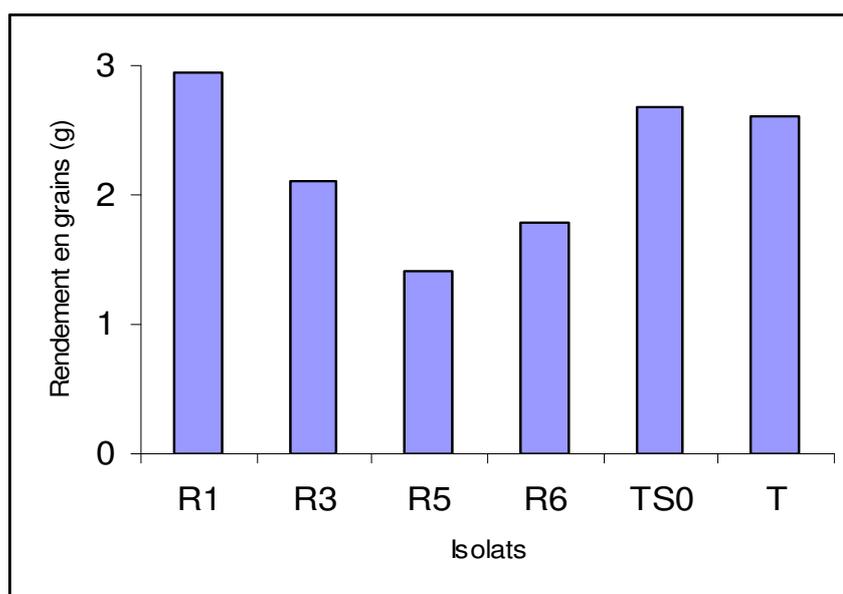
Une augmentation du poids moyen de grains par plant est observée seulement chez les plantes inoculées avec l'isolat R1 (figure 19), soit une augmentation respectivement de 10,48% et 13,46% par rapport aux témoins TS0 et T. Le reste des isolats a donné des valeurs plus faibles par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Babana et Antoun (2006), qui ont indiqué que la combinaison des rhizobiums est la meilleure pour le rendement en grains de blé dans le traitement fertilisé par la roche phosphatée en comparaison avec le témoin non inoculé. De même Akhtar et Siddiqui (2009), sur le pois chiche, révèlent une augmentation du rendement en grains dans un traitement inoculé avec les rhizobiums en comparaison avec le témoin non inoculé.

Han et Lee (2005), ont montré que l'inoculation par des bactéries solubilisant les phosphates avec une application directe de la roche phosphatée dans le sol, augmente le rendement des cultures. Par contre Supanjani et al. (2006), constatent que la roche phosphatée est moins disponible pour les plantes, et son utilisation comme fertilisant n'augmente pas souvent le rendement.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Babana et Antoun (2006), qui rapportent que le rendement n'est pas différent dans le témoin non fertilisé et le témoin fertilisé par la roche phosphatée.



**Figure 21** : Effet des isolats sur le rendement en grains

## **VI. Effet des isolats sur la teneur en éléments minéraux**

### **VI.1. Teneur du sol en phosphore assimilable**

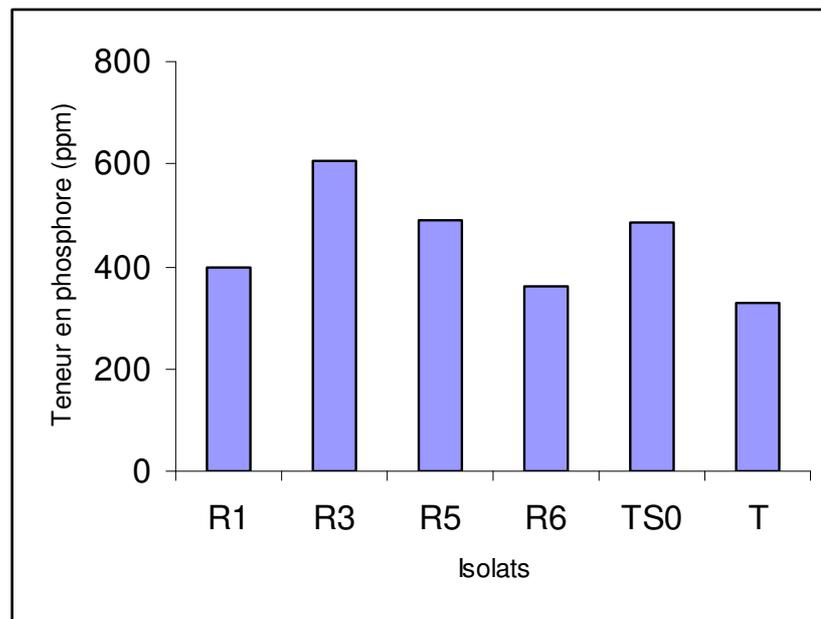
La teneur en phosphore la plus élevée est obtenue chez les plantes inoculées avec l'isolat R3 (figure 20), soit une augmentation respectivement de 25% et de 84,76% par rapport aux témoins TS0 et T. Une légère augmentation est enregistrée chez les plantes inoculées avec l'isolat R5 par rapport au témoin non inoculé. Le reste des isolats a un effet négatif par rapport au témoin non inoculé et un effet positif par rapport au témoin T.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

L'augmentation de la teneur du sol en phosphore assimilable chez les plantes traitées avec les isolats R3 et R5 peut être due à la solubilisation de la roche phosphatée. Des résultats similaires ont été obtenus par Ramachandran et *al.* (2003), qui rapportent que le phosphore disponible dans le sol est attribué à la combinaison des BSP et la roche phosphatée. Selon Chen et *al.* (2006) ; Marschner (2008) ; Khan et *al.* (2009), les microorganismes solubilisant les phosphates ont la capacité de solubiliser les formes inorganiques insolubles du phosphore total du sol, rendant cet élément disponible pour les plantes.

D'après la figure 20, le témoin non inoculé, renferme des teneurs supérieures à celles des plantes inoculées avec les isolats R1 et R6 ; ceci peut être due à la solubilisation de la roche phosphatée par des acides organiques produits par les racines des plantes et/ou la minéralisation du phosphore organiques par la production des phosphatases (Khan et *al.*, 2009).

Les légumineuses excrètent des acides organiques et des protons entraînant de ce fait une acidification de la rhizosphère (Sas et *al.*, 2001 ; Mengel et Kirkby, 2001) . En utilisant l' $N_2$  au lieu  $NO_3^-$ , les légumineuses peuvent acidifier davantage leur rhizosphère, entraînant ainsi une dissolution accrue du phosphate naturel et par conséquent une augmentation de la biodisponibilité du phosphore (Behi, 2003).



**Figure 22 :** Effet de l'inoculation des isolats sur la teneur du sol en phosphore assimilable

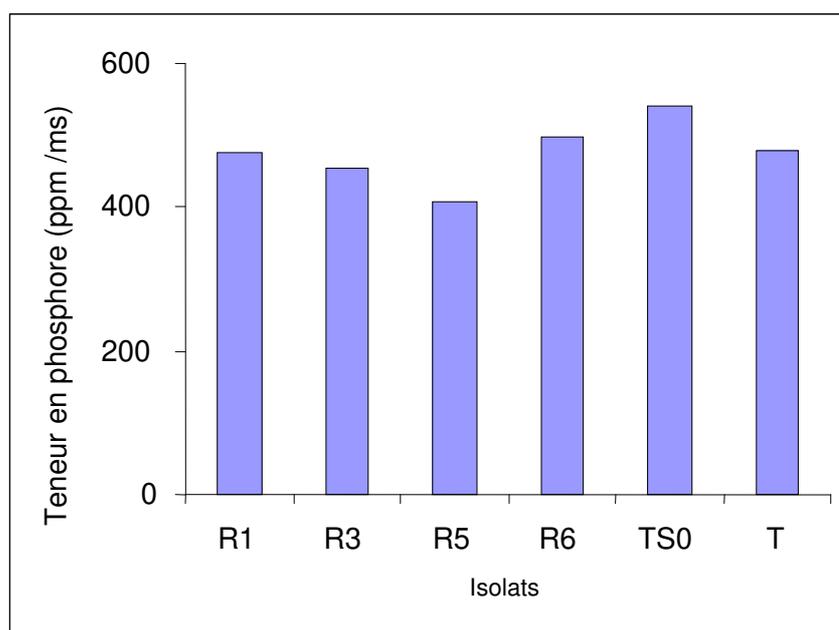
## VI.2. Effet des isolats sur la teneur des feuilles en phosphore total

Les plantes inoculées avec l'isolat R6 ont donné une teneur en phosphore la plus élevée (figure 21), soit une augmentation de 4,18% Par rapport au témoin (T). L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Zaidi et Khan (2006), qui rapportent que l'inoculation avec les microorganismes solubilisant les phosphates n'a pas produit d'effet significatif sur le contenu des feuilles en phosphore total. Valverde et *al.* (2003), ont également signalé l'absence de différence significative entre les plantes de l'haricot inoculées avec les BSP et les plantes non inoculées.

Nos résultats ne corroborent pas ceux obtenus par Ramachandran et *al.* (2003), qui rapportent que les prélèvements de phosphore par les plantes ont été significativement plus élevés avec la combinaison des BSP et la roche phosphatée que le témoin non inoculé et le traitement avec la roche seule. De même Han et Lee (2005), ont constaté que l'inoculation avec les BSP dans des sols fertilisés par la roche phosphatée a augmenté significativement la teneur en phosphore dans les

feuilles et les racines par rapport aux plantes non inoculées. Par contre nos résultats s'accordent avec ceux obtenus par Martinez (2003), qui a observé que le niveau d'absorption du phosphore par les plantes non inoculées été plus élevé que celui des traitements inoculés avec les BSP; ceci est du probablement au processus d'immobilisation par les bactéries inoculées. Selon Marchner (2008), les prélèvements du phosphore par la biomasse microbienne peuvent réduire la disponibilité du phosphore pour les plantes ; et d'après Dommergues et Mangenot (1970), les microorganismes peuvent concurrencer les plantes, en utilisant pour leurs besoins des ions phosphoriques disponibles. En comparant les deux témoins, nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Babana et Antoun (2006), qui constatent que la concentration du phosphore n'est pas différente dans le témoin non fertilisé et le témoin fertilisé par la roche phosphatée ; et d'après Supanjani et *al.* (2006), la roche phosphatée est moins disponible pour les plantes car ses minéraux sont libérés graduellement. La concentration en phosphore dans les plantes représente 500 à 5000 ppm (Gahoonia, 2004) ; et d'après les résultats, on remarque que les teneurs sont faibles après la maturité. Selon Gervy (1979), les teneurs en P sont élevées pendant la croissance végétative, et faible en fin de végétation puisque le phosphore migre vers les organes de réserves.



**Figure 23 :** Effet des isolats sur la teneur des feuilles en phosphore total

### VI.3. Effet des isolats sur la teneur des feuilles en azote total

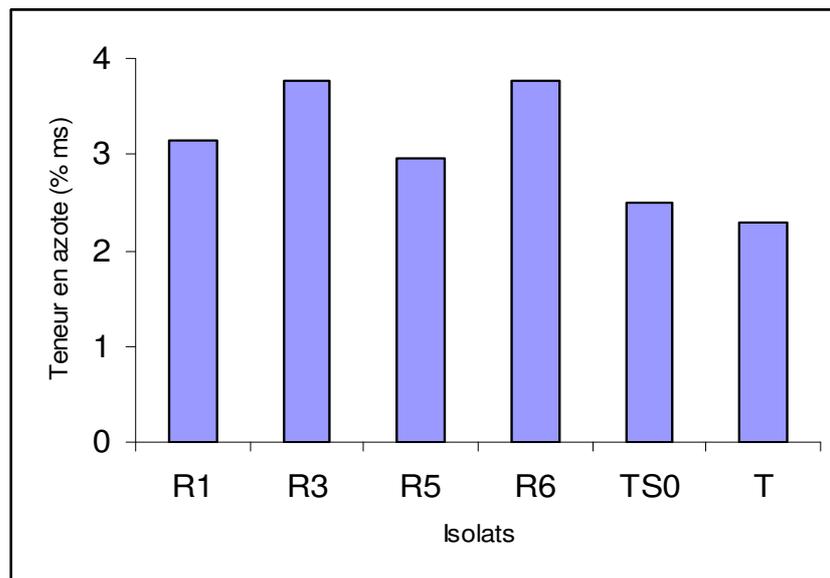
La teneur en azote la plus élevée est obtenue chez les plantes inoculées avec les isolats R3 et R6 (figure 22), soit une augmentation respectivement de 50,45% et 63,47% par rapport aux témoins TS0 et T.

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif entre les traitements (annexe II).

D'après Soltner (1986), la teneur en azote des plantes représente 1 à 3 % de la matière sèche.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Han et Lee (2005), qui rapportent que l'inoculation avec des BSP et la fertilisation par la roche phosphatée augmentent le contenu en azote dans les feuilles et les racines en comparaison avec le témoin.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Supanjani *et al.* (2006), qui rapportent que la disponibilité du P dans les sols est importante pour les prélèvements de l'azote par la plante et par conséquent, il est aussi possible que la disponibilité du P due à la solubilisation par les BSP a entraîné l'augmentation de l'absorption de l'azote par les plantes.



**Figure 24 :** Effet des isolats sur la teneur des feuilles en azote total

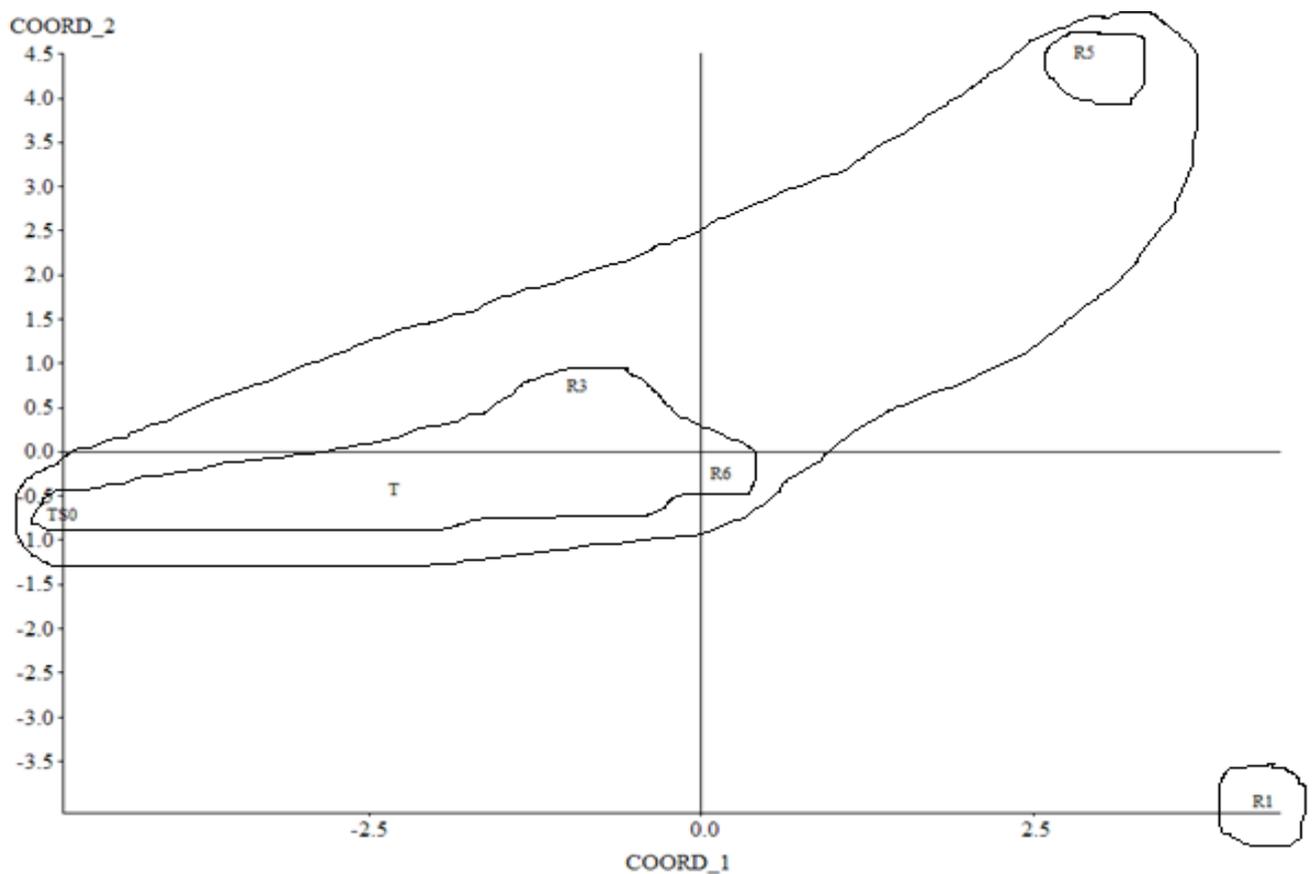
## VII. Regroupement des isolats rhizobiens

L'analyse en composantes principales a été réalisée sur l'ensemble des caractères morphologiques et agronomiques étudiés. En effet, la première composante principale explique 46,33% de la diversité totale, elle est corrélée positivement avec NF, HT, NR, SF, NG/P, TPs comme elle est corrélée négativement avec NF, PF, PS, NN, NGr/G, PCG, RDT, TPf, TNf.

La deuxième composante explique 31,05% de la variance ; elle est corrélée positivement avec NFL, PF, PS, NN, NGr/G, PCG, comme elle est corrélée négativement avec RDT, TPF, TNF.

Le plan 1 et 2 apporte 77,38% de l'information. La dispersion des individus dans le plan défini par les deux composantes principales a révélé une hétérogénéité entre les isolats rhizobiens étudiés.

Ainsi, l'isolat R1 constitue un groupe représenté par une bonne croissance végétative, bonne réponse à l'inoculation et un bon rendement. Par contre, les isolats rhizobiens R3, R5, R6 et les deux témoins (TS0, T) constitue un groupe représenté par les faibles caractéristiques.

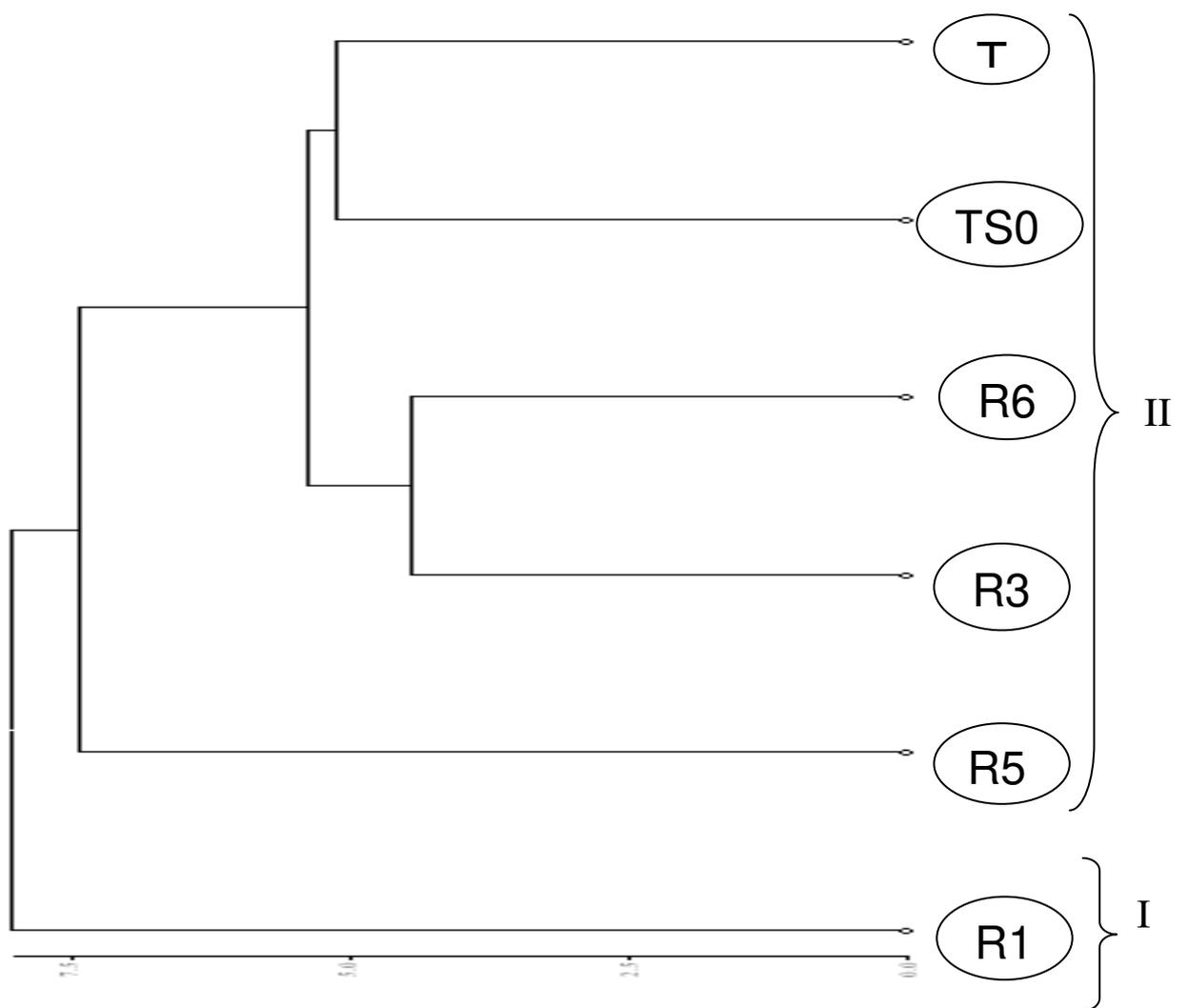


**Figure 25:** Représentation des couples symbiotiques en deux dimensions

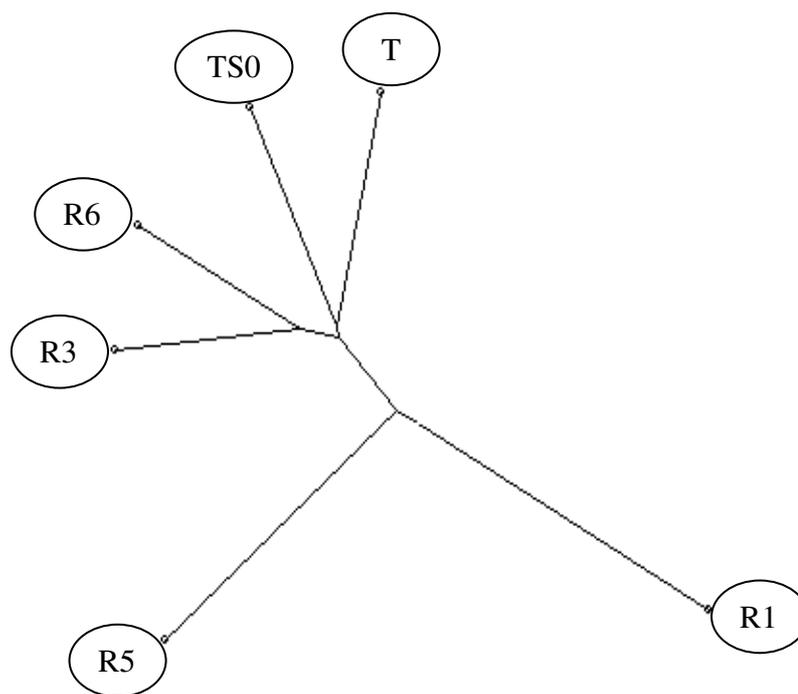
L'ACP complétée par la classification ascendante hiérarchique permet de classer les six couples symbiotiques étudiés en deux groupes distincts I et II, et cela à une distance Euclidienne de similitude de 1,6.

Le premier groupe I contient un seul isolat rhizobien R1.

Le deuxième groupe II rassemble les isolats R3, R5, R6 et les deux témoins. Ce groupe se subdivise rapidement à une distance de similitude de 1,2 pour détacher l'isolat rhizobien R5 constituant un sous groupe à part.



**Figure 26 :** Dendrogramme des couples symbiotiques en fonction des différents caractères étudiés



**Figure 27 :** Arbre de répartition des couples symbiotiques en fonction des caractères étudiés

# CONCLUSION

Ce travail a permis d'étudier la capacité des rhizobiums à solubiliser les phosphates tricalciques *in vitro*, puis évaluer leurs effets sur la croissance, les propriétés symbiotiques, les composantes de rendement, la production, et le contenu en éléments minéraux du niébé.

*In vitro*, les isolats R3 et R6 ont révélé une activité solubilisatrice par la formation d'une zone claire autour de leurs colonies, indiquant la dissolution du phosphate tricalcique dans le milieu solide. Cette caractéristique est intéressante dans le choix de l'inoculum utilisé au champ.

En milieu liquide, les mêmes isolats R3 et R6 ont entraîné une diminution plus marquée du pH, indiquant la production d'acides organiques ou de protons ( $H^+$ ) dans le milieu.

Les isolats R1 et R5 n'ont pas pu montrer la zone de solubilisation dans le milieu solide.

D'après Alam et *al.* (2002), la plus part des bactéries solubilisant les phosphates perdent leur capacité à solubiliser les phosphates après des repiquages répétés. De ce fait, la conservation de la capacité de solubilisation après plusieurs repiquages devrait être le premier critère de sélection des BSP.

Sur le plan de nodulation, seul l'isolat R1 a donné une réaction positive avec un nombre moyen de nodules de 7,75 nodules/plant et une capacité de fixation de 32,5  $\mu$ moles  $C_2H_4/h/plant$ . Ces résultats laissent supposer que les plants de vigna testés répondent différemment avec les souches de rhizobium avec lesquelles ils ont des affinités différentes (Alkama, 2003). Dommergues et Mangenot, (1970), soulignent que la réceptivité de la plante hôte n'est pas constante à l'intérieur de la même espèce.

La majorité des isolats ont permis une augmentation des paramètres de croissance, des composantes de rendement, de la production du niébé, et du contenu des feuilles en azote par rapport au témoin. Toutefois l'isolat R1 se distingue par des potentialités supérieures à celles des autres.

D'après les résultats obtenus, il est fort probable, que les isolats rhizobiens utilisés dans cet essai auraient amélioré la croissance des plantes par la synthèse des substances favorisant la croissance, plutôt que leur action sur la solubilisation du phosphore.

En effet, les microorganismes qui peuvent efficacement solubiliser la roche phosphatée *in vitro* sous des conditions contrôlées peuvent être incapables de le faire en plein champ. Des variations dans l'efficacité de solubilisation peuvent être dues à la diminution de la capacité des bactéries à survivre, et à coloniser la rhizosphère. De plus les souches à fort pouvoir de solubilisation *in vitro* peuvent ne pas être efficaces dans la rhizosphère par manque de carbone ou d'autres nutriments. De ce fait sous des conditions de déficience en nutriments au niveau de la rhizosphère, le taux de croissance microbienne diminue et la solubilisation du phosphore est fortement réduite. De plus les mécanismes

impliqués dans la solubilisation sont fortement dépendants de la production de la biomasse microbienne (Alam et *al.*, 2002).

Par ailleurs, pour que la roche phosphatée soit complètement solubilisé, elle doit être colonisée par la biomasse microbienne. Le phosphore contenu dans la roche est généralement plus disponible en sol à pH à inférieur à 6,0. Seule une activité biologique élevée peut maintenir un pH de cette valeur.

Nos résultats pourraient servir de bases aux études ayant pour objectifs de réduire le problème d'insolubilisation du phosphore ; avec en perspectives les orientations suivantes:

- Sélectionner une large gamme de souches possédant des propriétés physiologiques importantes tel que : la fixation de l'azote atmosphérique, une grande potentialité de solubilisation du phosphore. Le programme peut commencer par l'isolement d'un grand nombre de souches à partir d'échantillons de sol collectés dans différentes régions du pays.
- Sélectionner des variétés compatibles avec les rhizobactéries (Spécificité plante-rhizobium).
- Tester les phosphates naturels produits localement avec une gamme variable de doses.
- La plupart des études sur la dissolution des phosphates naturels se font dans des pots avec des sols synthétiques ou du sable, ce qui ne reflète pas les conditions réelles de plein champ. De plus, des essais de solubilisation au champ devraient être conduits sur plusieurs saisons, afin de leur permettre de réagir avec le sol et de libérer le phosphore assimilable pour les cultures.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Afzal A., Bano A ., 2008.** Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). *Int.J.Agric.Biol.* 10:85-88.
- Akhtar M.S., Siddiqui Z., 2009.** Effect of phosphate solubilizing microorganisms and *Rhizobium* sp. On the growth, nodulation, yield and root-rot disease complex of chickpea under field condition. *African Journal of Biotechnology.* 8 (15): 3489-3496.
- Alam S., Khalil S., Ayub N., Rachid M., 2002.** In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganismes (PSM) from Maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology.* 4(4): 454-458.
- Alkama N., 2003.** Symbiose à rhizobia chez quelques légumineuses en Algérie : Aspects microbiologiques et physiologiques. Mémoire de Magister. INA. El Harrach. Alger. 86p.
- Alkama N., Bolou Bi Bolou E., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M., Drevon J.J., 2009.** Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* . 41(9): 1814-1823.
- Allogni W.N., Coulibaly O.N., Honlonkou A.N., 2004.** Impact des nouvelles technologies de la culture de Niébé sur le revenu et les dépenses des ménages agricoles au Bénin. *Bulletin de la recherche Agronomique du Bénin*, Numéro 44.
- Amri W., 2008.** Etude de la symbiose *Rhizobium-Arachis hypogaea L* : Aspect microbiologiques, physiologiques et agronomiques. Mémoire de Magister. INA, El Harrach, Alger. 99 p.
- Anderson D.L., Kussow W.R., Corey R.B., 1985.** Phosphate rock dissolution in soil indication from plant growth studies. *Soil Sci. Soc. Am.J.*, 49:918-925.
- Andiankaja A.H., 2001.** Mise en évidence des opportunités de développement de la riziculture par adoption du SRL, et évaluation de la fixation biologique de l'azote : cas des hautes terres. Mémoire. Ing. France, 142p.
- Antoun H., 1996.** Field and greenhouse trials performed with phosphate solubilizing bacteria and fungi. Antoun@rsvs.ulaval.ca.
- Arcand M., Schneider Kim.D., 2006.** Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 78 (4):791-807.
- Azzaoui A., El Allam M., Sefrioui N., Dafir A et Tikdirine A., 1994.** Fertilité du sol et fertilisation phosphatée au Maroc : acquis et perspectives d'avenir. Les cahiers de la recherche agronomique 42 : 21-42.

- Babana A.H., 2003.** Mise su point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du mali. Mémoire de Magister. LAVAL.QUEBEC. 138 p.
- Babana A.H., Antoun H., 2006.** Effect of Tilemsi Phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum*. L) in Mali. pp.51-58.
- Bacha F., Benhalima M., Ounane S.M., Ireki H., Mekhtoub K., Ziane D., 2005.** Evaluation et Caractérisation des souches de rhizobium nodulant le pois chiche des sols d'Algérie. In : Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. L Khelifi (ed), 5-7 Decembre 2005, INA, Alger, 218-220.
- Balandreau J et Dommergues Y., 1971.** Mesure in situ de l'activité nitrogénase. C.R. Acad. Sc. Paris. 2020-2023.
- Batino A., Lompo F., Koala S., 1998.** Research on nutrient flows and balances in west-Africa: stat-of-the-art. *Agriculture, Agrosystems and Environment*, 71:19-35.
- Ben khaled L, Morte Gomez A., Ouarraqi M., Oihabi A., 2003.** Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes-Rhizobium sous une contrainte saline. *Agronomie*, 23 :571-580
- Bergersen F.J., 1980.** Methods for evaluating biological nitrogen fixation. F.J.Bergersen ed. John Wiley and sons. New York. 702 P.
- Berraho E.B., 1984.** Etude des souches de rhizobium du pois chiche (*Cicer arietinum* L). isolées de plusieurs types de sol du Maroc. Thèse de Doctorat. Universite Mohamed V. Rabat.Maroc.106 p.
- Brhada S., Mouhsine B.S., Aurag D., 2006.** Solubilisation in vitro des Phosphates inorganiques par des bactéries isolées de nodules de Haricot.*COVAPHOS II*, pp. 87-98.
- Chaillou S., Morot-Gaury J F., Salsac L., Lesaint C., Joilivet E., 1986.** Compared effects of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  on growth and metabolism of French bean. *in Physiol. Veg.* 24 (6) : 679-687.
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arum A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C., 2006.** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34: 33-41.
- Chang H.C ., Yang S.S., 2009.** Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresource technology*, 100: 1548-1658.
- Chien S.H., Menon R.G., 1995.** Agronomic evaluation of modified phosphate rock products. *Fer.* 41 : 197-209.
- Choudhury A.T.M.A., Kennedy I.R., Ahmed M.F., Kecskes M.L., 2007.** Phosphorus Fertilization for Rice and Control of Environmental Pollution Problems. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (13): 2098-2105.

- Daoui K., 2007.** Recherche de stratégies de l'amélioration de l'efficacité d'utilisation du phosphore chez la fève (*Vicia faba* L.) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc. Thèse Doctorat. Université Catholique de Louvain. Maroc. 217 p.
- Davidian J.C., Herrmann P., 2005.** Travaux pratiques: Analyse chimique sol et végétal. INRA Montpellier : 52p.
- Delgado A., Madrid A., Andreu L., Kassem S., 2001.** Effects of organic amendments on the efficiency of applied phosphorus fertilizer. In I World Congress on Conservation Agriculture Madrid, 1-5 October, 2001. pp: 343-3347.
- Delvasto P., Valvede A., Ballester A., Munoz J.A., Gonzalez F., Blazquez M L., Igual J M., Balboa-Garcia C., 2008.** Diversity and phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy*, 92: 124-129.
- Deubel A., Gransee A., Merbach W., 2003.** Tricalcium-phosphate solubilizing efficiency of rhizosphere bacteria depending on the P-nutritional status of the host plant. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.257-260.
- Djadjaglo D., Richter C., 2008.** Efficacité de prélèvement du phosphore par les plantes Sorghum bicolor (L) Moench et Phaseolus vulgaris L. *AGROSOLUTIONS*, 19 (2).
- Dommergues Y., Magenot E., 1970.** Ecologie microbienne du sol. Masson et C<sup>ie</sup> Paris. 790 p.
- Drevon J. J., 1994.** Facteurs limitant de la fixation de l'azote atmosphérique INRA. 337p.
- Duhoux E., Nicole M., 2004.** Biologie végétale. Association et interaction chez les plantes. Ed DUNOD. Paris.164p.
- Duval J., 1993.** Ecological Agriculture Products. Agro-Bio- 310-05.
- Egamberdiyeva D., Juraeva D., Poberejskaya S., Myachina AO., Teryuhova P., Seydalieva L., Aliev A., 2003.** Improvement of wheat and cotton Growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. 26<sup>th</sup> Southern Conservation tillage Conference.
- Fankem H., Dieudonne N., Deubel A., Dieng L., Merbach W., Etoa F.X., 2006.** Occurrence and functioning of Phosphate Solubilizing Microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in cameroon. *African Journal of Biotechnology*. 5 (24): 2450-2460.
- FAO., 2001.** FAOSTAT Agricultural Data. [http:// apps. Fao. org/cgi-bin/npn-db.pl](http://apps.fao.org/cgi-bin/npn-db.pl) subset agriculture. Hamdy, M.1989. Cowpea processing project 685-0281. USAID. Dakar, Sénégal. 140 pp.
- FAO, (2005).** <http://faostat.fao.org/faostat/>.
- Gahoonia T.S., Claassen N., Albrecht J., 1992.** Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant Soil*, 140:241-248.

- Gahoonia T.S., Nielsen N.E., 2004.** Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. *Plant Soil*, 260: 47-57.
- Gervy R, (1970).** Les phosphates et l'agriculture. Ed. Dunod, Paris, 298p.
- Ghalmi N., Hanifi-Mekliche L., Baudoin J P., Ounane S.M et Benmohamed A., 2005.** Caracterisation Agro-morphologique de quelques population locales de Niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivées en Algérie. In: Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. L Khelifi (ed), 5-7 Decembre 2005, INA, El Harrach, Alger.190-192.
- Goldstein A.H., 1989.** Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *Am.J.Altern.Agric*, 1:51-57.
- Goldstein A.H., 2000.** Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical consideration for the development of a successful commercial technology. Proceeding of the 4<sup>th</sup> International fertiliser Association Technical Conference. IFA, Paris.
- Goldstein A.H., Krishnaraj P.U., 2003.** Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: What separates a phenotype from a trait? In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.pp.203-213.
- Gros A., 1979.** Guide pratique de la fertilisation. Ed. Maison rustique Paris. 381p.
- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L.J., Poole P.S., 2002.** Role of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnology*. 14:669-673.
- Hachemi W., Kemoum S., 1997.** Effets des doses d'inoculation sur la nodulation et le rendement du pois chiche (*Cicer arietinum*). Mémoire Ingénieur , INA, El harrach, Alger. 63p.
- Hafeez F.Y., Yasmin S., Ariani D., Rahman M., Zafar y., Malik K.A., 2006.** Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agron.Sustain.Dev*, 26:143-150.
- Halder A.K., Mishra A.K., Chakarbarthy P.K ., 1991.** Solubilization of inorganic phosphate by Bradyrhizobium. *Ind.J.Exp.Biol*, 29:28-31.
- Han H.S., Lee K.D., (2005).** Phosphate and Potassium solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(2):176-180.
- Hedley M.J., Steart J. W. B., Chauhan B.S., 1982.** Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci.Soc.Am.J*, 46:970-976.

- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003.** Origins of root-mediated Ph changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: *A review. Plant Soil.* 248:43-59.
- Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W., 2005.** Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root mediated physical and chemical process. *New Phytol.* 168: 293-303.
- Igual J.M., Valverde A., Cervantes E., Velazquez E., 2001.** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* , 21:561-568.
- Ivanova R., Bojinova D., Nedialkova K., 2006.** Rock Phosphate Solubilization by Soil Bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 41,3,197-302.
- Joseph S., Jisha M. S., 2009.** Buffering Reduces Phosphate Solubilizing Ability of Selected Strains of Bacteria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (1): 135-137
- Kampfer P., 2003.** Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization pp. 101-106.
- Khan M.R., Khan S.M., Mohiddin F.A., 2003.** Effect of certain fungal and bacterial phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization pp. 357-361.
- Khan A.A., Jilani G., Akhtar M. S., Saqlan Nagvi S. M., Rasheed M., 2009.** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop production. *J.Agric.Biol.Sci*,1(1):48-58.
- Koala S., 1986.** Effect of nitrogen and phosphorus fertilizers on the growth nodulation and nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba L.*), green pea (*Phaseolus vulgaris L.*). Ph D thesis Montana State University. 285p.
- Kucey R.M.N., 1983.** Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.*, 63:671-678.
- Kucey R.M.N., 1989.** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-233.
- Lambert J., 1975.** Analyse des sols et des végétaux. Manuel d'information des travaux pratiques. INA, El Harrach, laboratoire Agriculture. 114p.
- Lazali M., 2009.** Etude de la symbiose à rhizobium chez l'Arachide (*Arachis hypogaea L.*) : Aspects morfo-physiologiques et agronomiques. Mémoire Magister. ENSA. El-Harrach. 108p.
- Maatallah J., Berraho E.B., Sanjuan J., Luch C., 2002.** Phenotypic characterisation of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22:321-329.

- Maire V., 2005.** Evaluation expérimentale d'un modèle de prélèvement du phosphore par une culture de maïs irriguée sur un sol sableux landais. Master Sciences et Technologies. Bordeaux. 43p.
- Marschner P., 2008.** The role of rhizosphere microorganisms in relation top uptake by plants. In The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. 165-170p.
- Martinez M., Martinez A., 2003.** Effects of phosphate-solubilizing bacteria during rooting periode of sugar cane (*Saccharum officinarum*), Venezuela 51-71 variety, on the grower's oasis substrate. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp. 317-323.
- Meftah Y., 2006.** Réponse de trois populations d'arachide à l'inoculation de rhizobiums autochtones. Thèse Ingénieur. INA. El Harrach. Alger.51Pp
- Mengel K., Kinkby E., 2001.** Principales of plant nutrition, 5eme Ed. Kluwer academic publishers. pp .475-476.
- Mikanova O., Novakova J., 2002.** Evaluation of the phosphate solubilizing activity of soil microorganisms and its sensivity to soluble phosphate.Rostlinna Vyroba.48 (9): 397-400.
- Morel R., 1996.** Les sols cultivés. Lavoisier. 2<sup>eme</sup> Edition. 378p.
- Morel C., 2002.** Caractérisation de la phytodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphates entre le sol et la solution. Memo d'Habilitation a dirigé des recherches. INPL-ENSAIA. Nancy.80 p.
- Munns D.N et Mosse B., 1980.** Mineral nutrition of legume crops. In Advences in legume Science (Summerfield, R.J. and Bunting, A.H., eds). HMSO. London, UK, pp: 115-125.
- Nahas E., 2003.** Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbone, nitrogen, and phosphorus sources. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.pp.111-115.
- Nautiyal C.S., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol.Letters*, 170:265-270.
- Nautiyal C.S., Bhadauria S., Kumar P., Lai H., Mondal R., Verma R., 2000.** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett*, 182:291-296.
- Ndiane M., 1986.** Contribution à l'inoculation bactérienne au champ de l'Arachide (*Arachis Hypogaea*) et du Soja (*Glycine Max*) au Sénégal. Séminaire: Amélioration biologique de la fertilité du sol, Dakar, Sénégal, 19-25 Mars.

- Olivera M., Tejera N., Iribarne C., Ocana A., Lluch C., 2003.** Effect of phosphorus on nodulation and nitrogen fixation by *phaseolus vulgaris*. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp. 157-160.
- Omar S.A., 1998.** The role of rock phosphate fungi and vesicular-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular mycorrhiza in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J. Microbiology*, 18:450-453.
- Patel S. R., Thakur D.S., 1997.** Influence of phosphorus and Rhizobium on yield attributes, yield and nutrient uptake of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Oilseeds Res.* 14(2): 189-193.
- Paul M. H., Planchton C., Ecochard R., 1979.** Etude des relations entre le développement foliaire, le cycle de développement et la productivité chez le soja. *Ann. Amélioration des plantes* . 29: 479-492.
- Pikovskaya R.I., 1948.** Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some species. *Microbiologia*, 17:362-370.
- Ponmurugan P., Gopi C., 2006.** Distribution Pattern and Screening of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Different Food and Forage Crops. *Journal of Agronomy* ,5 (4): 600-604.
- Pradhan N., Sukla L.B., 2005.** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of biotechnology*, 5 (10):850-854.
- Rajankar P.N., Tambekar D.H., Wate S.R., 2007.** Study of Phosphate Fungi and Solubilization Efficiencies of Fungi and Bacteria Isolated From Saline belt of Purna river basin. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3 (6): 701-703.
- Ramachandran K., Srinivasan V., Hamza S., Anandaraj M., 2003.** Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.). In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.325-331.
- Ramos B., Barriuso-Maicas J., Lucas-Garcia J.A., Pereyra de la Iglesia T., Daza A., Gutierrez Manero F. J., 2003.** Phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of *Pinus pinaster* and in the mycosphere of associated *Lactarius deliciosus*.
- Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S., Latif F., 2004.** Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (2): 187-196.
- Raven E., Evert M., Eichhorn., 2000.** Biologie végétale. 6eme édition Américaine. 945p.
- Reyes I., Baziramakenga R., Bernier L., Antoun H., 2001.** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1741-1747.

**Reyes I., Valery A.,Valduz Z., 2006.** Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at abandoned rock phosphate mine. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.pp.69-75.

**Richardson A. E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust.J.Pant. Physiol*, 28: 897-906.

**Richardson A.E., 2003.** Making microorganisms mobilize soil phosphorus. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.pp.85-90.

**Richardson A. E., George T. S., Hens M., Simpson R. J., 2005.** Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In organic Phosphorus in the environment. Eds. BL Turner, E Frossard and D S Baldwin. pp.165-184. CAB International, Wallingford.

**Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y., 2006.** Genetic pf phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287:15-21.

**Sabannavar S.J et Lakshman H.C., 2009.** Effect of Rock Phosphate Solubilization Using Mycorrhizal Fungi and Phosphobacteria on two High Yielding Varieties of *Sesamun indicum* L.*World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (4):470-479.

**Sas L., Rengel Z., Tang C., 2001.** Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Science*, 160: 1191-1198.

**Schvarts C., Muller J-C., Decroux J., 2005.** Guide de la fertilisation raisonnée. Ed, France Agricole. 412p.

**Seddiki S., 1999.** Utilisation du *Bradyrhizobium japonicum* comme rhizobacteries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. Thèse, grade Doctorat en sciences. Canada. 125p.

**Sharma K., Dak G., Agrawal A., Bhatnagar M., Sharma R., 2007.** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of (*Cicer arietinum*) seeds and seedling growth. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1(1): 61-63.

**Siddiqui Z.A., Akhtar M.S., 2007.** Biocontrol of a chick pea Root-Rot disease complex with phosphate-solubilizing microorganisms. *Journal of plant pathology*, 89 (1): 67-77.

**Soltner D., 1986.** Les bases de la production végétale. 16 eme Edition. Edit Collection Sciences et Technique .945p.

**Son T.T.N., Diep C.N., Giang T.T.M., 2006.** Effect of Bradyrhizobia and phosphate solubilizing Bacteria application on soybean in rotation system in the Mekong. *Omonrice* 14:48-57.

- Souchie E.L., Azcon R., Barea J.M., Saggin-Junior O.J., Ribeiro da Silva E.M., 2006.** Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesq.agropec.bras., Brasilia*, 41(9):1405-1411.
- Srivastava S., Kausalya G., Rupela O.P., Nresh-Kumar G., 2003.** Efficacy of organic acid secreting bacteria in solubilization of rock phosphate in acidic alfisols. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.117-124.
- Stephen J., Jisha M.S., 2009.** Buffering Reduces Phosphate Solubilizing Ability of Selected Strains of Bacteria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (1): 135-137.
- Supanjani., Shim H.H., Sung J.J., Dong L.K ., 2006.** Rock phosphate-potassium and rock-solubilizing bacteria as alternative, sustainable fertilisers. *Agron.Sustain.Dev*, 26:233-240.
- Tang C., Hinseiger P., Jaillard B., Rengel Z., Drevon J.J., 2001.** Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N<sub>2</sub> by two beans (*Phaseolus vulgaris*) genotype. *Agronomie*, 21: 683-689.
- Tejera N. A., Campos R., Sanjuan J., Llunch., 2005.** Effect of sodium chloride on growth, nutrient, accumulation, and nitrogen fixation of common bean plants in symbiosis with isogenic strains. *Journal of plant nutrition*, 28: 1907-1921.
- Tiwari V.N., Lehri L.K., Pathak A.N., 1989.** Effect of inoculating crops with phosphor-microbes. *Expl. Agri*, 25: 47-50.
- Toro M., 2003.** Phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants from tropical savannas: An adaptive strategy to acid soils? In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.249-252.
- Trivedi P., Kumar B., Pandey A., Palni L.M.S., 2003.** Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.291-299.
- Valverde A., Igual J.M., Cervantes E., 2003.** Polyphasic characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from rhizospheric of the north-eastern of Portugal. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.273-276.
- Vassilev N., Medina A., Azcon R., Vassileva M., 2006.** Microbial solubilisation of rock-phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp.77-84.

**Vega N. W.O., 2007.** A review on beneficial effects of Rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev.Fac.Nal. Agr. Medellin*,60(1): 3621-3643.

**Wasule D.L., Wadyalkar S.R., Buldeo A.N., 2003.** Effect of phosphate solubilizing bacteria on role of Rhizobium on nodulation by soybean. In: E. Velazquez et C Rodriguez-Barrueco (eds), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.pp.139-142.

**Xie J., 2008.** Screening for phosphate solubilizing Rhizobium Leguminosarum. Master en Science. University Saskatchewan. 96p.

**Yazdani M., Bahmanyar M.A., Pirdashti H., Esmaili M. A., 2009.** Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea mays* L). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49

**Zaidi A., Khan M.S., 2005.** Co-inoculation Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and *Glomus fasciculatum* on Green Gram-*Bradyrhizobium* Symbiosis.*Turk Journal Agriculture*, For, 30:223-230.

**Zaoui K., 1989.** Etude de la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique en relation avec la salinité du sol. Magister en Sciences Agronomique. INA, El Harrach. Alger. 135p.

**Zemoura A., 2005.** Etude comparative de quelques méthodes de dosage du Phosphore assimilables des sols calcaires en régions semi-aride (W de Batna). Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques. Université de Batna. 154p.

# ANNEXES

## **Annexe I : Composition des milieux de culture**

### **A.1.1 Milieu YMA (Vincent, 1970 in Amri, 2008).**

<b>Mannitol</b>	<b>10g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>0,5g</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>0,5g</b>
<b>Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,2g</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,1g</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>15g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>PH</b>	<b>7</b>

Stérilisation pendant 20 min à 120C.

### **A.1.2 Milieu utilisé pour le test de solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu solide (Pikovskaya, 1948, in Pradhan et Sukla, 2005).**

Le milieu utilisé pour le test de solubilisation est le milieu (Pikovskaya, 1948) dont la composition est la suivante :

<b>Glucose</b>	<b>10g</b>
<b>Ca 3(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>5g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>0,5g</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0,5g</b>
<b>KCl</b>	<b>0,2g</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,2g</b>
<b>Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,1g</b>
<b>Mn SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,002</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,002</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>15g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH</b>	<b>7</b>

Stérilisation pendant 20min à 120C.

**A.1.3 Milieu utilisé pour le test de solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu liquide (NBRIP, 1999, in Pradhan et Sukla, 2005).**

<b>Glucose</b>	<b>10g</b>
<b>Ca 3(PO4)5</b>	<b>5g</b>
<b>(NH4)2, SO4</b>	<b>0,5g</b>
<b>KCl</b>	<b>0,2g</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,2g</b>
<b>Mg SO4, 7H2O</b>	<b>0,1g</b>
<b>Mn SO4, H2O</b>	<b>0,002g</b>
<b>FeSO4, 7H2O</b>	<b>0,002g</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,2</b>
<b>pH</b>	<b>7</b>

Stérilisation pendant 20min à 120C.

## Annexe II : Analyse de la variance

### A.2.1. Analyse de la variance du nombre de feuilles au stade végétatif

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	163.33	23	7.10				
VAR.FACTEUR 1	41.33	5	8.27	1.40	0.2783		
VAR.BLOCS	33.67	3	11.22	1.91	0.1712		
VAR.RESIDUELLE1	88.33	15	5.89			2.43	28.0%

### A.2.2. Analyse de la variance du nombre de feuilles au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	138.96	23	6.04				
VAR.FACTEUR1	46.21	5	9.24	2.06	0.1273		
VAR.BLOCS	25.46	3	8.49	1.89	0.1735		
VAR.RESIDUELLE1	67.29	15	4.49			2.12	20.6%

### A.2.3. Analyse de variance de la hauteur de la tige principale au stade végétatif

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	47.00	23	2.04				
VAR.FACTEUR1	17.25	5	3.45	1.82	0.1697		
VAR.BLOCS	1.25	3	0.42	0.22	0.8818		
VAR.RESIDUELLE1	28.50	15	1.90			1.38	16.2%

### A.2.4. Analyse de variance de la hauteur de la tige principale au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	74.99	23	3.26				
VAR.FACTEUR1	25.80	5	5.16	1.74	0.1850		
VAR.BLOCS	4.78	3	1.59	0.54	0.6664		
VAR.RESIDUELLE1	44.41	15	2.96			1.72	14.6%

A.2.5. Analyse de la variance du nombre de rameaux primaires au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	57.33	23	2.49				
VAR.FACTEUR1	21.33	5	4.27	1.90	0.1534		
VAR.BLOCS	2.33	3	0.78	0.35	0.7942		
VAR.RESIDUELLE1	33.67	15	2.24			1.50	18.0%

A.2.6. Analyse de la variance du nombre de fleurs

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	239.33	23	10.41				
VAR.FACTEUR1	47.83	5	9.57	0.82	0.5569		
VAR.BLOCS	16.00	3	5.33	0.46	0.7200		
VAR.RESIDUELLE1	175.50	15	11.70			3.42	54.0

A.2.7. Analyse de la variance de la surface foliaire au stade Végétatif

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1639.64	23	71.29				
VAR.FACTEUR1	287.02	5	57.40	1.87	0.1594		
VAR.BLOCS	891.78	3	297.26	9.68	0.0009		
VAR.RESIDUELLE1	460.84	15	30.72			5.54	21.4%

A.2.8. Analyse de la variance du nombre de nodule au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	215.83	23	9.38				
VAR.FACTEUR 1	166.33	5	33.27	12.27	0.0001		
VAR.BLOCS	8.83	3	2.94	1.09	0.3861		
VAR.RESIDUELLE 1	40.67	15	2.71			1.65	79.0%

Classement des isolats par apport an nombre de nodules selon le test de Newman et Keuls au seuil 5%.

Isolats	Moyennes	Groupes homogènes
R1	7.75	A
R5	1.75	B
R6	1.50	B
R3	1.50	B
T	0.00	B
TS0	0.00	B

A.2.9. Analyse de la variance du poids frais des racines au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	20.77	23	0.90				
VAR.FACTEUR 1	3.82	5	0.76	0.80	0.5710		
VAR.BLOCS	2.56	3	0.85	0.89	0.4710		
VAR.RESIDUELLE 1	14.40	15	0.96			0.98	37.0%

A.2.10. Analyse de la variance du poids sec des racines au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1.68	23	0.07				
VAR.FACTEUR 1	0.20	5	0.04	0.49	0.7783		
VAR.BLOCS	0.25	3	0.08	1.00	0.4229		
VAR.RESIDUELLE 1	1.23	15	0.08			0.29	42.3%

A.2.11. Analyse de la variance du poids frais des tiges et feuilles au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2318.91	23	100.82				
VAR.FACTEUR 1	538.55	5	107.71	1.70	0.1941		
VAR.BLOCS	831.63	3	277.21	4.38	0.0209		
VAR.RESIDUELLE 1	948.73	15	63.25			7.95	17.3%

#### A.2.12. Analyse de la variance du poids sec des tiges et feuilles au stade floraison

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	83.49	23	3.63				
VAR.FACTEUR 1	17.53	5	3.51	1.21	0.3517		
VAR.BLOCS	22.48	3	7.49	2.59	0.0910		
VAR.RESIDUELLE 1	43.47	15	2.90			1.70	23.1%

#### A.2.13. Analyse de la variance du nombre de gousse/plant

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	36.96	23	1.61				
VAR.FACTEUR 1	4.21	5	0.84	0.49	0.7781		
VAR.BLOCS	7.13	3	2.38	1.39	0.2841		
VAR.RESIDUELLE 1	25.63	15	1.71			1.31	64.0%

#### A.2.14. Analyse de la variance du nombre de graine/gousse

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	150.35	23	6.54				
VAR.FACTEUR 1	29.49	5	5.90	0.82	0.5525		
VAR.BLOCS	13.58	3	4.53	0.63	0.6081		
VAR.RESIDUELLE 1	107.28	15	7.15			2.67	53.8%

#### A.2.15. Analyse de la variance du nombre de graine/plant

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1221.62	23	53.11				
VAR.FACTEUR 1	72.87	5	14.57	0.23	0.9419		
VAR.BLOCS	201.46	3	67.15	1.06	0.3950		
VAR.RESIDUELLE 1	947.29	15	63.15			7.95	76.6%

A.2.16. Analyse de la variance du poids de 100 graines

	S.C.E	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1835.71	23	79.81				
VAR.FACTEUR 1	391.04	5	78.21	1.61	0.2163		
VAR.BLOCS	717.34	3	239.11	4.93	0.0141		
VAR.RESIDUELLE 1	727.33	15	48.49			6.96	28.6%

A.2.17. Analyse de la variance du rendement

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	799671.13	23	34768.31				
VAR.FACTEUR 1	89330.63	5	17866.13	0.50	0.7721		
VAR.BLOCS	175611.31	3	58537.11	1.64	0.2212		
VAR.RESIDUELLE1	534729.19	15	35648.61			188.81	73.1%

A.2.18. Analyse de la variance du phosphore du sol

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	741593.50	23	32243.20				
VAR.FACTEUR1	304098.19	5	60819.64	2.62	0.0679		
VAR.BLOCS	88684.13	3	29561.38	1.27	0.3202		
VAR.RESIDUELLE1	348811.19	15	23254.08			152.49	35.3%

A.2.19. Analyse de la variance du phosphore des feuilles

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	173450.00	23	7541.30				
VAR.FACTEUR 1	29750.00	5	5950.00	0.70	0.6365		
VAR.BLOCS	15383.34	3	5127.78	0.60	0.6284		
VAR.RESIDUELLE 1	128316.66	15	8554.44			92.49	20.4%

A.2.20. Analyse de variance de l'azote total des feuilles

	S.C.E.	DDL	CARRES M	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	12.68	23	0.55				
VAR.FACTEUR 1	4.23	5	0.85	1.53	0.2398		
VAR.BLOCS	0.14	3	0.05	0.09	0.9652		
VAR.RESIDUELLE 1	8.30	15	0.55			0.74	21.4%

## Annexe III : Normes D'interprétation Des analyses Du sol

Selon LAMBERT, (1975)

### LE pH

pH	Qualification du sol
< 5	Fortement acide
5 < PH <5,9	Acide
6 < PH <6,5	Légèrement acide
6,6 < PH <7,3	Neutre
7,4 < PH <7,7	Légèrement alcalin
>7,7	Alcalin

### Le calcaire total

CaCO <sub>3</sub> %	Dénomination
<5	Normale
5-20	Suffixe calcaire
20-50	Préfixe calcaro
>50	Calcaire

### La conductivité électrique

CE (mmho/cm) à 25c	Niveau
< 0,1	Très faible
0,2	Faible à moyen faible
0,5	Moyen à élevé
0,5-1	Très élevé
>1	Très forte salinité

### L'Azote total

N%	Teneur
< 0,05 0,05-0,1 0,1-0,15 > 0,15	Très pauvre Pauvre Moyen Bien pourvu

### Le phosphore assimilable ( Gros, 1979)

P (ppm)	Niveau
<150 150-300 >300	Pauvre Moyennement riche Riche

### Tables de conversion des résultats d'analyse

1% = 10.000 ppm	= 10g/kg = 10kg/t
1ppm = 0,0001%	= 1mg/kg = 1g/t

## Résumé

Le présent travail a porté sur l'évaluation de l'activité solubilitrice des phosphates naturels chez quatre rhizobiums isolés des nodules de vigna, cette étude a été conduite en premier temps *in vitro* pour identifier les bactéries solubilisant les phosphates.

Les deux isolats R3 et R6 ont révélé une activité solubilisatrice très nette, et d'une diminution plus marquée du pH du milieu de culture.

En deuxième temps, nous avons étudié la combinaison des isolats R1, R3, R5 et R6 avec la roche phosphatée, pour évaluer leurs effets sur les paramètres de croissance, les propriétés symbiotique, le rendement et ses composantes, et le contenu en éléments minéraux.

L'isolat R1 a donné un nombre de nodules significativement plus élevé, ainsi que le rendement par rapport au reste des isolats. L'effet de l'inoculation est positif pour tous les paramètres mesurés. Par contre l'effet de l'inoculation est négatif concernant le contenu des feuilles en phosphore total.

**Mots clés :** Bactéries solubilisant les phosphates (BSP), Solubilisation des phosphates, Phosphates naturels, Phosphore, Biodisponibilité, Rhizobium, Niébé, Symbiose.

## Summary

This present work is to evaluate phosphorus solubilizing bacteria activity. This thesis is conducting *in vitro* for identify strains that can solubilize phosphorus. The strains R3 and R6 were able to solubilize phosphorus in plat agar, and reduced pH medium.

We had studied the combinaison between rhizobium and phosphate rock in pot, to evaluate their effects on parameters growth, symbiotic characteristic, the yield, yield components, and nutrients uptake.

A positive response to the inoculation of vigna and growth parameters has obtained by the majority of the strains tested. Among them, the strains R1 gave a high number of nodules and yield; but a negative response to the inoculation is obtained for total phosphorus uptake.

**Key words:** Phosphorus-solubilizing-Bacteria (PSB), Phosphates solubilization, Naturels phosphates, Phosphorus, biodisponibility, Rhizobium, Vigna, Symbiosis.

## الملخص

البحث المقدم يتناول دراسة التعايش ريبوزوم/ فاصوليا لاربعة عزلات ريبوزوم قادرة على تشكيل العقد البكتيرية عند فصائل محلية من الفاصوليا خضعت لتقييم نشاطها في تحليل الفوسفات الطبيعي. بدئنا في المخبر بتشخيص العزلات التي لها اكبر قدرة على تحليل الفوسفات في وسطين: وسط صلب « PIKOVSKAYA » ووسط مائي « NBRIP » من اجل دراسة تغيير درجة حموضة الوسط. بعدها قمنا بعملية الرزق المباشر باستعمال العزلات المختبرة لدراسة تاثيرها على نمو الفاصوليا, والمردود, ومحتوى العناصر المعدنية للنبات, وللتربة. النتائج المتحصل عنها بينت ان العزلات R6 , R3 قادرة على تحليل الفوسفات بتشكيل حاقه شفافة حول المستعمرة, و انخفاض محسوس في درجة حموضة الوسط. العزلات R1 كان لها تاثير ايجابي على نمو الفاصوليا, والمردود, و في عدد العقد البكتيرية كما انها اظهرت قدرتها على تثبيت الازوت الجوي. اما العزلات المتبقية كان لها تاثير ايجابي على نمو النبات. ولكن عملية الرزق لم تظهر فعاليتها في محتوى الاوراق للعناصر المعدنية ( الفوسفور).

**كلمات المفتاح:** الفوسفور، الفاصوليا، بكتيرية محللة للفوسفات، تحليل الفوسفات الطبيعي ، التعايش