

## TABLE DES MATIERES

<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>i</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
I. Généralités sur le haricot vert.....	3
I.1. Importance agronomique du haricot vert .....	3
I.2. Importance économique du haricot vert.....	4
II. La rhizosphère .....	4
II.1. Activité enzymatique d'origine microbienne du sol rhizosphérique .....	4
II.1.1. Activité des enzymes hydrolysant la fluorescéine diacétate .....	4
II.1.2. Activité phosphatasique d'origine microbienne du sol rhizosphérique .....	5
III. Les microorganismes telluriques et leurs fonctions .....	5
III.1. Les bactéries .....	5
III.2. Les champignons .....	6
IV. Microorganismes symbiotiques.....	6
IV.1. <i>Rhizobium</i> .....	6
IV.2. Champignons mycorhiziens .....	6
V. Symbiose racinaire .....	7
V.1. Symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses .....	7
V.2. Symbiose mycorhizienne.....	7
V.2.1. Les différents types de mycorhization .....	8
VI. L'importance de l'azote dans la culture des légumineuses .....	9
VI.1. Principales sources d'azote .....	9

VI.1.1. Azote du sol .....	9
VI.1.2. Fixation de l'azote atmosphérique .....	9
VII. L'importance du phosphore dans la culture de haricot vert .....	11
VIII. L'importance du compost dans la culture de haricot vert .....	12
IX. Technologie d'inoculation par des bactéries fixatrices d'azote .....	12
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>13</b>
I. Matériels biologiques d'étude .....	13
I.1. Matériel végétal.....	13
I.2. L'inoculum microbien.....	13
I.3. Les microorganismes des sols de culture .....	14
II. Méthodes .....	14
II.1. Dispositif expérimental.....	14
II.2. Méthodologie d'inoculation.....	16
II.3. Les différents apports de fertilisants .....	16
III. Les différents paramètres évalués .....	18
III.1. Evaluation de la croissance des plantes .....	18
III.1.1. Biomasse aérienne.....	18
III.1.2. Biomasse racinaire .....	18
III.2. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur le taux de nodulation.....	18
III.2.1. Comptage de nodules .....	19
III.2.2. Pesage de nodules .....	19
III.3. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur le taux de mycorhization.....	19
III.3.1. Eclaircissement et coloration des racines.....	19
III.3.2. Observation de l'infection mycorhizienne .....	19

III.4. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur l'activité microbienne globale du sol de culture .....	20
III.4.1. Préparation de la solution tampon de potassium phosphate .....	20
III.4.2. Préparation du substrat : la fluorescéine diacétate (FDA) .....	20
III.4.3. Mesure de l'activité microbienne globale du sol .....	21
III.4.4. Calcul du produit d'hydrolyse .....	21
III.4.5. Préparation de la gamme étalon .....	21
III.5. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur l'activité des enzymes phosphatasiques du sol de culture .....	22
III.5.1. Préparation du tampon Mc Ilvain (citrate phosphate buffer) .....	22
III.5.2. Préparation du substrat et des réactifs .....	22
III.5.3. Dosage du produit d'hydrolyse .....	23
IV. Analyses statistiques.....	23
<b>RESULTATS.....</b>	<b>24</b>
I. Effets de l'inoculation bactérienne sur le développement des plants de haricot vert.....	24
I.1. Hauteur de la biomasse aérienne .....	24
I.2. Poids sec de la biomasse aérienne .....	24
I.3. Poids sec de la biomasse racinaire .....	24
II. Influence des bactéries fixatrices d'azote sur la nodulation des plants de haricot vert nain ..	26
II.1. Taux de nodulation .....	26
II.2. Poids sec des nodules.....	26
III. Effet de l'inoculation sur le taux d'endomycorhization de racines de plants de haricot vert nain .....	28
IV. Influence de l'inoculation sur le fonctionnement microbien du sol.....	30
IV.1. Activité microbienne globale du sol.....	30

IV.2. Activité phosphatasique du sol.....	30
V. Analyse en composantes principales des variables étudiées: .....	32
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>35</b>
I. Impacts de l'inoculation sur la croissance de la plante .....	35
II. Effet de l'inoculation sur la nodulation .....	36
III. L'influence de l'inoculation de <i>Rhizobium</i> sur les champignons mycorhiziens. ....	36
IV. L'influence de l'inoculation sur le fonctionnement microbien du sol .....	37
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>40</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>v</b>

## GLOSSAIRE

**Amendements** : substances que l'on incorpore au sol afin d'en améliorer les propriétés physiques, chimiques et biologiques.

**Fertilisants** : substances apportées aux plantes pour restituer les éléments nutritifs qui ne se trouvent pas dans le sol en quantité suffisante et qui contribuent au développement des plantes.

**Hôte** : organisme vivant sur ou dans lequel vit un autre organisme

**Inoculation** : apport d'une quantité importante de microorganismes sélectionnés à une plante. Cette technique est utilisée afin de remédier au nombre insuffisant ou à la mauvaise efficacité des microorganismes symbiotiques présents dans le sol.

**Inoculum** : culture de microorganismes utilisée pour l'inoculation.

**Mycorhizes** : associations symbiotiques entre des champignons du sol et les racines des plantes vasculaires.

**Nodules** : modifications des racines de divers végétaux qui se traduisent par une hypertrophie des tissus sous l'action de bactéries symbiotiques.

**Rhizobium** : bactérie aérobie du sol qui s'associe avec certaines plantes de la famille des légumineuses.

**Rhizosphère** : partie du sol influencée directement ou indirectement par la racine et qui présente une forte activité microbienne. C'est aussi le siège d'interactions entre les plantes et divers microorganismes associés.

**Symbiote** : désigne un organisme symbiotique.

**Symbiose** : interaction positive entre espèces et représente le type de mutualisme le plus achevé.

**Tourbes** : résultats d'une décomposition très lente et incomplète de la matière organique en milieu anaérobie, matériaux bruns, fibreux à 50% de carbone.

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents traitements au niveau de chaque parcelle. ....	15
Tableau 2 : Les quantités des différents apports de fertilisants .....	17
Tableau 3: Hauteur et poids de la biomasse aérienne et poids de la biomasse racinaire des traitements non inoculés.....	25
Tableau 4: Hauteur et poids de la biomasse aérienne et poids de la biomasse racinaire des traitements inoculés.....	25
Tableau 5: Taux de nodulation et poids sec de nodules dans chaque parcelle non inoculée.....	27
Tableau 6: Taux de nodulation et poids sec de nodules dans chaque parcelle inoculée.....	27
Tableau 7: Taux de mycorhization des plantes des traitements non inoculés .....	29
Tableau 8: Taux de mycorhization des plantes des traitements inoculés .....	29
Tableau 9: Quantités de fluorescéine et p-Nitrophénol obtenues chez les parcelles non inoculées .....	31
Tableau 10: Quantités de fluorescéine et p-Nitrophénol obtenues chez les parcelles inoculées .....	31
Tableau 11: Matrice de corrélation entre les différents paramètres évalués.....	34

## Liste des figures

Figure 1: Structure de la symbiose mycorhizienne arbusculaire .....	4
Figure 2: Etapes simplifiées de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre le Rhizobia et les racines des légumineuses.....	4
Figure 3: Dispositif expérimental au niveau d'une parcelle.....	15
Figure 4: Aspect des vésicules chez <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	28
Figure 5 et 6 : Relations entre développement de plants de haricot, la nodulation, le taux de mycorhization et les activités enzymatiques. ....	32

## Liste des photos

Photo 1: Plants de haricot vert nain .....	13
Photo 2: Dispositif expérimental montrant la culture de haricot vert nain à Analavory. ....	16

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACP</b>	: Analyse en Composantes Principales
<b>CFU</b>	: Colonie Formant Unité
<b>CNRE</b>	: Centre National de Recherches sur l'Environnement
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>FAO</b>	: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>FDA</b>	: fluorescéine diacétate
<b>FOFIFA</b>	: FOibem-pirenena Flkarohana ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra (Centre National de Recherche Appliquée au Développement Rural)
<b>IRD</b>	: Institut de Recherches pour le Développement
<b>LME</b>	: Laboratoire de Microbiologie sur l'Environnement
<b>MAEP</b>	: Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche de Madagascar
<b>N</b>	: azote
<b>nm</b>	: nanomètre
<b>P</b>	: phosphore
<b>pH</b>	: potentiel d'hydrogène
<b>p-NPP</b>	: para Nitrophénylphosphate
<b>TE</b>	: témoin enzyme
<b>TM</b>	: taux de mycorhization
<b>TS</b>	: témoin substrat
<b>v/p</b>	: volume par poids



# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, le monde a connu une forte croissance démographique, ce qui a conduit à un accroissement de la demande en alimentation. Afin de subvenir aux besoins nutritionnels de la population mondiale en constante augmentation, les activités humaines se sont intensifiées (Pascault, 2010). La quantité d'intrants chimiques utilisés s'est accrue. En effet, l'efficacité de ces fertilisants chimiques n'est pas contestable, cependant leur conséquence sur l'environnement, en particulier le lessivage des sols, est indéniable (Walker, 2010). Les sols s'appauvrissent, la vie des microflore telluriques s'est altérée (Viollet, 2010). Ces derniers ne peuvent plus maintenir la durabilité de la fertilité des sols, garant d'une productivité optimale de l'agrosystème (Duponnois *et al.*, 2010). Cette situation constitue une contrainte majeure sur l'atteinte des objectifs de l'autosuffisance alimentaire.

En ce qui concerne Madagascar, la Grande Île perd une grande partie de ses sols étant donné que les 4/5 de ces terres sont vulnérables à l'érosion (Rahajaritombo, 2004). La croissance de l'économie est pourtant liée à la performance de ses productivités agricoles dont 80% de la population malgache dépendent (Bene, 2005). En plus, le commerce extérieur est basé sur le secteur agricole (Ratorakarivo, 1994). Parmi les filières les plus prometteuses de ce commerce international, les haricots verts constituent une culture légumière d'exportation à Madagascar. Ils sont exportés en France, Belgique et aux Pays-Bas et la société Lecofruit en exporte la grande majorité (Manguin-Salomon et Rakotonirainy 2012). En 2004-2005, elle a placé 3000 tonnes sur le marché européen (WWF, 2006). Pourtant, d'après MAEP en 2004, cette exportation présente des contraintes. En plus de la diminution de la fertilité du sol, les produits fournis par notre pays au niveau du marché européen restent faibles et irréguliers tant en quantité qu'en qualité.

Dans ce contexte, la recherche des technologies permettant de réhabiliter durablement les sols dégradés en procurant un gain significatif de production s'impose.

Etant donné que le haricot est une plante capable de s'associer avec des bactéries symbiotiques (*Rhizobium*) pour former une symbiose qui permet de fixer l'azote de l'air améliorant ainsi sa nutrition minérale, l'apport artificiel de souches de bactéries fixatrices d'azote lors du semis de haricot vert est envisageable pour stimuler le développement des microflore telluriques nécessaires à la bonne croissance du haricot vert. Il s'agit d'introduire des souches plus efficaces que celles natives des sols de culture.

Par ailleurs, la technique d'inoculation est un meilleur moyen pour assurer l'augmentation de la production agricole, tout en améliorant la fertilité des sols par une pratique non polluante (Neyra *et al.*, 2012).

De ce fait, l'objectif principal de ce travail vise à évaluer les effets de l'inoculation rhizobienne sur le fonctionnement des microorganismes du sol et le développement des plants de haricot vert nain, *Phaseolus vulgaris*. Cette étude est conduite en adoptant l'hypothèse suivante : « *l'introduction artificielle de souches de Rhizobium par la technique d'inoculation pourrait avoir des effets positifs sur l'activité des microorganismes rhizosphériques associés à Phaseolus vulgaris et sur la croissance des plantes* ».

Les objectifs spécifiques sont de mesurer la croissance des plantes, d'évaluer les impacts de l'inoculation sur la nodulation et sur la mycorhization du haricot vert nain et de décrire le fonctionnement des communautés microbiennes des sols.

Ce travail est présenté en quatre parties : la première partie est réservée à la synthèse bibliographique, la deuxième partie décrira les matériels et méthodes utilisés, la troisième partie résumera les résultats obtenus et la dernière partie formulera la discussion ainsi que la conclusion et les perspectives.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Généralités sur le haricot vert

Le haricot, une légumineuse appartenant au genre *Phaseolus*, est originaire d'Amérique (Kaplan, 1981). L'espèce, *Phaseolus vulgaris*, occupe une place importante dans le système agricole, particulièrement en Afrique et dans les pays du Sud en général (Kaplan, 1981 ; Gepts, 1990). A Madagascar, sa culture est pratiquée presque dans toute l'île, dont la plus grande partie se trouve dans les régions des hauts plateaux.

Les haricots verts font partie des variétés de *Phaseolus vulgaris*. Il s'agit d'une plante annuelle à feuille trifoliée, cultivée pour sa gousse. La récolte de haricot vert se fait lorsque les gousses ont atteint leur taille définitive (Rakotonirina, 2010). Ces gousses sont dépourvues de parchemin. Elles sont fines, droites, bien fermes, sans fils et ont une taille variable, jusqu'à 17 cm. Les grains se produisent entre 90 et 130 jours, selon les variétés (Winrock international, 2005).

En général, le haricot est une plante très sensible au manque d'eau. Pour avoir une croissance vigoureuse ainsi qu'une bonne fixation d'azote, la nutrition phosphatée adéquate est importante (Graham et Rosas, 1979). Pour sa nutrition azotée, le haricot assimile soit les nitrates présents dans le sol à travers la mobilisation de l'enzyme, la nitrate réductase de la plante, soit il utilise l'azote atmosphérique fixé par l'intermédiaire de l'enzyme, la nitrogénase de la bactérie symbiotique fixatrice d'azote. Ces deux processus sont complémentaires au cours du cycle de croissance de haricot et l'équilibre entre les deux dépend de plusieurs facteurs pédoclimatiques (Franco *et al.*, 1979).

#### I.1. Importance agronomique du haricot vert

La culture de légumineuses fixatrices d'azote constitue une alternative pour améliorer la nutrition azotée et pour augmenter les rendements de culture subséquente. Ces effets bénéfiques sont probablement dus à leur influence sur les propriétés des sols (Bado, 2002). En effet, les légumineuses en général sont capables de former des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec des bactéries du groupe de *Rhizobium*. Ce système de fixation d'azote atmosphérique permettrait en même temps d'améliorer la nutrition azotée des plantes et d'augmenter la quantité d'azote au niveau du sol. De ce fait, elles sont considérées, depuis longtemps, comme engrais verts (Alazard et Duhoux, 1987). Particulièrement, la culture de haricot vert permettrait de gérer durablement la fertilité du sol étant donné qu'elle se pratique généralement en alternance avec d'autres cultures.

### **I.2. Importance économique du haricot vert**

Les légumineuses sont des aliments qui apportent des nutriments essentiels. Elles sont surtout cultivées pour leur teneur élevée en protéines qui est presque le double de celles des grains de céréales (Rochfort et Panozzo, 2007). Ces plantes souvent appelées plantes protéagineuses couvrent environ 30% de nos besoins alimentaires en azote (Mbengue, 2010). En plus les haricots, qu'ils soient secs ou verts sont d'importants produits de rente pour le marché local. Ces produits sont exportables, frais ou conditionnés (MAEP, 2004).

## **II. La rhizosphère**

La rhizosphère est la région du sol située au voisinage immédiat des racines (Fuchs, 1999). C'est un endroit particulier où les flux de matière et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses (Cleyet-Marel et Hinsinger, 2000). En hébergeant une quantité de microorganismes au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, l'activité microbiologique dans la rhizosphère est de grande importance et a diverses conséquences sur les plantes (Hilali *et al.*, 2001 ; Soderberg *et al.*, 2002).

### **II.1. Activité enzymatique d'origine microbienne du sol rhizosphérique**

D'après Hoffmann et Seegerer (1951), la fertilité des sols peut être estimée à partir des mesures des activités enzymatiques du sol, en raison de leur lien évident avec les grands cycles biogéochimiques des éléments nutritifs. En plus, ces activités sont aussi utilisées afin d'étudier les fonctionnements biologiques des sols après certains traitements, comme l'inoculation ou la fertilisation (Andrianandrasana, 2009). La synthèse de différents types d'enzymes exprime la présence et l'activité de groupes microbiens spécifiques (Burns, 1982).

#### **II.1.1. Activité des enzymes hydrolysant la fluorescéine diacétate**

L'activité des enzymes hydrolysant la fluorescéine diacétate connaît actuellement un vif intérêt, étant donné la diversité des enzymes impliquées dans ce groupe: des lipases, des protéases, des estérases. Ainsi, elle permet une mesure plus globale de l'activité enzymatique microbienne du sol et de ce fait de l'activité microbienne du sol (Alvarez *et al.*, 2002).

### **II.1.2. Activité phosphatasique d'origine microbienne du sol rhizosphérique**

La phosphatase est une enzyme intracellulaire chez les microorganismes du sol en général. Sa production est induite par l'absence du phosphore qu'il faut acquérir au niveau du sol. Cette enzyme contribue à la qualité du sol du point de vue agronomique (Chaussod, 1996). Après sa biosynthèse, la persistance de la phosphatase dépend étroitement de la quantité et de la nature des colloïdes minéraux et organiques présents, du pH, etc. (Quiquampoix *et al.*, 1993). L'activité phosphatasique du sol est fortement influencée par le pH. Elle est classée selon le pH optimal de leur fonctionnement (Turner, 2010). Ainsi, on distingue :

#### **❖ Phosphatases acides**

Les phosphatases sont dites acides quand le pH optimal de leur activité est inférieur à 7.

#### **❖ Phosphatases alcalines**

Pour les phosphatases alcalines, le pH optimal de leur activité est supérieur à 7. Elles sont prédominantes dans les sols alcalins.

### **III. Les microorganismes telluriques et leurs fonctions**

Le sol abrite de très nombreux microorganismes vivants, des groupes bénéfiques pour l'homme et les plantes jusqu'aux groupes sources de maladies ou de produits toxiques. Parmi ces microorganismes, on peut citer comme principaux groupes les bactéries et les champignons.

#### **III.1. Les bactéries**

Les bactéries sont classées parmi les Procaryotes. De nombreuses bactéries du sol revêtent une importance particulière pour la production végétale. Certaines jouent des rôles prépondérants dans les cycles de certains éléments fertilisants, comme les bactéries nitrifiantes pour le cycle d'azote ou les bactéries acidifiantes du cycle du soufre. D'autres interviennent dans la protection des plantes contre les agents pathogènes, appelées antagonistes, comme le cas des Actinomycètes (Fuchs, 1999). Le sol héberge également des milliers de bactéries capables d'éliminer certains polluants ou susceptibles d'être utilisées pour certains processus de fabrication ou de transformation.

#### **❖ Les Actinomycètes**

Ce sont des microorganismes hétérotrophes à structure végétative de type mycélien. Ils sont présents en grande quantité dans le sol. Ils participent dans la dégradation des matières organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries.

Ils sont aussi capables de produire des substances probiotiques dont les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique qui contribuent à la croissance et à la survie de la plante (Dommergues *et al.*, 1970).

### III.2. Les champignons

Les champignons jouent des rôles importants dans l'écosystème « sol ». Ils se présentent généralement sous forme d'hyphes et/ou de spores germées ou non dans le sol, sécrètent des substances comme des acides organiques, des polyphénols, des acides aminés, des antibiotiques. Certains jouent un rôle prépondérant dans les cycles des éléments en dégradant des molécules complexes (Fuchs, 1999).

## IV. Microorganismes symbiotiques

### IV.1. *Rhizobium*

La majorité des bactéries fixatrices d'azote en association avec des plantes ont été longtemps groupées en un seul genre *Rhizobium*. Avec l'avènement de nouvelles techniques de classification, ces bactéries sont actuellement diversifiées en plusieurs genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*. Celles qui induisent la nodulation du haricot (*Phaseolus vulgaris*) appartiennent généralement au genre *Rhizobium* (Diouf, 1997). Les différentes souches de *Rhizobium* isolées jusqu'à présent appartenaient toutes au groupe des Alpha-protéobactéries (Moulin, 2001).

### IV.2. Champignons mycorhiziens

Les champignons mycorhiziens font partie d'une composante importante des microorganismes du sol (Zhu *et al.*, 2001). Ils ont la capacité d'induire une infection aux racines de certaines plantes et forment des « mycorhizes » (Ruotsalainen *et al.*, 2002). Ils jouent un rôle majeur dans l'évolution spatio-temporelle des écosystèmes végétaux terrestres (Boucher *et al.*, 1982).

Dans beaucoup de sols naturels, la réserve en bioéléments disponibles est faible ou peu accessible. Comme l'extension du champignon mycorhizien dans le sol est bien plus grande que celle de la racine, la surface d'absorption et le volume du sol dans lequel les sels minéraux sont prélevés sont fortement augmentés. Cela est dû à ses hyphes très fins qui peuvent atteindre les régions du sol inaccessibles aux racines (Andrianarisoa, 2004).

Ces symbiotes fongiques participent à l'optimisation de la nutrition minérale des plantes, particulièrement en phosphore et en azote (Duponnois *et al.*, 2005, 2007 ; Grimoldi *et al.*, 2005).



## V. Symbiose racinaire

Etymologiquement, symbiose signifie « vivre avec ». Au sens large, une symbiose est une association stable impliquant au minimum deux organismes vivants (Mbengue, 2010). La symbiose est un cas particulier de mutualisme : les organismes interagissent réciproquement entre eux (Bertrand *et al.*, 2009).

### V.1. Symbiose *Rhizobium*-légumineuses

Le sol abrite des bactéries du genre *Rhizobium*, capables de s'associer avec des légumineuses en induisant la nodulation. Ces bactéries sont susceptibles de fixer l'azote atmosphérique au profit de la plante avec laquelle elles entrent en symbiose (Ndoye, 1990). Dans les conditions environnementales favorables, les différentes espèces de *Rhizobium* peuvent assurer à plus de 75% de la consommation d'azote des cultures, le reste provenant des réserves du sol (Aufhammer, 1998). La seule partie de la racine des légumineuses qui soit sensible à une infection causée par *Rhizobium* est une zone de taille réduite qui est adjacente à l'extrémité en croissance au niveau de laquelle se forment les cellules des poils absorbants (Bhuvanesware *et al.*, 1988).

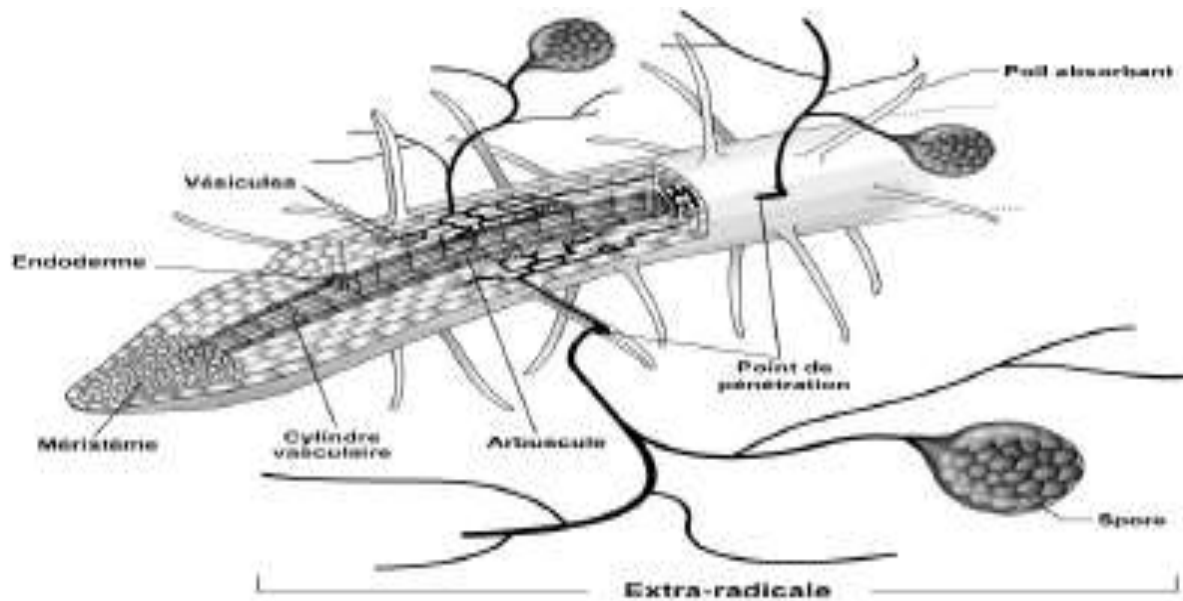
La symbiose fixatrice d'azote s'effectue dans des nodules, excroissances induites par les bactéries généralement sur les racines et plus rarement sur les tiges. (Moulin, 2001). A partir de cette symbiose, la grande partie des légumineuses sont capables d'utiliser l'azote provenant de l'atmosphère (Bado, 2002).

### V.2. Symbiose mycorhizienne

En plus de la symbiose fixatrice d'azote, les légumineuses sont capables d'établir une symbiose avec les champignons mycorhiziens (Mbengue, 2010).

La symbiose mycorhizienne est donc une association biologique entre des plantes et des champignons symbiotiques. Cette interaction implique un échange bidirectionnel des ressources entre les plantes hôtes et les champignons. Ces derniers présentent des hyphes qui vont s'unir intimement aux racines fines des plantes et qui prolongent les racines, explorant ainsi des zones plus importantes de sol (Kedi, 2011).

Lors de cette association, les champignons confèrent à la plante hôte une meilleure croissance grâce à l'amélioration de la nutrition hydrominérale, et par conséquent un meilleur rendement (Egli et Brunner, 2002). En retour, ces champignons bénéficient des ressources énergétiques et carbonées de la plante nécessaires à leur croissance et à leur développement (Smith et Read, 1997).



**Figure 1:** Structure de la symbiose mycorhizienne arbusculaire (Fortin *et al.*, 2008)

### V.2.1. Les différents types de mycorhization

Il existe deux principaux types de mycorhizes : l'endomycorhize (forme endotrophe) et l'ectomycorhize (forme ectotrophe) (Frank, 1885). Des formes intermédiaires associant les caractéristiques des deux types existent chez certaines plantes.

#### • L'endomycorhize

Les champignons endomycorhiziens sont des symbiotes stricts, qui ne se développent qu'en association avec une racine vivante formant ainsi les endomycorhizes. Cette mycorhization concerne surtout les plantes cultivées. On parle d'endomycorhizes à vésicules et/ou à arbuscules quand l'une ou les deux structures sont visibles (Alvarez *et al.*, 2002). Ce type de mycorhize est la plus abondante des symbioses mycorhiziennes (Walker, 2010).

Les endomycorhizes se caractérisent par la colonisation interne du cortex racinaire par les hyphes des champignons (Woolhouse, 1975).

#### • L'ectomycorhize

Dans le cas de l'ectomycorhize, le champignon, dans la plupart des cas des champignons du groupe des Basidiomycètes, prolifère autour des racines formant un manchon compact à partir duquel les hyphes se développent tant vers l'intérieur jusqu'au cortex formant un réseau continu appelé « réseau de Hartig » entre les cellules corticales (Lafon *et al.*, 1996) que vers l'extérieur jusqu'au

sol voisin (Walker, 2010). Le réseau de Hartig est le lieu d'échange entre le champignon et les plantes. Ce type de symbiose mycorhizienne est rencontré surtout chez les arbres forestiers (Marks et Foster, 1973). A la différence des mycorhizes à vésicules et à arbuscules, les ectomycorhizes peuvent être distingués et identifiés à l'œil nu (Harley et Smith, 1983).

### **VI. L'importance de l'azote dans la culture des légumineuses**

L'azote est essentiel pour la croissance des plantes (Boivin-Masson *et al.*, 2001). Il s'agit d'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes (Epstein, 1972). L'azote assure le développement des organes végétatifs et indispensables à la production de chlorophylle, donc à la photosynthèse. Il contribue également à l'augmentation du taux de protéine dans les grains (Ralijsaona, 2002).

L'azote facilite l'utilisation des hydrates de carbone et active le développement et l'activité racinaire, en favorisant l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stevenson, 1986).

Le manque d'azote inhibe la synthèse des protéines, des enzymes nécessaires à la formation, à la croissance et au fonctionnement des cellules. Ce qui conduit à la réduction de la croissance des plantes (Rogolini, 2006).

#### **VI.1. Principales sources d'azote**

Les légumineuses possèdent deux systèmes différents pour assimiler l'azote (Ndiaye, 1986) :

- L'absorption des nitrates du sol provenant soit de la fertilisation, soit de la minéralisation de la matière organique du sol.
- La fixation biologique de l'azote.

##### **VI.1.1. Azote du sol**

L'azote présent dans le sol est la première source d'azote pour les plantes. En étant des plantes fixatrices d'azote atmosphérique, les légumineuses utilisent d'abord l'azote du sol durant sa première phase de croissance. Il s'agit essentiellement d'azote sous forme organique (Bado, 2002). Les nitrates sont absorbés par les racines, puis, ils sont réduits par la nitrate réductase, enzyme présente dans toutes les feuilles des légumineuses, pour donner de l'ammoniac (Obaton, 1989).

##### **VI.1.2. Fixation de l'azote atmosphérique**

La majeure partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère. De point de vue écologique, la fixation biologique de l'azote est un phénomène important qui représente une

fixation annuelle de  $175.10^6$  t d'azote (Kammoun, 1983). La fixation s'effectue au niveau de la rhizosphère où les bactéries symbiotiques vivent ou dans des zones de prolifération de bactéries libres fixatrices d'azote (Alami *et al.*, 1999).

#### ❖ Formation des nodules

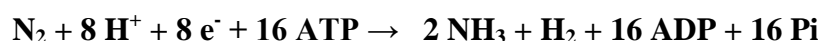
Pendant l'association d'une légumineuse avec des bactéries nodulant les légumineuses, des composés phénoliques, flavonoïdes, libérés par la plante hôte incitent les bactéries à produire de lipo-oligosaccharides spécifiques, dénommés les facteurs Nod. Ceux-ci sont des signaux moléculaires qui activent la division des cellules corticales de la racine entraînant la formation d'un nouvel organe différencié chez la plante hôte: nodule ou nodosité (Diaw, 2002). Ce sont des structures visibles à l'œil nu. Par ces nodules, la plante hôte offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. En retour, la bactérie fixe l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et le fournit à la plante hôte sous forme assimilable  $NH_3$  (Dommergues *et al.*, 1999).

La nodulation apparaît généralement 15 à 30 jours après le semis et l'infection des racines par les bactéries (Adams *et al.*, 1985).

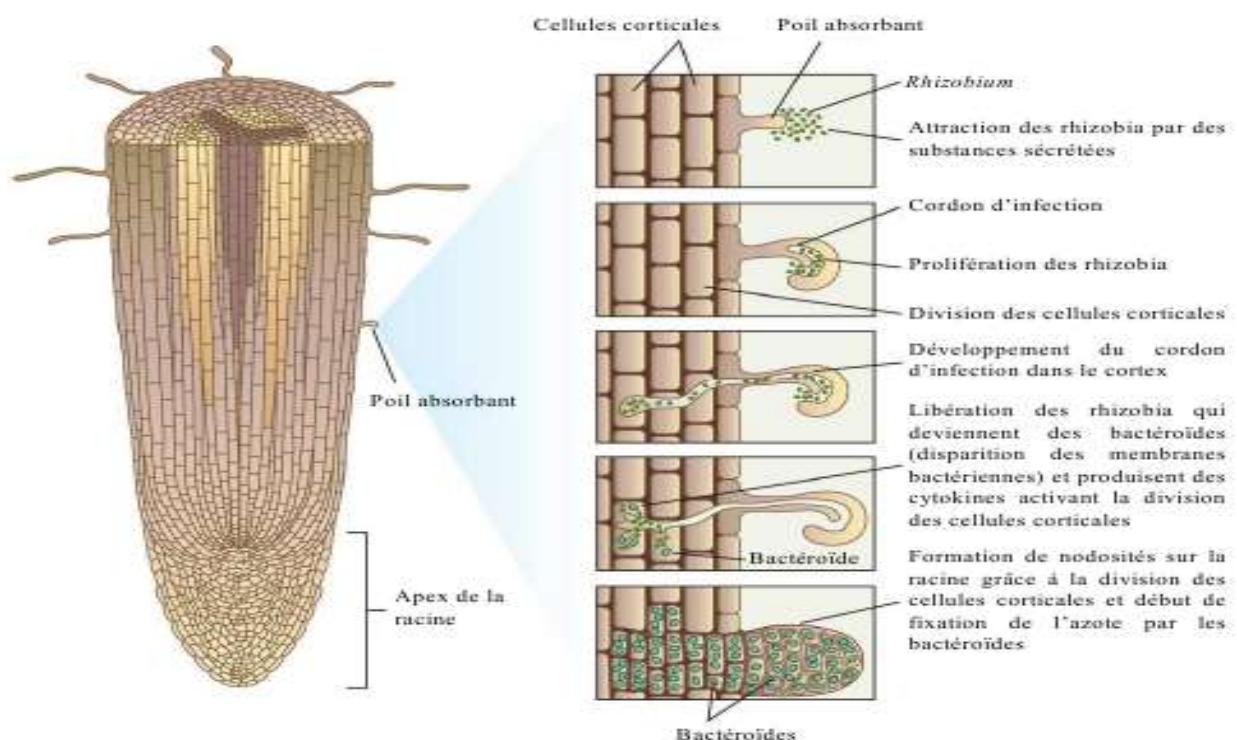
Chez le haricot, la concentration en P est très importante pour la formation des nodules. En milieu pauvre en phosphore, le nodule est un puits très attractif (Graham et Rosas, 1979). Il est donc important de trouver l'équilibre entre la fertilisation phosphatée et l'inoculation des plantes par des bactéries fixatrices d'azote.

#### ❖ Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique sur terre est classée parmi les processus biochimiques les plus importants (Lakhal, 2011). L'azote atmosphérique pénètre par le sol jusqu'aux nodosités où les bactéroïdes de *Rhizobium* le réduisent en ammoniac. Celui-ci est ensuite incorporé dans des chaînes carbonées pour donner des acides aminés et des protéines (Obaton, 1989). La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac se fait selon la réaction suivante (Dresler-Nurmi *et al.*, 2009):



Cette réaction est catalysée par le complexe enzymatique: la nitrogénase (Dixon et Wheeler, 1986). Seules les légumineuses portant des nodosités fixatrices possèdent cette enzyme (Obaton, 1989).



**Figure 2:** Etapes simplifiées de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre le Rhizobia et les racines des légumineuses (Viollet, 2010).

## VII. L'importance du phosphore dans la culture de haricot vert

Le phosphore est classé parmi les nutriments importants pour la croissance et le développement des plantes, mais il est peu mobile et peu disponible dans la plupart des sols (Raghothama, 1999). Sa présence dans la partie superficielle du sol est due à l'utilisation des fertilisants phosphatés, des cycles biologiques et de l'accumulation des feuilles mortes et des détritiques dans les sols non cultivés (Soon, 2008). Son absorption par les racines est sous forme d'ions orthophosphates  $P_i$  (phosphore inorganique) (Bielecki, 1973). Les plantes produisent des phosphatases et les microorganismes catalysent la transformation du  $P_o$  (Phosphore organique) en  $P_i$  (Reed *et al.*, 2011). Les phosphates sont considérés comme vecteurs d'énergie dans plusieurs processus métaboliques, telle que la photosynthèse (Raghothama et Karthikeyan, 2005). Les besoins de la plante en phosphate sont en petite quantité mais sa présence est importante dès le stade plantule. Les phosphates favorisent un enracinement solide et participent à la croissance de la plante (Schiffers, 2011).

L'insuffisance de phosphore conduit à un retard de croissance, à un moindre développement et à une faible production (Fardeau, 1992).

### VIII. L'importance du compost dans la culture de haricot vert

Le compostage est un processus biologique contrôlé en convertissant et en valorisant des substrats organiques (sous-produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique, ...) en un produit stable et sain semblable à un terreau et riche en composés humiques. Son ajout au sol apporte plusieurs avantages (Mustin, 1987). Il permet d'améliorer la structure du sol ainsi que les propriétés physiques et chimiques du sol (FAO, 2005), en fournissant des éléments minéraux majeurs (N, P, K) et mineurs (Mg, Cu, Zn, ...). Il augmente aussi la capacité d'échange du sol. L'humus favorise la prolifération des microorganismes du sol et stimule le développement racinaire de la plante (Ralijsaona, 2002). En somme, l'apport du compost permet de corriger un déficit des sols en matière organique (Devisscher, 1997).

### IX. Technologie d'inoculation par des bactéries fixatrices d'azote

L'inoculum est un produit biologique vivant non stockable (Obaton, 1989). Il est constitué d'un mélange de cellules de *Rhizobium* ou d'autres microorganismes bénéfiques et d'un support, par exemple, la tourbe. L'isolement des souches se fait généralement à partir de jeunes nodules de racines (Vincent, 1970). Cet inocula doit apporter un nombre suffisant de bactéries par graine pour assurer une bonne nodulation de la plante (Woomer, 2012 ; Neyra *et al.*, 2012).

L'inoculation microbienne se fait selon deux modes différentes (Montange et Saint Macary, 1989) :

- directe : les souches de *Rhizobium* sont mises sur la graine (enrobage) avant le semis. Pour réaliser l'enrobage, il est nécessaire d'utiliser un adhésif efficace tel que l'eau sucrée, l'amidon, le miel pour coller les microorganismes, mais aussi pour les nourrir jusqu'à ce qu'ils infectent la plantule (Hoben *et al.*, 1991).

- indirecte : les souches microbiennes sont disposées dans la raie de semis (inoculum liquide). Cet inoculum est constitué par la culture liquide de microorganismes qui est diluée au moment de l'emploi.

L'inoculation par des bactéries fixatrices d'azote permet de fournir qualitativement et quantitativement une population de *Rhizobium* efficace au sol au profit de ceux qui sont capables de mettre à la disposition des plantes les éléments utiles à l'amélioration du rendement. Elle augmente l'activité de fixation de l'azote (Andrianarisoa, 2004).

# MATERIELS ET METHODES



## MATERIELS ET METHODES

### I. Matériels biologiques d'étude

Les matériels biologiques de cette étude sont de trois types : les plants de haricot vert, l'inoculum microbien et les microorganismes des sols de culture.

#### I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal a été le haricot vert nain du nom scientifique *Phaseolus vulgaris*, variété 02 fournie par la société Lecofruit. Il s'agit d'une variété de haricot vert cultivée par cette société dans la région de l'Itasy pour la production de gousses destinées à l'exportation ou à la consommation locale. Faisant partie de la famille des légumineuses, la classification systématique de cette plante selon APGII (Angiosperm Phylogeny Group, 2003) est la suivante :

<b>Règne :</b>	PLANTAE
<b>Sous-règne :</b>	TRACHEOBIONTA
<b>Division :</b>	MAGNOLIOPHYTA
<b>Classe :</b>	MAGNOLIOPSIDA
<b>Sous-classe :</b>	ROSIDAE
<b>Ordre :</b>	FABALES
<b>Famille :</b>	FABACEAE
<b>Genre :</b>	<i>Phaseolus</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>Nom vernaculaire :</b>	Haricot ou Tsaramaso (en malgache)



**Photo 1:** Plants de haricot vert nain

#### I.2. L'inoculum microbien

L'inoculum microbien utilisé dans cette étude est un mélange de six souches de Rhizobia identifiées performantes sur une variété de haricot « Ranjonomby » sélectionnée par le FOFIFA. Ces souches de bactéries se sont montrées efficaces et infectives lors des tests préalables effectués au laboratoire. Il s'agit des souches isolées à partir des nodules collectés sur les systèmes racinaires de haricot cultivés dans le site expérimental du Laboratoire des RadioIsotopes sis à Lazaina – Antananarivo. Les critères de sélection de ces souches ont été leur capacité à re-noduler ainsi que leur performance quant à la stimulation du développement des plants du haricot. L'inoculum



microbien a été fourni par le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE).

### **I.3. Les microorganismes des sols de culture**

Etant donné que l'un des objectifs spécifiques de la présente étude a été d'évaluer l'impact de l'inoculation sur le fonctionnement des microorganismes bénéfiques pour la plante, trois groupes de microorganismes ont été considérés à savoir :

- les bactéries nodulant les légumineuses
- les microorganismes globaux du sol
- les champignons mycorhiziens à arbuscules et à vésicules

La population et le fonctionnement de ces trois groupes de microorganismes ont été évalués au niveau des sols rhizosphériques ou au niveau des systèmes racinaires des plantes.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Dispositif expérimental**

L'expérimentation a été établie sur le terrain de production de haricot vert de la société Lecofruit sis à Analavory, Région de l'Itasy (18° 35' Sud 46° 26' Est). Quatre blocs servant de répétitions contenant chacun 16 parcelles ont été établis. Dans ce dispositif, chaque parcelle a subi différents traitements, dont les 8 premiers ne contiennent pas d'inocula. Une parcelle témoin non inoculée et sans apport de fertilisant a été établie. Le tableau suivant montre les différents traitements au niveau de chaque parcelle.

**Tableau 1:** Les différents traitements au niveau de chaque parcelle.

Parcelles non inoculées		Parcelles inoculées	
1	Pas d'apport, pas d'inoculation	9	Pas d'apport + inoculation
2	Compost	10	Compost + inoculation
3	Compost + N	11	Compost + N + inoculation
4	Compost + P	12	Compost + P + inoculation
5	Compost + N + P	13	Compost + N + P + inoculation
6	N	14	N+ inoculation
7	P	15	P+ inoculation
8	N + P	16	N + P+ inoculation

**Pas d'apport** : pas d'apport d'engrais azoté ni d'engrais phosphaté ni de compost.

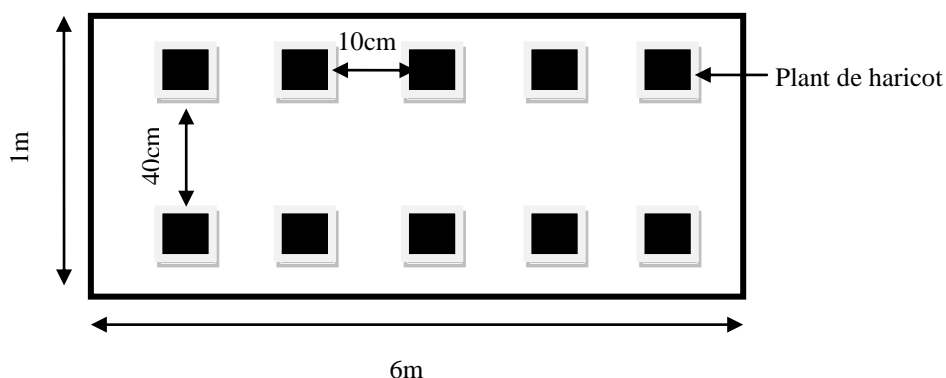
**N** : Non inoculé et avec apport de nutrition azotée

**P** : Non inoculé et avec apport de fertilisant phosphaté

**Inoculation** : apport d'inoculum microbien

Chaque parcelle mesure 6m de long et 1m de large. Le semis a été fait en deux lignes avec un espacement de 40cm et 10cm entre chaque plante. Chaque traitement ne figure qu'une seule fois dans chaque parcelle. Les échantillons ont été prélevés par randomisation suivant la méthode de Vincent (1970). Une creusée d'environ 15 cm a été réalisée autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.

La figure ci-dessous représente le dispositif d'une parcelle.

**Figure 3:** Dispositif expérimental au niveau d'une parcelle.

La photo ci-après montre la disposition de culture de haricot vert dans le site d'expérimentation à Analavory.



**Photo 2:** Dispositif expérimental montrant la culture de haricot vert nain à Analavory.

(Source : auteur)

## II.2. Méthodologie d'inoculation

L'inoculum microbien a été préparé préalablement par le LME/CNRE. Il s'agit d'une culture bactérienne fixée sur la tourbe comme support solide avec une proportion 40ml/100g (v/p). Un gramme de tourbe imprégné contient environ  $1,6 \times 10^7$  CFU de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote.

L'inoculum microbien a été appliqué aux graines juste avant le semis selon la technique décrite par Feng *et al.* (2002): 1 kg de graines de haricot stérile ont été mélangées avec 100 mg d'inoculum et 1l d'une solution de saccharose (60%) comme adhésive. Les graines inoculées ont été séchées durant 30 minutes à la température ambiante, stockées dans des flacons en verre puis semées dans les parcelles d'expérimentation.

Pour des expérimentations à l'échelle de laboratoire ou sous serre, une stérilisation préalable des graines selon la méthode proposée par Kyei-Boahan *et al.* (2002) est souvent appliquée. La surface des graines est stérilisée, sous la hotte à flux laminaire, en les mettant dans de l'éthanol à 95% pendant 3 minutes puis dans de l'hypochlorite de sodium 3% pendant 3mn suivi de plusieurs lavages successifs à l'eau distillée stérile. Pour notre cas et pour s'approcher des conditions de pratique paysanne, aucune stérilisation préalable des graines n'a été effectuée.

## II.3. Les différents apports de fertilisants

Divers fertilisants ont été apportés sur chaque parcelle d'expérimentation. Le tableau suivant montre le type et la quantité des fertilisants utilisés.

**Tableau 2 :** Les quantités des différents apports de fertilisants

Traitements	Composition
1	Pas d'apport, pas d'inoculation
2	900 kg/ha de compost
3	900 kg/ha de compost + 60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30
4	900 kg/ha de compost + 230 kg/ha d'engrais phosphaté
5	900 kg/ha de compost + 60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + 230 kg/ha d'engrais phosphaté
6	60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30
7	230 kg/ha d'engrais phosphaté
8	60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + 230 kg/ha d'engrais phosphaté
9	Inoculation
10	900 kg/ha de compost + inoculation
11	900 kg/ha de compost + 60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + inoculation
12	900 kg/ha de compost + 230 kg/ha d'engrais phosphaté + inoculation
13	900 kg/ha de compost + 230 kg/ha d'engrais phosphaté + 60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + inoculation
14	60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + inoculation
15	230 kg/ha d'engrais phosphaté + inoculation
16	60 kg/ha d'engrais azoté codé engrais 30 + 230 kg/ha d'engrais phosphaté + inoculation

**Pas d'apport:** pas d'apport d'engrais azoté ni d'engrais phosphaté ni de compost.

**Engrais phosphaté:** phosphate bi-calcique à 25% administré comme engrais en fumure de fond.

**Compost:** à base de paille de riz.

**Engrais azoté:** composé de fientes de poules, d'engrais biocorne contenant 11 unités d'azote par kilo et de patentkali.

**Inoculation:** apport d'inoculum microbien.

### **III. Les différents paramètres évalués**

#### **III.1. Evaluation de la croissance des plantes**

Les échantillons ont été prélevés après six semaines de culture où les plantes commencent à fleurir et à produire des gousses. Une plante par parcelle a été prélevée dans chaque bloc. Avec quatre blocs comme répétition, cela donne au total quatre plantes par traitement.

##### **III.1.1. Biomasse aérienne**

Le développement des plantes de chaque traitement a été évalué à partir de la hauteur de la partie aérienne fraîche et son poids sec.

Pour la hauteur de la tige, la mesure a été effectuée du collet jusqu'au bourgeon terminal.

Le séchage de la plante a été fait dans une étuve à 100°C pendant 24h. Le poids sec des plantes a été par la suite évalué sur une balance de précision juste après la sortie de l'étuve. Cela permet d'éviter un éventuel changement de poids des échantillons dû aux conditions de conservation au laboratoire.

##### **III.1.2. Biomasse racinaire**

Les systèmes racinaires ont été soigneusement lavés à l'eau courante pour enlever le sol rhizosphérique restant.

Après avoir évalué le taux de mycorhization, les racines ont été séchées à l'étuve pendant 24h sous une température de 100°C. Puis les biomasses racinaires sont pesées sur une balance de précision juste après les avoir sorties de l'étuve

#### **III.2. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur le taux de nodulation**

L'effet de l'inoculation sur la formation des nodules a été évalué au niveau du nombre et du poids des nodules présents sur les racines des plantes.

Le poids des nodules observés au niveau des systèmes racinaires d'une plante est étroitement lié à son activité fixatrice d'azote, tandis que le nombre est un signe sur les conditions de l'infection des racines par les bactéries nodulant. Lorsque la plante porte peu de nodules, ceux-ci sont souvent plus volumineux que si la plante en portait beaucoup (Saint Macary, 1989).

### **III.2.1. Comptage de nodules**

Les nodules sont soigneusement lavés à l'eau du robinet, puis détachés de la racine à l'aide d'une pince fine. La vérification dans le sol rhizosphérique est nécessaire, au cas où quelques nodules sont décollés de la racine lors du déracinement de la plante. Le taux de nodulation est exprimé par le nombre de nodules par plante.

### **III.2.2. Pesage de nodules**

Après que les nodules soient bien lavés et débarrassés de sable ou de terre, ils sont séchés dans une étuve pendant 24h sous une température de 100°C puis pesés à l'aide d'une balance de précision.

## **III.3. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur le taux de mycorhization**

Le taux d'infection mycorhizienne a été analysé à partir des biomasses racinaires fraîches. Il est exprimé en % de nombre de racines où le mycorhize est présent. L'analyse permet de mettre en évidence l'effet de l'inoculation sur la mycorhization.

### **III.3.1. Eclaircissement et coloration des racines**

Selon la méthode de Phillips et Hayman (1970), les racines fines de chaque plant de haricot prélevées sur le terrain sont soigneusement lavées à l'eau courante. Par la suite, le trempage des racines fines dans une solution de KOH 10% à 90°C pendant 20 minutes a été effectué pour éclaircir le cytoplasme des cellules. Après refroidissement et rinçage abondant à l'aide de l'eau du robinet, la coloration a été réalisée en immergeant les racines dans une solution de bleu trypan à 5% pendant 20 minutes à 90 °C.

### **III.3.2. Observation de l'infection mycorhizienne**

L'observation sous microscope optique (Grossissement x 40) (Kormanik et McGraw, 1982) des points d'infection mycorhizienne a été effectuée sur au moins 100 fragments de racines fines de 1cm de long étalés entre lame et lamelle pour chaque système racinaire.

L'infection mycorhizienne se traduit par la présence des vésicules et/ou des hyphes mycéliens de champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules colorés en bleu dans le cytoplasme des cellules racinaires. Le fragment de racine est dit mycorhizé quand il montre un signe d'infection par les hyphes de champignons mycorhiziens. Le taux de mycorhization qui est exprimé par le

pourcentage de racines mycorhizées par plante est ainsi calculé selon la formule de Marx *et al.* (1977) suivante :

$$TM = \frac{\text{Nombre de fragments des racines}}{\text{Nombre total de fragments des racines observées}} \times 100$$

#### **III.4. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur l'activité microbienne globale du sol de culture**

Certaines activités enzymatiques d'origine microbienne peuvent être déterminées quantitativement à partir des échantillons du sol (Burns, 1982). La mesure de ces activités enzymatiques s'applique dans la plupart des cas sur des sols séchés à l'air libre pendant 24h.

La méthode consistant à suivre l'hydrolyse de la FDA (3', 6'-diacétylfluorescéine), qui est hydrolysée en fluorescéine par les enzymes d'origine microbienne, permettra d'évaluer l'activité microbienne globale du sol (Schnurer et Rosswall, 1982) en suivant la méthode décrite par Alef (1998). Tous les champignons, la plupart des bactéries, quelques protozoaires et algues participent à cette activité (Nicolardot *et al.*, 2010).

##### **III.4.1. Préparation de la solution tampon de potassium phosphate**

Une quantité de 8,7g de  $K_2HPO_4$  avec 1,3g de  $KH_2PO_4$  a été dissoute dans 800ml d'eau distillée stérile. Le pH a été ajusté à 7,6 avec du NaOH. La solution a été complétée à 1l avec de l'eau distillée stérile, puis stockée dans le réfrigérateur à +4°C.

##### **III.4.2. Préparation du substrat : la fluorescéine diacétate (FDA)**

Le substrat de la réaction d'hydrolyse est composé d'une solution de 1mg/ ml de FDA préparée avec l'acétone. Cinquante-cinq milligrammes de FDA en poudre ont été dissous dans 55ml d'acétone (acétone 100%). Après agitation, le mélange a été conservé à -20°C à l'obscurité (pour éviter que le mélange soit en contact de la lumière, le flacon a été recouvert par un papier aluminium).

### **III.4.3. Mesure de l'activité microbienne globale du sol**

Quatre échantillons de 1g du sol préalablement tamisé à 2mm de maille ont été utilisés dont le premier sert de témoin enzyme (TE) et les trois autres constituent les essais (E) de l'échantillon de manière à obtenir trois répétitions pour chaque type de sol. Le témoin substrat (TS) ne contient pas de sol. La quantité de ces échantillons peut varier selon la nature du sol et les matériels utilisés.

Quinze millilitres de solution tampon phosphate (pH = 7,6) ont été versés dans chaque tube et la réaction d'hydrolyse a été démarrée par l'ajout de 200µl de substrat (solution de FDA) dans les trois tubes d'essai et dans le témoin substrat tandis que le témoin enzyme reçoit 200µl de l'eau distillée stérile. Après une incubation durant 1h à une température de 30°C et sous agitation, 500 µl de la solution ont été prélevés et mélangés avec 500µl d'acétone dans un Eppendorf pour arrêter la réaction. Les solutions obtenues ont été ensuite centrifugées pendant 5min à 1000 tours/min, puis 1 ml du surnageant a été prélevé pour la lecture de la densité optique des échantillons sous la lumière ultraviolette à 490 nm. La mise à zéro de la valeur au niveau du spectrophotomètre est effectuée avec une solution standard à 0 µl/ml de fluorescéine. La lecture de la densité optique des échantillons va dans le sens témoin substrat, témoin enzyme et les trois essais de l'échantillon.

### **III.4.4. Calcul du produit d'hydrolyse**

Le produit de l'hydrolyse est constitué par la fluorescéine. La détermination de la quantité de ce produit nécessite l'étalonnage d'une solution standard de fluorescéine. Comme chaque valeur de DO de cette solution standard correspond à une valeur exacte de quantité de fluorescéine, l'équation de la courbe de tendance des valeurs de cette gamme étalon permet de calculer les valeurs exactes des produits d'hydrolyse dans chaque échantillon. Le produit d'hydrolyse est exprimé en µg de fluorescéine libéré par g de sol sec et par heure.

### **III.4.5. Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est établie à l'aide d'une solution standard de fluorescéine préparée préalablement à partir de fluorescéine en poudre (F7505 SIGMA) et d'acétone à une concentration de 1 mg/ml. La dilution étant effectuée à l'aide de l'acétone pour les autres concentrations. Les tubes contenant les mélanges doivent être bien bouchés avant de les agiter, puis la lecture de leur densité optique s'effectue au spectrophotomètre à la longueur d'onde 490nm.



### **III.5. Evaluation de l'effet de l'inoculation sur l'activité des enzymes phosphatasiques du sol de culture**

D'après Nannipieri *et al.* (1978), les phosphatases sont sensibles à la présence de phosphore étant donné que la synthèse de l'enzyme est inhibée par la forte concentration d'ions orthophosphates présents dans le sol. Ces ions minéraux  $\text{PO}_4^{3-}$  sont la seule forme de P assimilée par les plantes (Rao *et al.*, 1998) et sont libérés dans le sol grâce à l'intervention des phosphatases (Cade-Menun *et al.*, 2002). Ces enzymes sont pour la plupart d'origine microbienne. L'activité des phosphatases acides est mesurée par la méthode modifiée par Tabatabai et Bremner (1969).

#### **III.5.1. Préparation du tampon Mc Ilvain (citrate phosphate buffer)**

Le tampon Mc Ilvain est constitué d'une solution A et d'une solution B contenant respectivement 19,21g d'acide citrique dans 1000ml d'eau déminéralisée et 53,65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 71,7g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dans 1000ml d'eau déminéralisée. Le pH du tampon Mc Ilvain varie selon les quantités de la solution A et de B. Pour 50ml de tampon Mc Ilvain à pH=7 par exemple, on additionne 6,5ml de la solution A avec 43,6ml de la solution B. Cette solution à pH=7 est communément appelée « solution stock ».

Pour les deux types d'hydrolyse du phosphate faisant intervenir deux enzymes différentes à savoir la phosphatase active en milieu acide et la phosphatase active en milieu alcaline, le pH du tampon joue un rôle important. La valeur de ce pH est égale à 6 pour l'hydrolyse du phosphate en milieu acide et cette valeur du pH est de 11 pour l'hydrolyse du phosphate en milieu alcalin. Ainsi et pour chaque réaction, une solution tampon contenant 200ml de solution stock et 500ml d'eau déminéralisée est préalablement préparée. Chaque solution tampon est par la suite complétée à 1litre avec de l'eau distillée et le pH est ajusté avec du HCl pour l'hydrolyse en milieu acide et avec du NaOH pour l'hydrolyse en milieu alcalin.

#### **III.5.2. Préparation du substrat et des réactifs**

Une solution de para-Nitrophénylphosphate (ou p-NPP) à 5mM a été utilisée comme substrat de la réaction d'hydrolyse. Cette solution a été préparée à partir du produit en pastille de p-NPP (Réf. 104-0 Sigma Phosphatae Substrate). Ainsi et pour 10ml de cette solution de p-NPP à 5mM, 100mg de ce p-NPP en pastille ont été dissous dans 10ml d'eau déminéralisée. La solution ainsi préparée est conservée à l'obscurité (flacon fumé ou tube enveloppé dans du papier aluminium) et sous

congélation à -20°C. Sans congélation, la solution est utilisable seulement pendant environ 24h après sa préparation.

Outre le substrat, deux autres réactifs ont été également utilisés à savoir la solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,5M et la solution de NaOH à 0,5M. Ces deux solutions sont préparées respectivement en dissolvant 73,5g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans 1l d'eau déminéralisée et 20g de soude (NaOH) dans 1l d'eau déminéralisée. Les deux solutions sont conservables pendant plusieurs jours à la température ambiante du laboratoire.

### **III.5.3. Dosage du produit d'hydrolyse**

Deux témoins à savoir le témoin substrat (TS) et témoin enzyme (TE) ainsi que trois essais (E1, E2, E3), ont été préparés. Le témoin enzyme, témoin sans substrat, contient 0,1g de sol, 400  $\mu\text{l}$  de tampon universel modifié (Skujins *et al.*, 1962) de pH égal à 6 et 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Pour les trois essais (E1, E2, E3), les 100 $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  sont remplacés par 100 $\mu\text{l}$  de p-NPP. Le même contenu est utilisé pour le témoin substrat sauf qu'il ne contient pas de sol. Les solutions dans chaque tube ont été bien mélangées en agitant doucement à l'aide du vortex et puis incubées pendant une heure dans une étuve réglée à 37°C toujours sous agitation. En sortant les tubes de l'étuve, la réaction d'hydrolyse a été arrêtée en ajoutant dans un premier temps 100 $\mu\text{l}$  de la solution  $\text{CaCl}_2$  dans chaque tube suivi d'une agitation pour complexer la réaction et puis 400 $\mu\text{l}$  de NaOH.

La lecture de la densité optique se fait à la longueur d'onde 400nm en prenant comme référence un témoin blanc  $\text{H}_2\text{O}$ . La lecture a été toujours effectuée en commençant par les témoins puis suivie par les essais. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de p-Nitrophenol libéré par g de sol sec et par heure.

## **IV. Analyses statistiques**

Les données obtenues à la suite des différentes analyses ont été soumises à une analyse statistique à l'aide du logiciel XLSTAT.

Afin de comparer les traitements utilisés lors de cette étude, les moyennes de chaque traitement ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) et puis le test de Newman-keuls a été utilisé pour chercher les différences significatives entre les moyennes de chaque variable.

Pour analyser globalement les données obtenues dans les différents traitements effectués, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à l'aide de logiciel XLSTAT. L'ACP permet de visualiser et d'analyser les corrélations entre les paramètres évalués.

# RESULTATS

---

## RESULTATS

### **I. Effets de l'inoculation bactérienne sur le développement des plants de haricot vert**

Les effets de l'inoculation sur les plants de haricot vert ont été évalués au niveau des paramètres suivants: la hauteur et le poids sec de la biomasse aérienne; le poids sec de la biomasse racinaire; le nombre et le poids sec des nodules.

#### **I.1. Hauteur de la biomasse aérienne**

Par rapport à la parcelle témoin (la parcelle 1: pas d'apport) qui n'a reçu aucun traitement, les hauteurs de la partie aérienne des traitements 2, 3, 5, 10, 12, 13, 15 ont des différences significatives, leurs tailles sont supérieures à 39,5cm. Parmi les parcelles non inoculées, la hauteur du traitement 3 (compost + azote) enregistre la plus haute valeur qui est égale à 46,5 cm. Tandis que parmi les parcelles inoculées, le traitement 10 (compost + inoculation) a été le plus favorable pour le développement de la biomasse aérienne: 45,3 cm. La hauteur des plants du témoin (sans apport) mesure en moyenne 22,95 cm.

#### **I.2. Poids sec de la biomasse aérienne**

Le poids sec de la biomasse aérienne du traitement 5 (compost + phosphore + azote) de 38,24g présente une différence hautement significative comparé à celui du témoin, 12,92g. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre le poids sec de la biomasse aérienne des traitements inoculés et celui du témoin. La biomasse du traitement 12 (compost + phosphore + inoculation) a le poids le plus élevé (34,92g) parmi les traitements inoculés.

#### **I.3. Poids sec de la biomasse racinaire**

Dans le cas du poids sec de la biomasse racinaire, une différence significative par rapport au témoin a été remarquée pour les traitements 3 et 5 (compost + azote et compost + phosphore + azote). Les biomasses racinaires de ces deux traitements ont été respectivement de 3,95g et 5,08g. Par contre, aucun effet significatif de l'inoculation n'a été observé sur la biomasse racinaire par rapport à celle observée sur le témoin pour les autres traitements. La biomasse racinaire la plus développée parmi les traitements inoculés a été observée au niveau de la parcelle 12 (compost + phosphore + inoculation).

Les résultats obtenus pour les trois paramètres ci-dessus sont résumés dans le tableau ci-après :

**Tableau 3:** Hauteur et poids de la biomasse aérienne et poids de la biomasse racinaire des traitements non inoculés

Traitements	H de BA (cm)	P de BA (g)	P de BR (g)
1	22,95 (b)	12,92485 (b)	1,735975 (b)
2	46,25 (a)	19,782475 (b)	2,022525 (b)
3	46,5 (a)	31,691725 (b)	3,950425 (a)
4	39,175 (b)	31,8918 (b)	3,423925 (b)
5	41,5 (a)	38,239475 (a)	5,075875 (a)
6	34,125 (b)	20,285325 (b)	2,86215 (b)
7	30,95 (b)	24,05415 (b)	2,377125 (b)
8	30,125(b)	25,72975 (b)	3,7543 (b)

**Tableau 4:** Hauteur et poids de la biomasse aérienne et poids de la biomasse racinaire des traitements inoculés

Traitements	H de BA (cm)	P de BA (g)	P de BR (g)
9	39,05 (b)	16,837975 (b)	1,519175 (b)
10	45,3 (a)	22,6484 (b)	2,020275 (b)
11	36,125 (b)	22,7552 (b)	2,50765 (b)
12	39,625 (a)	34,9212 (b)	3,63425 (b)
13	41,875 (a)	27,9248 (b)	2,92305 (b)
14	39,5 (b)	22,99005 (b)	2,17395 (b)
15	40,25 (a)	19,1649 (b)	1,924975 (b)
16	37,25 (b)	23,233225 (b)	2,63325 (b)

Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions. Les données suivies de la même lettre (a et b) constituent le même groupe au seuil de probabilité 0,05 selon le test de Newman-keuls.

**H:** hauteur; **P:** poids secs; **BA:** biomasse aérienne; **BR:** biomasse racinaire

**1:** pas d'apport; **2:** compost; **3:** compost + azote; **4:** compost + phosphore; **5:** compost + phosphore + azote; **6:** azote; **7:** phosphore; **8:** azote + phosphore; **9:** pas d'apport + inoculation; **10:** compost + inoculation; **11:** compost + azote + inoculation; **12:** compost + phosphore + inoculation; **13:** compost + phosphore + azote + inoculation; **14:** azote + inoculation; **15:** phosphore + inoculation; **16:** azote + phosphore + inoculation.

## **II. Influence des bactéries fixatrices d'azote sur la nodulation des plants de haricot vert nain**

Le terme nodulation fait référence au nombre et au poids sec de nodules observés au niveau des systèmes racinaires des plantes. Le nombre, l'efficacité, l'infectivité et la compétitivité des bactéries fixatrices d'azote pourraient influencer cette nodulation au niveau du système racinaire du plant de haricot vert nain.

### **II.1. Taux de nodulation**

Une différence hautement significative a été décelée sur les traitements 10 et 13 (compost + inoculation et compost + phosphore + azote + inoculation) comparés au témoin qui n'a subi aucun traitement. Le plus fort taux de nodulation a été obtenu dans la parcelle 10 (compost + inoculation), équivaut en moyenne à 223 nodules/ plante. Par contre, le traitement sur la parcelle 7 (phosphore) a engendré le taux de nodulation le plus faible avec 45 nodules par plante. Pour les traitements non inoculés, le taux de nodulation de la parcelle 4 (compost + phosphore) est le plus élevé avec en moyenne 114 nodules par plante.

### **II.2. Poids sec des nodules**

Le poids sec des nodules de tous les traitements ne présente pas de différence significative par rapport à celui de la parcelle témoin, que ce soient les inoculés ou les non inoculés. Cependant, le système racinaire du traitement 12 (compost + phosphore + inoculation) et celui du traitement 6 (azote) tiennent les valeurs extrêmes du poids sec de nodules avec respectivement 0,18g et 0,028g. Pour les traitements non inoculés, le poids sec de nodules de plant de haricot de la parcelle 4 (compost + phosphore) est le plus élevé, 0,15g.

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la nodulation des plants de haricot vert nain observée selon les traitements.

**Tableau 5:** Taux de nodulation et poids sec de nodules dans chaque parcelle non inoculée

Traitements	Taux de nod (nombre de nod/plante)	Pds de nodules (g)
1	69,75 (b)	0,068325 (b)
2	107,5 (b)	0,05775 (b)
3	90 (b)	0,086275 (b)
4	114,5 (b)	0,154675 (b)
5	68,75 (b)	0,051325 (b)
6	66,25 (b)	0,0285 (b)
7	45,25 (b)	0,0302 (b)
8	50,25 (b)	0,04155 (b)

**Tableau 6:** Taux de nodulation et poids sec de nodules dans chaque parcelle inoculée

Traitements	Taux de nod (nombre de nod/plante)	Pds de nodules (g)
9	141,25 (b)	0,17175 (b)
10	223,5 (b)	0,1572 (b)
11	136 (b)	0,0888 (b)
12	134,75 (b)	0,176675 (b)
13	172 (a)	0,15205 (b)
14	158,5 (b)	0,15035 (b)
15	68,75 (b)	0,134225 (b)
16	81,75 (b)	0,0708 (b)

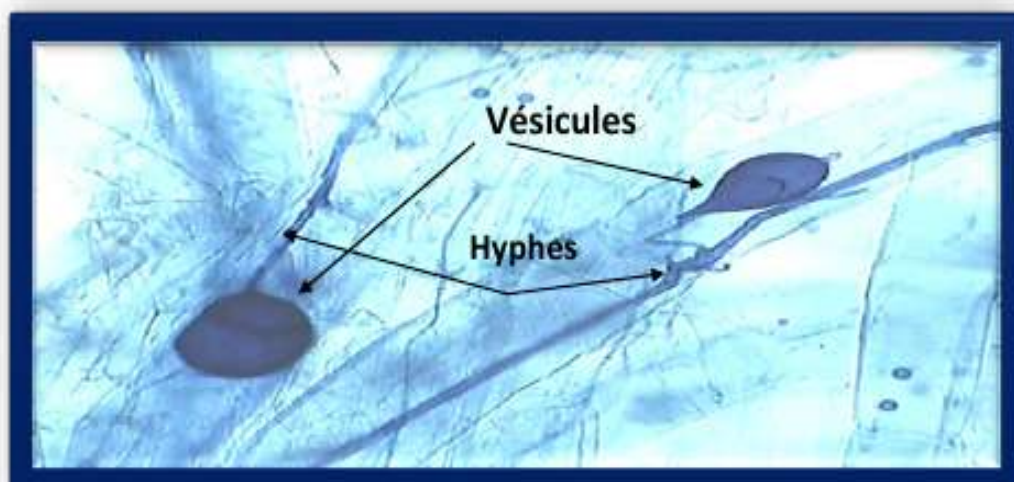
Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions. Les données suivies de la même lettre (a et b) constituent le même groupe au seuil de probabilité 0,05 selon le test de Newman-keuls.

**Pds**: poids sec; **nod**: nodulation

**1**: pas d'apport; **2**: compost; **3**: compost + azote; **4**: compost + phosphore; **5**: compost + phosphore + azote; **6**: azote; **7**: phosphore; **8**: azote + phosphore; **9**: pas d'apport + inoculation; **10**: compost + inoculation; **11**: compost + azote + inoculation; **12**: compost + phosphore + inoculation; **13**: compost + phosphore + azote + inoculation; **14**: azote + inoculation; **15**: phosphore + inoculation; **16**: azote + phosphore + inoculation.

### III. Effet de l'inoculation sur le taux d'endomycorhization de racines de plants de haricot vert nain

Le taux de mycorhization reflète le pourcentage de surface racinaire colonisée par les symbiotes fongiques, c'est-à-dire contenant des hyphes mycéliens et des vésicules.



**Figure 4:** Aspect des vésicules chez *Phaseolus vulgaris* (Amrani, 2009).

Les traitements 9, 10, 12, 15, 16 (Inoculation; compost + inoculation; compost + phosphore + inoculation; phosphore + inoculation; azote + phosphore + inoculation) ont un taux de mycorhization significativement faible par rapport au témoin (pas d'apport). Ce dernier présente le taux de mycorhization le plus élevé (88,75%) et celui du traitement 9 (inoculation) le plus faible 46,25%.

Le tableau ci-après présente les taux de mycorhization des racines de plants de haricot pour chaque traitement.



**Tableau 7:** Taux de mycorhization des plantes des traitements non inoculés

Traitements	Taux de mycorhization (%)
1	88,750 (a)
2	71,250 (a)
3	78,750 (a)
4	71,250 (a)
5	71,250 (a)
6	67,500 (a)
7	77,500 (a)
8	58,750 (a)

**Tableau 8:** Taux de mycorhization des plantes des traitements inoculés

Traitements	Taux de mycorhization (%)
9	46,250 (b)
10	48,750 (b)
11	58,750 (a)
12	55,000 (b)
13	70,000 (a)
14	62,500 (a)
15	50,000 (b)
16	45,000 (b)

Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions. Les données suivies de la même lettre (a et b) constituent le même groupe au seuil de probabilité 0,05 selon le test de Newman-keuls.

**1:** pas d'apport; **2:** compost; **3:** compost + azote; **4:** compost + phosphore; **5:** compost + phosphore + azote; **6:** azote; **7:** phosphore; **8:** azote + phosphore; **9:** pas d'apport + inoculation; **10:** compost + inoculation; **11:** compost + azote + inoculation; **12:** compost + phosphore + inoculation; **13:** compost + phosphore + azote + inoculation; **14:** azote + inoculation; **15:** phosphore + inoculation; **16:** azote + phosphore + inoculation.

#### **IV. Influence de l'inoculation sur le fonctionnement microbien du sol**

##### **IV.1. Activité microbienne globale du sol**

La quantité du produit d'hydrolyse de la FDA par unité de temps qui est la fluorescéine exprime l'activité microbienne globale du sol. Comparées à celle enregistrée de la parcelle témoin (pas d'apport), les quantités de fluorescéine produites des autres parcelles sont significativement élevées, exceptées celles des parcelles 2, 3 et 4 (compost; compost + azote; compost + phosphore). Cette quantité de fluorescéine a atteint sa valeur la plus élevée (42,96  $\mu\text{g/h/g}$  de sol) dans la parcelle 11 (compost + azote + inoculation). Quant aux parcelles non inoculées, la parcelle 8 (azote + phosphore) a présenté une activité microbienne globale la plus élevée (quantité de fluorescéine = 39,55  $\mu\text{g/h/g}$  de sol).

##### **IV.2. Activité phosphatasique du sol**

L'activité phosphatasique d'origine microbienne du sol est mesurée par la quantité du produit de l'hydrolyse de la p-NPP qui est le p-Nitrophenol. Par rapport à celle du témoin (quantité de p-Nitrophenol = 101,32  $\mu\text{g/h/g}$  de sol), les parcelles 5, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16 (compost + phosphore + azote; phosphore; compost + inoculation; compost + azote + inoculation; compost + phosphore + inoculation; azote + inoculation; phosphore + inoculation; azote + phosphore + inoculation) présentent une activité phosphatasique significativement élevée. La quantité de p-Nitrophenol produite dans la parcelle 10 (compost + inoculation) est la plus élevée (298,49  $\mu\text{g/h/g}$  de sol) pour les parcelles inoculées. Chez les parcelles non inoculées, la parcelle 5 (compost + phosphore + azote) a produit la quantité de p-Nitrophenol la plus élevée avec 209,42  $\mu\text{g/h/g}$  de sol.

Les quantités de fluorescéine et de p-Nitrophenol obtenues après l'analyse enzymatique des sols de chaque traitement sont exprimées dans le tableau suivant.

**Tableau 9:** Quantités de fluorescéine et p-Nitrophénol obtenues chez les parcelles non inoculées

Traitements	Q de p-Nitrophenol en µg/h/g de sol	Q de fluorescéine en µg/h/g de sol
1	101,329 (b)	17,179 (b)
2	159,167 (b)	24,266 (b)
3	135,893 (b)	24,512 (b)
4	123,254 (b)	22,118 (b)
5	209,464 (a)	33,201 (a)
6	144,087 (b)	29,337 (a)
7	205,317 (a)	33,804 (a)
8	132,738 (b)	39,553 (a)

**Tableau 10:** Quantités de fluorescéine et p-Nitrophénol obtenues chez les parcelles inoculées

Traitements	Q de p-Nitrophénol en µg/h/g de sol	Q de fluorescéine en µg/h/g de sol
9	145,754 (b)	32,994 (a)
10	298,492 (a)	31,241 (a)
11	278,869 (a)	42,965 (a)
12	210,119 (a)	38,573 (a)
13	174,980 (b)	36,311 (a)
14	265,774 (a)	37,197 (a)
15	192,917 (a)	38,988 (a)
16	284,742 (a)	39,666 (a)

Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions. Les données suivies de la même lettre (a et b) constituent le même groupe au seuil de probabilité 0,05 selon le test de Newman-keuls.

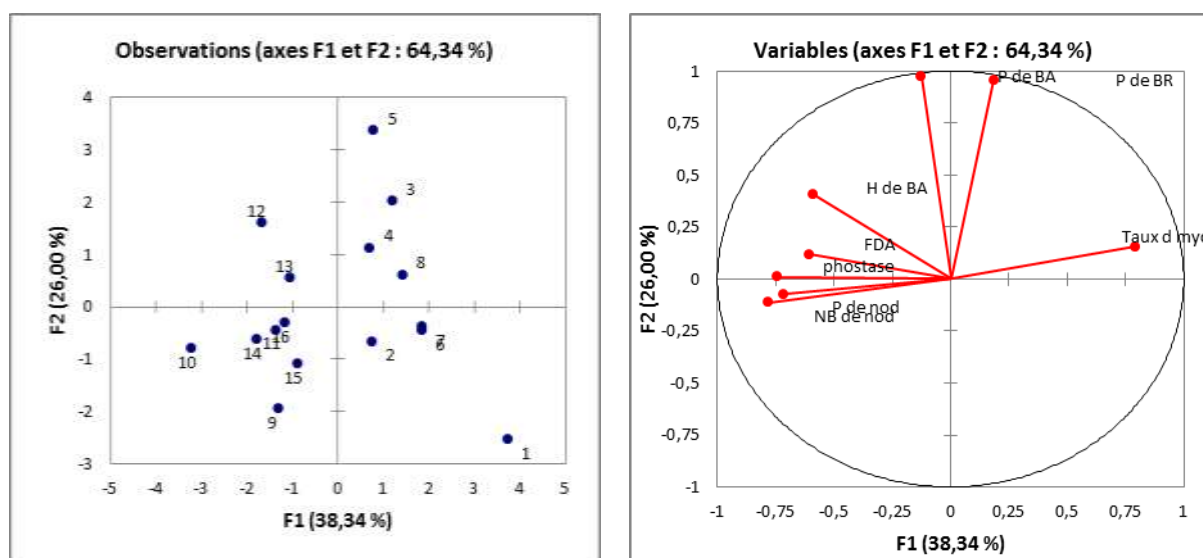
**Q:** quantité; **µg:** microgramme; **h:** heure; **g:** gramme.

**µg/h/g de sol:** microgramme de fluorescéine ou de p-Nitrophénol par heure par gramme de sol.

**1:** pas d'apport; **2:** compost; **3:** compost + azote; **4:** compost + phosphore; **5:** compost + phosphore + azote; **6:** azote; **7:** phosphore; **8:** azote + phosphore; **9:** pas d'apport + inoculation; **10:** compost + inoculation; **11:** compost + azote + inoculation; **12:** compost + phosphore + inoculation; **13:** compost + phosphore + azote + inoculation; **14:** azote + inoculation; **15:** phosphore + inoculation ; **16:** azote + phosphore + inoculation.

### V. Analyse en composantes principales des variables étudiées: Relation entre développement des plantes, nodulation des systèmes racinaires, taux de mycorhization, activité microbienne globale du sol et activité phosphatasique

L'Analyse en Composante Principale des résultats obtenus permettra de voir les corrélations entre les variables étudiées et les traitements effectués au niveau des parcelles. Les figures ci-après représentent la projection sur le plan factoriel (F1 et F2) des données des 8 variables étudiées (hauteur et poids sec de la biomasse aérienne, poids sec de la biomasse racinaire, la nodulation, le taux de mycorhization, la FDA et la phosphatase acide) de plants de haricot vert nain.



**Figure 5 et 6 :** Relations entre développement de plants de haricot, nodulation, taux de mycorhization et activités enzymatiques.

**1:** pas d'apport; **2:** compost; **3:** compost + azote; **4:** compost + phosphore; **5:** compost + phosphore + azote; **6:** azote; **7:** phosphore; **8:** azote + phosphore; **9:** pas d'apport + inoculation; **10:** compost +

inoculation; **11**: compost + azote + inoculation; **12**: compost + phosphore + inoculation; **13**: compost + phosphore + azote + inoculation; **14**: azote + inoculation; **15**: phosphore + inoculation; **16**: azote + phosphore + inoculation.

**P de nod**: poids sec de nodules; **Nb de nod**: nombre de nodules ; **H de BA**: hauteur de la biomasse aérienne; **P de BA**: poids de la biomasse aérienne; **P de BR**: poids de la biomasse racinaire; **Taux de myc**: taux de mycorhization; **FDA**: activité microbienne globale; **phostase**: activité phosphatasique du sol.

Les axes factoriels F1xF2 absorbent 64,34% de l'inertie totale. Suivant l'axe factoriel F1 (38,34%), le nombre et le poids sec de nodules s'opposent du reste des variables (hauteur de la biomasse aérienne, poids de la biomasse aérienne, activité microbienne globale, activité phosphatasique du sol, le poids de la biomasse racinaire et le taux de mycorhization). Tandis que suivant l'axe F2, le poids de la biomasse racinaire et le taux de mycorhization sont à l'opposé des autres variables (poids sec de nodules, nombre de nodules, hauteur de la biomasse aérienne, poids de la biomasse aérienne, activité microbienne globale, activité phosphatasique du sol).

Sur la carte des observations, l'axe F1 regroupe dans la partie des ordonnées positives les traitements appliqués dans les parcelles 3, 4, 5, 8, 12, 13 et dans la partie des ordonnées négatives, les traitements des parcelles 1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 16. Par contre l'axe F2 regroupe dans la partie de l'abscisse positive les parcelles qui n'ont subi aucune inoculation (parcelles 1 à 8) et dans la partie de l'abscisse négative les parcelles qui ont subi une inoculation (parcelles 9 à 16).

Suivant la carte des observations et la carte qui projette les variables, les traitements appliqués aux parcelles 1, 2, 6, 7 (pas d'apport; compost; azote; phosphore) n'ont pas d'interaction avec les paramètres liés au développement des plantes. Ceux des parcelles 3, 4, 5, 8 (compost + azote; compost + phosphore; compost + phosphore + azote; azote + phosphore) sont, par contre, liés au taux de mycorhization ainsi qu'au développement de la biomasse racinaire. Les traitements des parcelles 12 et 13 (compost + phosphore + inoculation; compost + phosphore + azote + inoculation) ont eu un effet favorable sur le développement de la biomasse aérienne, l'activité microbienne globale du sol et sur l'activité phosphatasique du sol. Les traitements appliqués 9, 10, 11, 14, 15, 16 (inoculation ; compost+ inoculation ; compost + azote + inoculation ; azote + inoculation ; phosphore + inoculation + azote + phosphore + inoculation) favorisent particulièrement la formation des nodules.

Le tableau ci-après qui représente la matrice de corrélation entre les différents paramètres montre que la hauteur de la biomasse aérienne et le poids de nodules sont positivement corrélés avec le nombre des nodules, le poids de la biomasse aérienne et le poids de la biomasse racinaire. Ce tableau montre également une forte liaison entre la phosphatase acide et la FDA. En revanche, la hauteur de la biomasse aérienne, le nombre et le poids de nodules, la phosphatase acide et l'activité microbienne globale sont négativement corrélés avec le taux de mycorhization. De même pour la phosphatase acide, le nombre et le poids de nodules sont négativement corrélés avec le poids de la biomasse racinaire.

**Tableau 11:** Matrice de corrélation entre les différents paramètres évalués

Variables	H de BA	P de BA	P de BR	NB de nod	P de nod	Taux d myc	phostase	FDA
<b>H de BA</b>	1	0,410	0,175	0,527	0,424	-0,292	0,293	0,065
<b>P de BA</b>	0,410	1	0,898	0,021	0,106	0,087	0,088	0,158
<b>P de BR</b>	0,175	0,898	1	-0,277	-0,226	0,223	-0,121	0,072
<b>NB de nod</b>	0,527	0,021	-0,277	1	0,759	-0,368	0,465	0,117
<b>P de nod</b>	0,424	0,106	-0,226	0,759	1	-0,445	0,192	0,138
<b>Taux d myc</b>	-0,292	0,087	0,223	-0,368	-0,445	1	-0,561	-0,683
<b>phostase</b>	0,293	0,088	-0,121	0,465	0,192	-0,561	1	0,634
<b>FDA</b>	0,065	0,158	0,072	0,117	0,138	-0,683	0,634	1

**P de nod:** poids sec de nodule ; **Nb de nod:** nombre de nodules; **H de BA:** hauteur de la biomasse aérienne; **P de BA:** poids de la biomasse aérienne; **P de BR:** Poids de la biomasse racinaire; **Taux de myc:** Taux de mycorhization; **FDA:** Activité microbienne globale; **phostase:** Activité phosphatasique du sol.

# DISCUSSION

## DISCUSSION

L'inoculation de légumineuses avec des souches de *Rhizobium* peut être considérée comme une technique de référence en matière de microbiologie appliquée à l'agriculture (Germon, 2013). Dans ce travail, l'inoculation a été faite sur les graines de haricot vert nain dont le but a été de décrire le fonctionnement des communautés microbiennes du sol de culture de haricot vert et d'évaluer l'influence de l'inoculation et ses interactions avec différents types d'amendement sur le développement des plantes. Par ailleurs, différents traitements ont été utilisés dont les 8 derniers comprenaient une inoculation.

### I. Impacts de l'inoculation sur la croissance de la plante

Le développement de la plante a été mesuré au niveau de la hauteur et du poids sec de la partie aérienne et racinaire. Nos résultats ont montré que l'inoculation couplée avec l'utilisation du compost a stimulé de manière significative le développement des plantes. Ils ont également montré que l'utilisation d'une petite quantité de phosphore comme amendement a permis de stimuler à la fois la nodulation et le développement des plantes. Ces résultats corroborent avec ceux d'autres auteurs qui ont déjà montré que la combinaison d'une dose suffisante de phosphore avec l'inoculation de *Rhizobium* permet d'accroître le rendement en graines des légumineuses à plus de 50% par rapport au témoin non inoculé et sans fertilisation (Tahir *et al.*, 2009 ; Hakoomat *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2012).

L'association du compost avec de l'azote a également amélioré le développement des plantes. Par contre, ce développement est moins stimulé dès qu'on remplace l'azote avec l'inoculation. Ces résultats suggèrent que l'azote intégré directement dans l'amendement est plus facile à utiliser par la plante et présente un effet significatif précoce sur son développement. Par contre, l'inoculation permettra d'assurer un bon développement des plantes tout au long du cycle de culture. Sur ce dernier point, nos résultats confirment ceux obtenus par Hussain *et al.* en 2012 sur la culture et l'inoculation de *Vigna radiata*. Il est donc important de savoir la quantité d'azote disponible au niveau du sol avant de choisir la méthode de culture adéquate. Les fertilisants azotés sont largement utilisés en agriculture particulièrement pour la culture des légumineuses (Pascault, 2010). L'absorption d'azote du sol est indispensable aux légumineuses pour assurer une croissance optimale au début de cycle. Sa disponibilité favorise le démarrage de la croissance. (Carroue *et al.*,



1999). Ainsi, l'utilisation d'une petite quantité d'azote permettra de démarrer précocement la stimulation du développement des plantes qui sera par la suite reprise par l'action des microorganismes symbiotiques.

## II. Effet de l'inoculation sur la nodulation

Parmi les traitements non inoculés, celui du traitement 4 (compost + phosphore) a favorisé la nodulation, c'est-à-dire, le nombre et le poids sec des nodules. Ce phénomène de nodulation a été plus accentué pour les plantes inoculées. Généralement, la nodulation a été toujours plus stimulée avec le compost. Nos résultats ont montré également que la présence du phosphore a un effet positif sur la nodulation. Sur ce point, Graham et Rosas (1984) ont déjà mentionné que la formation des nodules est très sensible à la concentration en phosphore. Beaucoup de travaux indiquent également que l'efficacité du phosphore réside dans sa capacité à augmenter la nodulation (Giller *et al.*, 1995).

Sous un autre aspect de la nodulation, Paré (1984) a démontré que l'introduction d'une souche de *Rhizobium* est considérée comme efficiente si les nodules obtenus sont peu nombreux et de taille importante. Cela suggère qu'en présence d'une quantité suffisante de phosphore, la faculté de *Rhizobium* à noduler le système racinaire des plants de haricot vert augmente. Il a été déjà démontré que l'application du phosphore dans un sol pauvre augmente jusqu'à quatre fois la masse nodulaire sèche (Drevon & Hartwig, 1997; Olivera *et al.*, 2004). Montange et SaintMacary (1989) précisent que le poids de nodules d'une plante est étroitement corrélé à son activité fixatrice d'azote et le nombre des nodules fournit une indication sur les conditions de l'infection des racines par *Rhizobium*. Dans ce sens, nos résultats ont montré que plus la taille et le nombre des nodules augmentent, plus le développement des plantes est stimulé.

## III. L'influence de l'inoculation de *Rhizobium* sur les champignons mycorhiziens.

D'après nos résultats, aucun effet positif de l'inoculation de *Rhizobium* sur l'endomycorhization des plantes de haricot vert n'a été observé. Le développement des champignons endomycorhiziens sur le système racinaire des plantes a été plus remarqué au niveau des parcelles témoins. Pourtant, certains auteurs ont déjà illustré des interactions positives entre les bactéries du groupe de *Rhizobium* et des champignons endomycorhiziens que ce soit pour stimuler le développement de la plante (Maya *et al.*, 2012; Bethlenfalvay *et al.*, 1985) ou que ce soit pour sa protection contre certaines maladies (Van de Staaij *et al.*, 1999; Sankaranarayanan et Sandarabab, 1998). Pour notre

cas, la plupart des traitements utilisent des amendements. Ce qui pourra inhiber l'infection des racines par les champignons endomycorhiziens. Selon Strullu (1991), la symbiose mycorhizienne s'établit et se développe lorsque les nutriments accessibles aux racines des plantes sont épuisés. De plus, Smith et Read (2008) ont précisé que dans la symbiose mycorhizienne, la plante fournit au champignon du carbone et en retour le champignon fournit à la plante de l'eau et des éléments minéraux, notamment le phosphore. Nos résultats suggèrent donc que l'interaction entre amendement et microorganismes symbiotiques a été positif pour *Rhizobium* mais a provoqué un effet inhibiteur pour les champignons endomycorhiziens. Le principal facteur limitant la mycorhization est la forte disponibilité du phosphore soluble dans le sol qui conduit la plante à se passer du champignon, entraînant ainsi la réduction du taux de mycorhization (Alvarez *et al.*, 2002).

#### **IV. L'influence de l'inoculation sur le fonctionnement microbien du sol**

L'activité microbienne globale du sol a été plus stimulée au niveau des parcelles amendées avec de l'azote et du phosphore pour les parcelles non inoculées. Cette activité a été encore plus stimulée quand on a inoculé les plantes en plus de l'ajout des deux éléments. Dans ce sens, Gaskell *et al.* (2007) ont montré que la matière organique décomposée constitue une source substantielle de nutriments dans le sol, ce qui conduit à la stimulation de l'activité des microorganismes. Ceci explique l'augmentation de l'activité microbienne globale après le remplacement du phosphore par le compost.

Quant à l'activité phosphatasique du sol, nos résultats ont montré que la présence de compost comme amendement et l'inoculation augmente l'activité des microorganismes produisant ces enzymes. Par contre, il est démontré par ces mêmes résultats que l'inoculation a été le facteur déterminant l'augmentation de l'activité de ces microorganismes. Ce qui fait que le compost et l'inoculation constituent les deux éléments régissant l'activité de ces microorganismes dans nos expérimentations. D'après les travaux effectués par Sandoval-Pérez (2009), les phosphatases acides ont été identifiées comme étant un indicateur potentiel de la fertilité des sols. Ils ont aussi précisé que l'activité catalytique des phosphatases est généralement plus élevée dans les sols les plus fertiles. De plus, Chaussod (1996) affirme que les phosphatases contribuent à la fertilisation des sols.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a été menée dans le but de rehausser le fonctionnement des microorganismes présents dans le sol de culture de haricot et d'améliorer la croissance des plants de haricot vert. Ainsi, nous avons pu constater que l'inoculation a généralement donné des résultats positifs excepté le cas de la symbiose mycorhizienne. Elle a apporté une amélioration sur la nodulation et sur l'activité des microflore telluriques en général. Toutefois, l'efficacité de l'inoculation repose surtout sur son association avec d'autres fertilisants tels que l'azote, le phosphore et surtout le compost ou bien nécessite des quantités infimes de ces éléments pour bien démarrer le développement des plantes et le fonctionnement des symbioses.

Le traitement 10 constitué de compost et d'inoculation a favorisé le nombre des nodules des plants. L'ajout du phosphore au compost et à l'inoculation (traitement 12) a influencé favorablement le poids sec des nodules qui est six fois plus important que celui du traitement 6 qui n'a reçu que de l'azote et qui a donné le poids sec le plus faible. L'inoculation associée avec du compost et de l'azote a également eu un effet favorable sur l'activité des microorganismes du sol hydrolysant la fluorescéine diacétate. Quant à l'activité phosphatase du sol, l'inoculation additionnée du compost a produit une plus importante quantité de nitrophénol.

Par contre, l'inoculation n'a pas eu un effet très favorable sur le taux de mycorhization. L'apport de compost et d'azote est le traitement le plus favorable au développement en hauteur des plants. Le poids sec des biomasses aériennes et racinaires le plus élevé a été obtenu par le traitement avec du compost, de phosphore et de l'azote. Cette forte croissance des plants en présence de fertilisant azoté indique une forte dépendance de la plante vis-à-vis de l'azote. Ensuite pour le taux de mycorhization, le meilleur taux a été décelé dans la parcelle témoin, parcelle n'ayant reçu aucun traitement.

Cette expérimentation nous a permis de mettre en évidence l'intérêt de l'inoculation sur l'amélioration de la qualité biologique du sol de culture de haricot vert en stimulant l'activité des microflore telluriques. En ce qui concerne la croissance des plantes, la disponibilité de l'azote est une des contraintes principales sur le développement des plantes sans oublier le phosphore qui induit une augmentation du poids sec des biomasses et des nodules. Le compost est un engrais organique qui s'associe bien à l'action d'inoculation étant donné que les meilleurs résultats obtenus après l'apport de l'inoculation sont dans les traitements où le compost est présent.

Cela nous pousse donc à élargir encore notre champ de recherche à de nombreuses perspectives. Ainsi, il est intéressant pour la suite des activités :

- ✓ De mesurer les rendements de culture pour mieux savoir la capacité de l'inoculation vis-à-vis de la production agricole, c'est-à-dire des gousses de haricot vert nain.

- ✓ De faire une analyse qualitative des nodules obtenus sur les systèmes racinaires de haricot pour savoir l'efficacité des souches introduites à fixer l'azote atmosphérique et pour comprendre pourquoi le fertilisant azoté est plus efficace pour la stimulation de la croissance des plantes que l'inoculation.

- ✓ De mesurer la teneur en azote des feuilles pour voir si les plants de haricot vert inoculés accumulent mieux cet élément du fait de l'apport des bactéries fixatrices d'azote.

- ✓ De refaire l'étude chaque année afin d'apprécier la pérennité de l'efficacité de l'inoculation sur la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne des sols.

- ✓ De refaire la même expérience sur d'autres types de sol, étant donné que notre étude s'est limitée à un seul type de sol.

- ✓ D'introduire des souches de champignons mycorhiziens efficaces comme co-inoculant dans le sol de culture de haricot pour voir les résultats produits par l'association de *Rhizobium* et de champignons mycorhiziens.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adams M. W., Coyne J. H., Davis P. H., Graham & Francis C. A. (1985).** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.); In R. J. Summerfield and E. H. Roberts (ed.). *Grain Legume Crops*, Collins, London. pp. 433-476.
- **Alami Y., Champolivier L., Merrien A. & Heulin T. (1999).** Rôle de *Rhizobium sp.*, rhizobactérie productrice d'exopolysaccharide dans l'agrégation du sol rhizosphérique du tournesol: conséquences sur la croissance de la plante et la résistance de la plante à la contrainte hydrique. *Oléagineux, Corps Gras, lipides*, 6 (6): 524-528.
- **Alazard D. & Duhoux E. (1987).** Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraaspera*. *Biology Fertility Soils* (1987) 4: 61-66.
- **Alef K. (1998).** Estimation of hydrolysis of fluorescein diacétate. In: Alef K. and Nannipieri P. (Eds), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, pp. 232-233.
- **Alvarez G., Chaussod R., Cluzeau D., Godden B., Lemarié C., Metzger L., Nicolardot B. Parat J. & Salducci X. (2002).** Activités biologiques et fertilités des sols: Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles. *Etats et activités biologiques des sols*, 1, 27p.
- **Andrianandrasana M. D. (2009).** Effets mycorrhizosphériques d'*Acacia mangium* : Impacts sur la structure et l'activité de la population microbienne du sol et sur le développement d'une essence ligneuse autochtone, *Intsia bijuga*. Mémoire de DEA en Biotechnologie – Microbiologie. Université d'Antananarivo; 102 p.
- **Andrianarisoa K. S. (2004).** Expérimentations agronomiques sur l'effet de l'inoculation de la riziculture pluviale par des exsudats racinaires des plants de riz cultivés en SRI au stade plein tallage. Mémoire d'ingénieur en agriculture. Université d'Antananarivo; 127p.
- **Angiosperm Phylogeny Group. (2003).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and Families of flowering plants: APGII. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.

- **Amrani A. (2009).** Effet de la double inoculation *Rhizobium*-Champignons mycorhiziens sur la croissance de la féverole et du haricot nain. Mémoire de Magister en Biotechnologie. Université d'Oran Es-Sénia, 58p.
- **Aufhammer W. (1998).** Getreide- und andere Körnerfruchtarten. *Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer*, 560 p.
- **Bado B. V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Philosophiae Doctor (Ph.D.). Université de Laval, 197p.
- **Bene S. (2005).** Institutions de service de proximité aux agriculteurs à Madagascar. Les besoins des agriculteurs et les marges de manœuvre pour y répondre. Colloque scientifique, FOFIFA/SCAC «Changements induits dans les campagnes malgaches par l'évolution des prix des produits agricoles» 6-7 décembre 2005, Antananarivo.
- **Bertrand J.C., Caumette P., Lebaron P. & Normand P. (2009).** Ecologie microbienne – microbiologie des milieux naturels et anthropisés. Publications de l'Université de Pau, Pau, France.
- **Bethlenfalvay G. J., Brown S. M. & Stafford A. E. (1985).** Glycine-Glomus-*Rhizobium* Symbiosis. II. Antagonistic Effects between Mycorrhizal Colonization and Nodulation. *Plant Physiology*, 79 (4): 1054-1058.
- **Bhuvanesware T. V., Lesniak A.P. & Bauer W.D. (1988).** Efficiency of Nodule Initiation in Cowpea and Soybean. *Plant Physiology*, 86: 1210-1215.
- **Bieleski. (1973).** Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Plant Physiology*, 24: 225-252.
- **Boucher D.H., James S. & Keeler K.H. (1982).** The ecology of mutualism. A. *Review Ecology System*, 13: 315-347.
- **Boivin-Masson C., Dreyfus B. & Giraud E. (2001).** Bactéries symbiotiques et leurs applications. Inst Rech Developpement Ird. Brevet d'invention n° 99 14 179.
- **Burns R.G (1982).** Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 423-428.



- **Cade-Menun B. J., Liu C. W., Nunlist R. & McColl J. G. (2002).** Soil and Litter Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Extractants, Metals, and Phosphorus Relaxation Times. *Journal of Environmental Quality*, 31: 457-465.
- **Carroue B. Jannot P., Justes E., Kouassi A. & Mathys L. (1999).** Fertilisation azotée de trois légumineuses : le haricot, la luzerne et le pois protéagineux. CORPEN Groupe « Fertilisation Azotée des légumineuses », 48p.
- **Chaussod R. (1996).** La qualité biologique des sols : évaluation et implications. *Etude et Gestion des Sols*, 3(4): 261-278.
- **Cleyet-Marel J.C. & Hinsinger P. (2000).** Le sol milieu vivant, un territoire qui reste à découvrir et à valoriser. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 7(6): 490-493.
- **Devisscher S. (1997).** Le compost. Mémoire D.E.S.S. Université de Picardie, 60p.
- **Diaw F. (2002).** Utilisation des inocula de *Rhizobium* pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse de doctorat en biologie végétale. Université Cheikh Anta Diop DAKAR; 112p.
- **Diouf A. (1997).** Caractérisation et utilisation de souches de *Rhizobium* isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) dans la zone des Niayes au Sénégal. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop Dakar; 113p.
- **Dixon R. O. D. & Wheeler C. T. (1986).** Nitrogen fixation in plants. *Chapman and Hall*, New York.
- **Dommergues Y. & Mangenot F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. *Editions Masson et Cie*, 796p.
- **Dommergues Y., Duhoux E. & Diem H. G. (1999).** Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Paris : Editions espaces, 489p.
- **Dresler-Nurmi A., Fewer D.P., Rasanen L.A. & Lindstrom K. (2009).** The diversity and evolution of Rhizobia. *Microbiology Monographs*, 2009, volume 8, *Prokaryotic Symbionts in Plants*, pp: 3-41.

- **Drevon J.J. & Hartwig A.U. (1997).** Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta* 201: 463-469. Dubusc, Paris. 954p.
- **Duponnois R., Founoune H., Masse D. & Pontanier R. (2005).** Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity. *For Ecology Management*, 207: 351-362.
- **Duponnois R., Plenchette C., Prin Y. Ducousso M., Kisa M. Bâ A. M. & Galiana A. (2007).** Use of mycorrhizal inoculation to improve reafforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering*, 29: 105-112.
- **Duponnois R., Hafidi M., Ndoeye I. Galiana A, Dreyfus B & Prin Y. (2010).** Gestion et valorisation des ressources microbiennes des sols pour une revégétalisation durable des milieux sahéliens In : Le projet majeur africain de la Grande Muraille verte : Concepts et mise en œuvre. IRD Editions, 2010 ; pp.171-182. Disponible sur : <http://books.openedition.org/irdeditions/2124> (consulté le 22.05.2014).
- **Egli S. & Brunner I. (2002).** Les mycorhizes: une fascinante biocénose en forêt. *WSL Birmensdorf*, pp. 1-8.
- **Epstein E. (1972).** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 132 (2): 158-159.
- **FAO (2005).** Méthodes de compostage au niveau de l'exploitation agricole. Documents de travail sur la Terre et les Eaux. Misra R.V., Roy R.N., Hiraoka H., Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture, 36p.
- **Fardeau J.C. (1992).** La fertilité des sols et son entretien. *Agriculture-Environnement-Qualité*; pp.51-73.
- **Feng L., Roughley R. J. & Copeland L. (2002).** Morphology changes of *Rhizobium* in peat cultures. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 1067-1070.
- **Fortin J.A., Plenchette C. & Piché Y. (2008).** Les mycorhizes : La nouvelle révolution verte. *Multimondes*. Québec, Canada. 129p.

- **Frank A.B. (1885).** Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 3: 27-33.
- **Franco E., Horton F. & Tardieu. (1979).** Produccion y utilizacion de la papa en el valle del Mantaro, Perú. Resultados de una encuesta agro-economica de visita única. *Documents de Trabajo*, 1979-1, 121p.
- **Fuchs J.G., Biophyt SA. (1999).** Les produits biologiques : bien les connaître pour mieux les utiliser. Cours dispenser les 18 et 19 janvier 1999 à Paris organisé par AGREF-formation.
- **Gaskell M., Smith R., Mitchell J., Koike S. T., Fouche C., Hartz T., Horwath W. & Jackson L.** Soil fertility management for organic crops. *UC ANR Publication 7249*, 2007. Disponible sur : <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/7249.pdf>
- **Gepts P. (1990).** Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) bean. *Economy Botanical*. 44: 28-38.
- **Germon J. C. (2013).** Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées. Académie d'agriculture de France, 15p.
- **Giller K. E., McDonagh J. F., Toomsan B., Limpinuntana V., Cook H. F. & Lee H. C. (1995).** Legumes in the cropping systems of North-East Thailand. Proceedings of the Third International Conference on Sustainable Agriculture. University of London, UK. *College Press, Ashford*.
- **Graham P. H. & Rosas J.C. (1979).** Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agronomy*. 1. (71): 925 - 926.
- **Grimoldi A., Kavanovà M., Lattanzi F., & Schnyder H. (2005).** Phosphorus nutrition-mediated effects of arbuscular mycorrhiza on leaf morphology and carbon allocation in perennial ryegrass. *New Phytologist*, 168: 435-444.
- **Hakoomat A. Muhammad A. K. & Shakeel A. R. (2004).** Interactive effect of seed inoculation and phosphorus application on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 6 (1): 110-112.
- **Harley J.L. & Smith S.E. (1983).** Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press*, Londres.

- **Hilali A., Prévost D., William J., Broughton & Hani Antoun. (2001).** Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 590-593.
- **Hoben H. J., Aung N. N., Somasegaran P. & Kang U. (1991).** Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. And *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 7:324-330.
- **Hofmann E. & Seegerer A. (1951).** Soil enzymes as factors of fertility. *Naturwissenschaften*, 38:141-142.
- **Hussain A., Amjed A. & Noorka I. R. (2012).** Effect of phosphorus with and without *Rhizobium* inoculation on nitrogen and phosphorus concentration and uptake by mungbean (*Vigna radiata* L.). *Journal of Agriculture Research*, 50(1).
- **Kaplan L. (1981).** What is the origin of the common bean? *Economy Botanical*, 19: 358-368.
- **Kammoun S. (1983).** Isolement et caractérisation de *Rhizobium* tropicaux nodulant la Luzerne (*Medicago sativa*). Microbiologie des sols. Université d'Orstom; 31p.
- **Kedi A. B. (2011).** Fonctionnement des phosphatases dans les sols tropicaux: influence de la composition organo-minérale sur l'expression de l'activité enzymatique. Thèse de doctorat d'écosystèmes. Université de Cocody-Abidjan; 161p.
- **Kormanik P.P. & McGraw A.C. (1982).** Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal in plants roots. In *Methods and principles mycorrhizal research*, Schenck, N.C. (éd.), American Phytopathological Society, Minnesota, pp.37-45.
- **Kyei-Bohan S., Sllnkard A. E. & Walley F. L. (2002).** Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. *Journal of Agronomy*, 94: 851-859.
- **Lafon J.P., Tharaud-Prayer C. & Levy G. (1996).** Biologie des plantes cultivées (Tome 1). *Ed. Tec. et Doc., France*: 138-140.
- **Lakhal A. (2011).** Effet de certains inducteurs de gènes nod (composés phénoliques) sur la croissance de *Rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba*. Thèse de doctorat-es-Sciences en

- Biologie moléculaire et cellulaire. Caractérisation et lutte biologique. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen, 104p.
- **MAEP (Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche). (2004).** Filière Grains secs. Filière de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche, et Actions du Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche, 106: 1-13.
  - **Manguin-Salomon H. & Rakotonirainy N. (2012).** Etude de la filière légumes sur les Hautes Terres de Madagascar – régions Analamanga, Itasy, Vakinankaratra, Amoron'i Mania- (pomme de terre, tomate, oignon, carotte, haricot vert et chou). Fert-Fifata-Ceffel, 84p.
  - **Mark G.C. & Foster R.C. (1973).** Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. Dans Marks G.C. et T.T. Kozlowski, (dir. pub.) Ectomycorrhizae, *Academic Press*, Londres.
  - **Marx D.H., Bryan W.C. & Cordell C.E. (1977).** Survival and growth of pine seedling with *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in North Carolina and Florida. *Forest of Sciences*. 23: 363-373.
  - **Maya C., Roopa B., Makari H. K. & Nagaraj K. (2012).** The synergistic effect of VAM Fungi with *Rhizobium* on the growth and yield of *Ciera arietinum* L. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 2 (1): 16-20.
  - **Mbengue M. (2010).** Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat en Biosciences Végétales. Université de Toulouse; 207p.
  - **Montange D. & Saint Macary H. (1989).** Techniques d'inoculation. *FAO*: 1-4 pp.
  - **Moulin L., Munive A., Dreyfus B. & Boivin-Masson (2001).** Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 21 juin 2001.
  - **Mustin M. (1987).** Le compost: Gestion de la matière organique. *Editions François Dubusc*, Paris; 954p.

- **Nannipieri P., Johnson R. L., Paul E. A. (1978).** Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 223-229.
- **Ndoye I. (1990).** Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de doctorat de microbiologie. Université des sciences et techniques de Lille, 189p.
- **Ndiaye M. (1986).** Contribution à l'inoculation bactérienne au champ de l'arachide (*Arachis hypogaea*) et du soja (*Glycine max*) au Sénégal. Mars, 1986, Dakar, 19p.
- **Neyra M., Sow H., Dia M., Ndoye I., Kane A., Diouf D., Yattara I., Jankowski F., Le Marec J., Le Quéré A & Wade T. (2012).** Inoculation des plantes cultivées avec des microorganismes symbiotiques : du transfert de technologie à la construction d'un partenariat multi-acteurs. IRD Editions, 2012; p. 372-390. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/3306> (consulté le 22.05.2014).
- **Nicolardot B., Chaussod R. & Catroux G. (2010).** Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. *Association Française pour l'Etude du Sol*, 2010, pp. 253-261.
- **Obaton M. (1989).** Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote *Rhizobium*-Légumineuse. *FAO*, pp. 22-27.
- **Olivera M., Tejera N., Iribarne C., Ocana A. & Lluch C. (2004).** Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Effect of phosphorus. *Physiologia plantarum* 121: 498-505.
- **Paré T. (1984).** Efficacité de diverses souches de *Rhizobium phaseoli* sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*), variété Goldie. Mémoire d'ingénieur en développement rural. Université de Ouagadougou; 141p.
- **Pascault N. (2010).** Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture: influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol. [Thèse de doctorat d'Ecologie Microbienne – Agroenvironnement]. Université de Bourgogne; 248p.

- **Phillips J. M. & Hayman D. S. (1970).** Improved proceeding for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55 (1): 158-161.
- **Quiquampoix H., Staunton S., Baron M.H., Ratcliffe R.G. (1993).** Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. *Colloids and surfaces. A: Physico-chemical and Engineering Aspects*, 75: 85-93.
- **Raghothama K.G. (1999).** Phosphate acquisition. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 665-693.
- **Raghothama K. and Karthikeyan A. (2005).** Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, 274: 37-49.
- **Rahajaritombo L. (2004).** Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des hautes terres de Madagascar. Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles. Université d'Antananarivo; 214 p.
- **Ralijaona L. A. (2002).** Contribution à l'amélioration de la fixation biologique de l'azote dans le SRI par la détermination de la dose de compost et par inoculation d'*Azospirillum sp.* Mémoire d'Ingéniorat en Agriculture. Université d'Antananarivo; 124p.
- **Rao M. A., Violante A. & Gianfreda L. (1998).** Interactions between tannic acid and acid phosphatase. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 111-112.
- **Ratorakarivo B. (1994).** Relance de la culture de haricots verts exportables à Madagascar. Mémoire d'Ingéniorat en Agriculture. Université d'Antanarivo; 93p.
- **Rakotonirina M. (2010).** Contribution à l'analyse des éléments minéraux dans les graines sèches de haricot DRK 64, pois de bambaras menarangoetra, niébé 37-58-25 et haricot grain de riz leg 84R. Mémoire de DEA en chimie minérale et chimie appliquée. Université d'Antananarivo, 78p.
- **Reed S. C., Townsend A. R., Taylor P.G. & Cleveland C. C. (2011).** Phosphorus cycling in tropical forests growing on highly weathered soils, In: Bünemann E., Oberson A., Frossard, E. (Eds.), *Phosphorus in Action. Springer Berlin Heidelberg*, pp. 339-369.



- **Rochfort S. & Panozzo J. (2007).** Phytochemicals for Health, the Role of Pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7981–7994.
- **Rogolini M. (2006).** Caractérisation de la réponse écophysologique du chou-fleur (*Brassica oleracea* Var. *botrytis* L.) à une carence temporaire en azote. Application à la mise en évidence de différences variétales. Thèse de doctorat de Biologie et Agronomie. Ecole National Supérieur Agronomiques de Rennes. Mention Biologie et Agronomie. 264p.
- **Ruotsalainen A. L., Väre H. & Vestberg, M. (2002).** Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. *Mycorrhiza*, 12: 29-36.
- **Saint Macary H. (1989).** Expérimentations au champ: choix des dispositifs ; caractéristiques communes. *FAO*, pp. 121-126.
- **Sandoval-Pérez A. L., Gavito M.E., Garcia-Oliva F. & Jaramillo V. J. (2009).** Carbon, nitrogen, phosphorus and enzymatic activity under different land uses in a tropical, dry ecosystem. *Soil Use and Management*, 25: 419-426.
- **Sankaranarayanan C. and Sandarababu R. (1998).** Effet of *Rhizobium* on the interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and root-knot nematode on blackgram (*Vigna mungo*). *Nematology Mediterranean*, 26: 195-198.
- **Schiffers B. (2011).** Itinéraire technique: haricot vert (*Phaseolus vulgaris*). 93p.
- **Schnurer J. & Rosswall T. (1982).** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied Environmental Microbiology*, 43: 1256-1261.
- **Skujins J. J., Braal L. & McLaren A. D. (1962).** Characterization of phosphatase in a terrestrial soil sterilized with electron beam. *Enzymologia* 25, 125-133.
- **Smith S.E., Read D.J. (1997).** Genetic, cellular and molecular interactions in the establishment of VA mycorrhizas. In Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. New York: Academic, 1997: 9-33.
- **Smith S.E. & Read D.J. (2008).** Mycorrhizal symbiosis, Third Edition. *Academic Press, Inc.* Boston, USA. 787p.



- **Soderberg K.H., Olsson P.A. & Baath E. (2002).** Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonization. *FEMS Microbiology Ecology*, 1358: 1-9.
- **Soon Y.K. (2008).** Phosphorus cycle In: Chesworth, W. (Ed.), Encyclopedia of Soil Science. *Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany*, pp. 547-553.
- **Stevenson J. F. (1986).** Cycles of soil - Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley & Sons Inc. 380p.
- **Strullu D.G. (1991).** Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. *Lavoisier*, 250p.
- **Tabatabai M.A. & Bremner J. M. (1969).** Use of p-Nitrophenyl phosphatase ofr assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1: 301-307.
- **Tahir M. M., Abbasi M. K., Rahim N., Khaliq A. & Kazmi M. H. (2009).** Effect of *Rhizobium* inoculation and NP fertilization on growth, yield and nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in the sub-humid hilly region of Rawalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22): 6191-6200.
- **Turner B.L. (2010).** Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6485-6493.
- **Van de Staaij J. W., Rozema J. & Aerts R. (1999).** The impact of solar UV-B radiation on mutualistic plant/micro-organism interactions at the soil-root interface. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*, pp. 159-171.
- **Vincent J.M. (1970).** A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 164 p.
- **Viollet A. (2010).** Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes. Thèse de doctorat en Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne, 168p.
- **Walker V. (2010).** Impact de l'inoculation de microorganismes phyto-bénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L. Thèse de doctorat d'Evolution, Ecosystèmes microbiologie modélisation. Université Claude Bernard Lyon; 207p.

- **Winrock international (2005).** Elaboration d'un plan d'action à court et moyen terme pour la promotion de la filière haricot vert en zone Office du Niger. Rapport d'étude, 65p.
- **Woolhouse H.W. (1975).** Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movement and regulation of endotrophic mycorrhizal associations, dans F.E. Sanders, B. Mossee, et P.B.H. Tinker (dir.pub.), *Endomycorrhizas*, Academic Press, Londres.
- **Woomer P.L. (2010).** Fixation Biologique de l'Azote et Entreprise de Légumineuse à Graine : Directives des Maîtres Fermiers pour N2Africa. *Tropical Soil Biology and Fertility Institute of the International Centre for Tropical Agriculture*. Nairobi, 17p.
- **WWF global. (2006).** Commerce, pauvreté rurale et environnement. Disponible sur <http://www.wwf.mg/?78220/Commerce-pauvrete-rurale-et-environnement> (consulté le 14.01.2015).
- **Zhu Y., Smith S., & Barritt A. (2001).** Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil*, 237: 249-255.

# ANNEXES

## ANNEXES

### Annexes 1

#### Méthodes utilisées pour calculer les activités enzymatiques du sol

##### I. Activité phosphatasique du sol (phosphatase acide)

##### Préparation de la solution tampon pour le dosage des phosphatases

Pour préparer le tampon proprement dit au pH voulu, on fait le mélange de deux solutions A et B selon le tableau ci-après :

A(X)	B(Y)	pH
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	23,3	4,6
25,2	24,8	4,8
24,3	25,7	5
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21	29	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4
13,6	36,4	6,6
9,1	40,9	6,8
6,5	43,6	7

❖ **La Densité Optique lue à 400 nm (DO lue) :**▪ **Pour les parcelles non inoculées du Bloc A**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>TE</b>	1,93	1,538	1,636	1,802	2,111	1,427	1,56	1,475
<b>E1</b>	2,047	2,31	2,074	1,982	2,521	2,038	2,318	1,594
<b>E2</b>	2,049	2,343	2,017	2,095	2,533	1,765	2,212	1,986
<b>E3</b>	2,052	1,854	1,975	1,995	2,541	1,922	1,796	1,783

TS = 0,113

▪ **Pour les parcelles inoculées du Bloc A**

	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>TE</b>	1,101	0,924	1,815	1,868	2,772	1,311	2,44	1,335
<b>E1</b>	1,882	2,254	2,304	2,365	2,979	2,949	2,978	2,964
<b>E2</b>	1,591	2,246	2,541	2,37	2,93	2,952	2,943	2,778
<b>E3</b>	1,678	2,734	2,634	2,407	2,917	2,825	2,841	2,924

❖ **Les DO réelles calculées selon la formule  $DO_r = DO_{lue} - (TE + TS)$** **Parcelles non inoculées**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>E1</b>	0,004	0,659	0,325	0,067	0,297	0,498	0,645	0,006
<b>E2</b>	0,006	0,692	0,268	0,18	0,309	0,225	0,539	0,398
<b>E3</b>	0,009	0,203	0,226	0,08	0,317	0,382	0,123	0,195

**Parcelles inoculées**

	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>E1</b>	0,668	1,217	0,376	0,384	0,094	1,525	0,425	1,516
<b>E2</b>	0,377	1,209	0,613	0,389	0,045	1,528	0,39	1,33
<b>E3</b>	0,464	1,697	0,706	0,426	0,032	1,401	0,288	1,476

❖ **Quantité de p-Nitrophenol (en µg) pour chaque DO réelle obtenue**

10µg de p-Nitrophenol correspond à une DOr de 0,420

**Parcelles non inoculées**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>E1</b>	0,095	15,69	7,738	1,595	7,071	11,857	15,357	0,142
<b>E2</b>	0,142	16,476	6,38	4,285	7,357	5,357	12,833	9,476
<b>E3</b>	0,214	4,833	5,38	1,904	7,547	9,095	2,928	4,642

**Parcelles inoculées**

	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>E1</b>	15,904	28,976	8,952	9,142	2,238	36,309	10,119	36,095
<b>E2</b>	8,976	28,785	14,595	9,261	1,071	36,384	9,285	31,666
<b>E3</b>	11,047	40,404	16,809	10,142	0,761	33,357	6,857	35,142

Ces quantités de p-Nitrophénol sont produites par 0,1g de sol et celles de 1g de sol sont illustrées dans le tableau ci-après:

**Parcelles non inoculées**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>E1</b>	0,9523	156,904	77,38	15,952	70,714	118,571	153,571	1,428
<b>E2</b>	1,428	164,761	63,809	42,857	73,571	53,571	128,333	94,761
<b>E3</b>	2,142	48,333	53,809	19,047	75,476	90,952	29,285	46,428

**Parcelles inoculées**

	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>E1</b>	159,047	289,761	89,523	91,428	22,38	363,095	101,19	360,952
<b>E2</b>	89,7619	287,857	145,952	92,619	10,714	363,809	92,857	316,666
<b>E3</b>	110,47	404,047	168,095	101,428	7,619	333,571	68,571	351,428

**II. Hydrolyse de la FDA**

Composition de chaque échantillon pour la mesure de l'hydrolyse de la FDA

	<b>TS</b>	<b>TE</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>
<b>Tampon Phosphate (ml)</b>	15	15	15	15	15
<b>FDA (µl)</b>	200	-	200	200	200
<b>Sol (g)</b>	-	1	1	1	1
<b>H<sub>2</sub>O (µl)</b>	-	200	-	-	-

**TE** : témoin enzyme ; **TS** : témoin substrat ; **E1, E2, E3** : Les trois essais d'hydrolyse

## ❖ La Densité Optique lue à 490 nm (DO lue) :

## ▪ Pour les parcelles non inoculées du Bloc A

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>TE</b>	0,088	0,112	0,122	0,116	0,097	0,076	0,086	0,101
<b>E1</b>	0,229	0,25	0,308	0,27	0,221	0,303	0,215	0,238
<b>E2</b>	0,27	0,271	0,26	0,342	0,366	0,214	0,19	0,205
<b>E3</b>	0,262	0,37	0,421	0,263	0,275	0,28	0,2	0,214

TS = 0,065

## ▪ Pour les parcelles inoculées du Bloc A

	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>TE</b>	0,09	0,111	0,094	0,114	0,078	0,066	0,072	0,09
<b>E1</b>	0,183	0,205	0,316	0,263	0,324	0,305	0,3	0,318
<b>E2</b>	0,228	0,245	0,313	0,333	0,222	0,281	0,278	0,329
<b>E3</b>	0,231	0,322	0,271	0,198	0,235	0,215	0,324	0,406

❖ Les DO réelles calculées selon la formule  $DO_r = DO_{lue} - (TE + TS)$ 

## Parcelles non inoculées

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>E1</b>	0,076	0,073	0,121	0,089	0,059	0,162	0,064	0,072
<b>E2</b>	0,117	0,094	0,073	0,161	0,204	0,073	0,039	0,039
<b>E3</b>	0,109	0,193	0,234	0,082	0,113	0,139	0,049	0,048



**Parcelles inoculées**

	9	10	11	12	13	14	15	16
E1	0,028	0,029	0,157	0,084	0,181	0,174	0,163	0,163
E2	0,073	0,069	0,154	0,154	0,079	0,15	0,141	0,174
E3	0,076	0,146	0,112	0,019	0,092	0,084	0,187	0,251

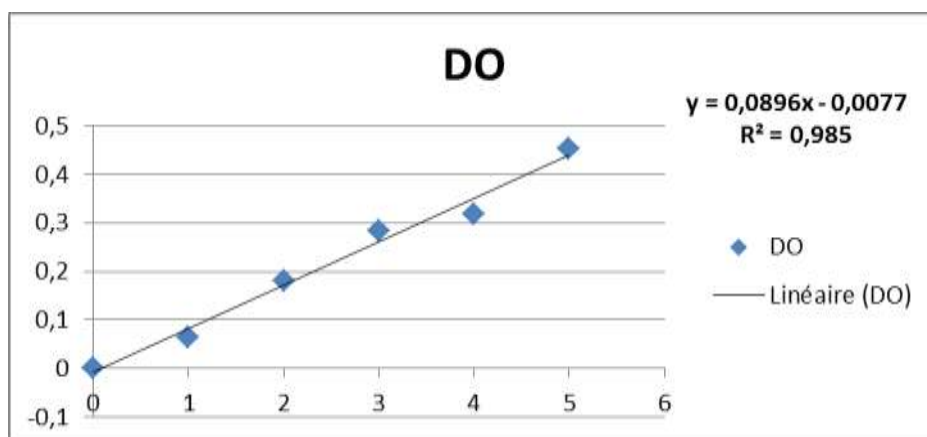
**Gamme étalon**

Composition de la gamme étalon préparée à partir d'une solution standard de fluorescéine

N° Tube	0	1	2	3	4	5
Tampon phosphate (µl)	1000	990	980	970	960	950
Acétone (µl)	1000	990	980	970	960	950
Solution standard de fluorescéine (µl)	0	10	20	30	40	50

**La Densité optique lue**

FDA (µg)	0	1	2	3	4	5
DO	0	0,063	0,18	0,283	0,319	0,453

**Courbe de la gamme étalon**

❖ **Calcul de l'hydrolyse suivant la gamme étalon**

D'après la courbe  $y = 0,0896x - 0,0077$  dont  $y = \text{DOr}$  et  $x = A$  correspond à la quantité de la fluorescéine produite en  $\mu\text{g}$ .

**Parcelles non inoculées**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>A1</b>	0,934	0,9	1,436	1,079	0,744	1,893	0,8	0,889
<b>A2</b>	1,391	1,135	0,9	1,882	2,362	0,9	0,521	0,521
<b>A3</b>	1,302	2,239	2,697	1,001	1,347	1,637	0,632	0,621

**Parcelles inoculées**

	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>A1</b>	0,398	0,409	1,838	1,023	2,106	2,027	1,905	1,905
<b>A2</b>	0,9	0,856	1,804	1,804	0,967	1,76	1,659	2,027
<b>A3</b>	0,934	1,7154	1,335	0,297	1,112	1,023	2,172	2,887

Ces valeurs (A1, A2, A3) ont été obtenues à partir de 750  $\mu\text{l}$  du volume total (15,2ml) pour la lecture de la densité optique. 15,2 ml donne la quantité de fluorescéine dans 1g de sol (F)

**Parcelles non inoculées**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>F1</b>	18,932	18,253	29,11	21,872	15,086	38,384	16,217	18,027
<b>F2</b>	28,205	23,003	18,253	38,158	47,884	18,253	10,563	10,563
<b>F3</b>	26,396	45,396	54,67	20,289	27,301	33,182	12,825	12,598

**Parcelles inoculées**

	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>F1</b>	8,075	8,301	37,253	20,741	42,682	41,098	38,61	38,61
<b>F2</b>	18,253	17,348	36,575	36,575	19,61	35,67	33,634	41,098
<b>F3</b>	18,932	34,765	27,075	6,039	22,551	20,741	44,039	58,515

**Annexe 2****Réactifs :****Composition du bleu trypan :**

Poudre de bleu trypan .....5g

Acide acétique.....250ml

Eau distillée qsp.....1000ml

**Annexe 3****Composition de Patentkali :**

- 30% Oxyde de potassium ( $K_2O$ ) soluble dans l'eau
- 10% Oxyde de magnésium ( $MgO$ ) soluble dans l'eau
- 42% Anhydride sulfurique ( $SO_3$ ) soluble dans l'eau

Engrais pauvre en chlore mais répond à 100% aux besoins des végétaux.

**Composition du biocorne :**

- N-P-K = 11-0-0
- Matières minérales = 15.2%
- Matières organiques = 84.8%

**Name:** TANDRA

**First names:** Gentiane Anjara

**Title:** Impacts of the inoculation of string bean with symbiotic nitrogen-fixing bacteria on soil microbial functioning.

### **Abstract**

The main objective of this work was to describe the effect of rhizobial inoculation of string bean on the soil microbial functioning and plant development. Study was conducted at Analavory, the experimental site of the Society “Lecofruit Madagascar”.

The plots were established in the experimental site of Lecofruit Madagascar company based in Analavory with 16 treatments. Then, 8 plots were amended only with compost mixed or not with nitrogen fertilizer coded 30 and 230kg/ha of phosphate fertilizer and the others were inoculated with rhizobia strains. Controls treatments were made up of parcels which haven’t received any input from amendment or addition of microbial inoculants (Control -) and only the microbial inoculum (Control +).

Results showed that inoculation boosted significantly the global microbial activity and the activity of phosphatase enzymes in the soil. The same tendency was observed for the nodulation rate of the root system which increased significantly when plants were inoculated with rhizobia strains. However, better results on the nodulation rate were obtained for treatments combining inoculation and amendment such as compost, nitrogen and phosphorus. However, microbial inoculation had no significant effect on mycorrhizal rates. The height of the higher plant and the best weight biomass were obtained respectively with treatments containing compost + nitrogen and compost + nitrogen + phosphorus.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, inoculation, *Rhizobium*, symbiosis, symbiotic bacteria.

**Nom:** TANDRA

**Prénoms:** Gentiane Anjara

**Titre:** Impacts de l'inoculation du haricot vert nain avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sur le fonctionnement microbien du sol de culture.

### **Résumé**

L'objectif principal de cette étude a été de décrire les effets de l'inoculation des plants de haricot vert nain, une légumineuse d'importance économique couramment consommée à Madagascar et aussi destinée à l'exportation principalement vers les pays Européens, par des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sur le fonctionnement biologique du sol de culture et le développement des plantes.

Les parcelles ont été mises en place dans le site de la société Lecofruit Madagascar sis à Analavory avec 16 traitements composés respectivement par des amendements à base de compost mélangé ou non avec deux types d'engrais dont l'engrais azoté codé engrais 30 et l'engrais phosphaté 230kg/ha, avec et sans inoculation microbienne. Les témoins ont été constitués par des parcelles n'ayant reçu ni apport d'amendement ni apport d'inocula microbien (Temoin -) et seulement de l'inoculum microbien (Temoin +).

Les résultats ont montré que l'inoculation a stimulé d'une manière significative l'activité microbienne globale et l'activité des enzymes phosphatasiques du sol. Les mêmes tendances ont été observées pour la nodulation du système racinaire du haricot vert nain qui a augmenté d'une manière significative lorsque les plantes ont été inoculées avec les souches de Rhizobia. Toutefois, de meilleurs résultats sur le taux de nodulation du haricot vert nain ont été obtenus pour les traitements combinant l'inoculation et l'amendement comme le compost, l'azote et le phosphore. Par contre, l'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de mycorhization. La hauteur de la plante la plus élevée et le meilleur poids de biomasses ont été obtenus respectivement avec les traitements contenant de compost + azote et compost + azote + phosphore.

**Mots clés:** *Phaseolus vulgaris*, inoculation, *Rhizobium*, symbiose, bactéries symbiotiques.