

## Effet de la nature et de la stérilisation des supports sur la viabilité et l'activité symbiotique de *Rhizobium sullen*

S. HAMMAMI TOUNSI<sup>1</sup>, S. FITOURI DHANE<sup>2\*</sup>, Z. HAMMAMI<sup>1</sup>, K. HAMDI<sup>1</sup>, A. CHAABOUNI<sup>1</sup>, T. BETTAIEB<sup>1</sup>, F. BEN JEDDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut National Agronomique de Tunisie 43, avenue Charles Nicolle 1082 Tunis, Tunisie

<sup>2</sup> Ecole Supérieure d'Agriculture de Mateur, Tunisie

\* Corresponding author: sanadhane2@gmail.com

**Abstract** - This study focuses on evaluating the ability of two new supports to maintain the viability of a rhizobial strain RSU9 as an alternative to peat (used as a control) in two production processes (sterile and non-sterile). The first tested carrier is a compost product based on two native species (*Arundo donax* L. and *Medicago arborea* L.). The second is a mulch of *Ficus nitida* L. The physicochemical characterization of supports shows a similarity of the mineral composition of the two substrates with peat (*Badenoch* and *Carex*) used for the production of commercial rhizobial inoculants. The bacteriological counting test showed that carrier sterilization increases the survival of rhizobia 100 times during storage at 4 °C for 3 months to 1 year. Compost has provided better storage whatever the production technique (sterile or non-sterile). Under sterile conditions, compost has improved the survival of RSU9 compared to peat by 95% to 51% after 3 months and 1 year of storage. In non-sterile conditions, compost has also improved the survival of RSU9 compared to peat by 26% and 20% respectively after 3 months, and 1 year of storage.

After one year storage, compost-based carrier gave the best results in symbiotic association with *sulla*. Compared to peat, compost improved nodulation and dry biomass of *sulla* of 18% and 35% in sterile condition, and than 16% and 19% in non-sterile conditions.

**Keywords:** Rhizobium, Organic carriers, Inoculants, Compost.

**Résumé** - Cette étude s'intéresse à l'évaluation de la capacité de deux nouveaux supports à maintenir la viabilité d'une souche rhizobiale RSU9, comme alternative à la tourbe (utilisée comme témoin) selon deux méthodes de production (stérile et non stérile). Le premier support testé est un compost produit à base de deux espèces autochtones (*Arundo donax* L. et *Medicago arborea* L.). Le second est un mulch de *Ficus nitida* L. La caractérisation physico-chimique des supports montre une similitude de la composition minérale des deux supports avec certaines tourbes (*Badenoch* et *Carex*) utilisées pour la production d'inocula commerciaux à base de rhizobium.

Le test de dénombrement des bactéries a montré que la stérilisation des substrats augmente la survie des rhizobies de 100 fois pendant le stockage à 4°C de 3 mois à 1 année.

Le compost a assuré la meilleure conservation et ce quelque soit la technique de production (stérile ou non stérile). En conditions stériles, le compost a amélioré la survie de RSU9 par rapport à la tourbe de 95% à 51% respectivement après 3 mois et 1 année de conservation. En conditions non stériles, le compost a aussi amélioré la survie de RSU9 par rapport à la tourbe de 26% et 20% respectivement après 3 mois, et 1 année de conservation.

Après une année de stockage, le support à base de compost a donné les meilleurs résultats en association symbiotique avec le *sulla*. Comparativement à la tourbe, le compost a amélioré la nodulation et la biomasse sèche aérienne du *sulla* de respectivement 18% et 35% en condition stériles et de 16% et 19% en conditions non stériles.

**Mots clés:** Rhizobium, Support organique, Inoculum, Compost.



## 1. Introduction

L'inoculation des semences par des souches rhizobiales efficaces est une pratique ancienne considérée comme source d'engrais azotés respectueuse de l'environnement. Il a été estimé que 2000 tonnes d'inocula sont produits annuellement dans le monde. Cette quantité est considérée comme suffisante pour inoculer 20 millions d'hectares de fabacées (Rebah et al 2007). Les plus grands producteurs se trouvent aux Etats-Unis avec une production annuelle de 1000 tonnes (Singleton et al., 1997). Cependant, la commercialisation des inocula est limitée dans les régions de l'ouest de l'Asie et de l'Afrique du nord à cause de la non disponibilité de la technologie ou des supports appropriés. De plus, l'importation de ces produits des pays producteurs de biofertilisants est limitée en raison des charges élevées et des risques de détérioration souvent dues à l'exposition de l'inoculum à des températures élevées durant le transport et le dédouanement. Les inocula sont commercialisés sous plusieurs formes (Stephens et Rask, 2000) dont la plus répandue est poudre à base de tourbe. Cette dernière est un support universellement préféré (Smith, 1992; Roughley, 1970; Burton, 1967; Peterson et Loynachan, 1981) en raison de sa capacité de rétention en eau et sa richesse en éléments minéraux et matière organique (Kishore et al., 2005; Okon et Labandera-Gonzalez, 1994). Cependant, elle n'est pas toujours disponible (Strijtom et Deschot, 1976; Graham-Weiss et al, 1987; Tilak et Subba Rao, 1978; Corby, 1976). D'où l'intérêt, de trouver d'autres matériaux organiques ou inorganiques économiques pouvant maintenir une bonne survie et croissance des bactéries pendant au moins 3 mois. Dans ce contexte, le présent travail s'intéresse d'une part à la caractérisation de deux supports organiques et d'autre part à tester la survie et le pouvoir symbiotique d'une souche rhizobiale (*Rhizobium sllae*RSU9) durant une année de conservation sur ces supports.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Préparation des supports

Trois supports de nature organique ont été utilisés dans cet essai: le premier est une tourbe importée d'Allemagne (T) de marque Solinova, représentant le témoin; le second est un mulsh de *Ficus nitida* (M) ramassé de l'arboretum de l'INAT. Le troisième est un compost (C) à base de deux espèces végétales autochtones: *Arundo donax* L et *Medicago arborea* L. Le compostage a été effectué selon une proportion 1/1 à travers l'andainage des matériaux broyés à la surface du sol pour favoriser l'augmentation de la température. Les résidus ont été maintenus à un niveau d'humidité entre 65 à 70% par arrosage périodique. Le retournement de l'andain a été effectué chaque fois que l'andain atteint un niveau de température supérieur à 50°C durant la phase active et une fois par mois pendant la phase de maturation. Le processus a duré environ quatre mois. Les différents supports ont été séchés puis broyés à l'aide d'un broyeur mécanique (Retsch) afin d'obtenir une poudre fine de 250 µm de diamètre.

### 2.2. Analyses physico-chimiques des supports

La capacité de rétention de l'eau des divers supports a été déterminée selon la méthode citée par Somasegran et Hoben (1985). Le dosage des éléments ( $P_{as}$ ,  $K_e$ , Ca et Na) a été réalisé comme suit: Un gramme de chaque support a été calciné à 450°C dans un four à moufle pendant deux heures. Ensuite, 10 ml d'acide nitrique (1N) ont été ajoutés aux cendres et menés à la digestion (100°C) durant 10 min. Les mélanges ont été par la suite filtrés dans des fioles de 100 ml et conservés à 4°C. Ces filtrats ont servi à la détermination par spectrophotométrie à flamme, du phosphore assimilable ( $P_{as}$ ), calcium (Ca), potassium (K) et sodium (Na) par la méthode décrite par Pauwels et al. (1992). Le dosage de l'azote total N a été réalisé par la méthode Kjeldahl (Jones 1991). Le pH dans l'eau a été réalisé selon la norme internationale ISO 10390 (1994). Enfin, la matière organique a été déterminée selon la norme NT.76.04 (1983) par calcination, dans un four à moufle à 525°C, de 10 g de chaque support pendant deux heures.

### 2.2. Production de la solution bactérienne

La bactérie utilisée dans cette étude correspond à *Rhizobium sllae* RSU9, qui est une souche rhizobiale spécifique à *Sulla coronarium* L. et préalablement sélectionnée pour ces performances symbiotiques (Fitouri et al. 2012). La suspension bactérienne a été préparée par introduction d'une colonie de la souche RSU9 dans un milieu YEM liquide stérile et sa mise en agitation à 150 tours/min et à 28°C dans des conditions d'obscurité. Après 48 h, d'agitation la turbidité de solution bactérienne a été mesurée par un spectrophotomètre (OPTIZEN) à une longueur d'onde de 540 nm. Une densité optique (DO) proche de 1 traduit une haute densité rhizobiale (environ  $10^9$  bactéries/ml).

### 2.3. Préparation, inoculation et conservation des supports

Une quantité de 1800 g a été prélevée de chaque support pour la production des inocula. La moitié de cette quantité a été stérilisée par trois autoclavages successifs espacés de 24 heures, à une température de 121°C et une pression de 1 bar (Saint-Macary et Neyra 1989, Somasegran, 1985). La solution bactérienne de RSU9 fraîchement préparée et à DO =1a été ajoutée aseptiquement aux différents supports à raison de 30 et 50% de leur capacité de rétention en eau respectivement en conditions de production non stérile et stérile. Les supports inoculés ont été emballés dans des sachets plastiques de dimensions 6 x 12 cm et préalablement désinfectés à l'alcool. L'ensemble des sachets a été étiqueté indiquant le type de support, souche ainsi que la date d'ensachage. L'ensemble des inocula ont été incubés à 28°C pendant 6 jours et stockés par la suite au frigo à 4°C pendant 365 jours.

### 2.4. Dénombrement des rhizobia conservés dans les différents supports

La viabilité des rhizobia dans les divers supports et en conditions stériles et non stériles a été estimée par comptage du nombre de cellules rhizobiales viables de RSU9 par gramme de support. Pour cela, une série de comptages a été réalisée : le jour de l'inoculation, et respectivement après 6, 17, 35, 45, 91, 149 et 356 jours de conservation. Un gramme de chaque support inoculé a été prélevé aseptiquement et dilué dans 9 ml d'une solution stérilisée de NaCl à 0,9 % (pH=6). Des dilutions en série ( $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ ) ont été effectuées dans la même solution. Pour chaque niveau de dilution, et après un mélange par vortex de 15 secondes, 100 µl de chaque suspension est étalée aseptiquement et en 3 exemplaires sur des boîtes de pétries contenant un milieu YMA additionné de rouge Congo stérile (Montagne et Beunard 1984). Enfin, ces dernières ont été incubées à l'obscurité et pendant 3 jours dans une étuve réglée à 28°C.

### 2.5. Evaluation de l'infectivité de *Rhizobium sultae* RSU9

L'évaluation du pouvoir infectif de RSU9 après une année (365 jours) de conservation dans les différents supports a été vérifiée en association avec *Sulla coronarium* L. variété Bikra 21. Les graines de sulla ont été désinfectées par imbibition à l'hypochlorite de sodium (1%) et à l'alcool (95°) respectivement pendant 8 min et 15 secondes. Ces dernières ont ensuite été rincées 8 fois à l'eau distillée stérile, puis immédiatement semées dans des gobelets de 33 cl de volume remplis de sable stérile et à raison d'une graine par gobelet. Au moment du semis, chaque graine a reçu 0,5 g d'inoculum dilué dans 5 ml d'une solution stérile de NaCl à 0,9 %. Cinq répétitions ont été réalisées pour chaque type de support. Les plantes ont été maintenues à 75% de leur capacité au champ par un arrosage périodique avec de l'eau distillée stérile, alterné par une irrigation avec une solution nutritive dépourvue d'azote (Vadezet al., 1996). 30 jours après semis, les plantes ont été récoltées et séparées en parties aériennes et racinaires. Après plusieurs séries de rinçages, les nodules de chaque plante ont été détachés des racines, comptés et pesés. Enfin, les masses des matières sèches des parties aériennes racinaires ont été déterminées par pesée, après dessiccation à l'étuve à 70 °C pendant 72 h.

### 2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), version 16. Toutes les mesures ont été répétées trois fois. L'effet de la nature du support sur la viabilité des bactéries a été déterminé en utilisant un modèle linéaire et par comparaison des moyennes (Test Duncan). L'ensemble des mesures réalisées dans l'essai d'infectivité du sulla, a fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) par comparaison des moyennes (Test Duncan). Chaque moyenne est affectée d'une lettre. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de probabilité 5 %.

**Tableau 1:** Caractérisation physico-chimique des supports organiques: Compost (C), mulch du ficus (M) et tourbe (T)

Support	CRE	MO	C	N	K <sub>e</sub>	P <sub>as</sub>	Na	Ca	C/N	pH
	(%)									
C	54 a	55,75 c	32,31 c	1,82 c	0,76c	0,18c	0,26b	4,93b	17,75ab	7,71c
T	74b	32,25 a	18,69 a	0,98 a	0,03a	0,03a	0,10a	0,34a	19,07b	6,60a
M	56a	35,62b	20,65 b	1,30b	0,61b	0,06b	0,10a	3,86b	15,88a	7,28b

CRE: Capacité de rétention en eau, MO: matière organique, C: carbone, N: azote total, K<sub>e</sub>: potassium échangeable, P<sub>as</sub>: phosphore assimilable, Na: sodium, Ca: calcium

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Caractérisation physico-chimique des différents supports

Les caractéristiques physico-chimiques des trois supports sont significativement distinctes (Tableau 1). La tourbe a la capacité de rétention en eau la plus intéressante (74%) suivie du mulch de ficus (56%) et du compost (54%). Cependant, ce dernier est le plus riche en matière organique (55,75 %) et en éléments minéraux. Le compost présente une très bonne source de matière organique, de carbone, d'azote, de phosphore ainsi que d'autres nutriments qui favorisent la croissance et la viabilité des rhizobia. Ce sont généralement les propriétés nécessaires d'un support approprié aux rhizobia (Smith 1992; Rebah et al. 2007). Dans le même contexte, Khavazi et al. (2007) ont rapporté que l'addition de matériaux riches en matière organique (bagasse de canne à sucre/résidus de malt) à la perlite a prolongé de six mois la durée de conservation de *Bradyrhizobium* tout en augmentant leur nombre de cellules. De plus, selon Rebah et al. (2007), la richesse d'un support en azote et en carbone favoriserait la croissance des bactéries rhizobiales. Dans cette étude, le compost est le plus riche en ces éléments en raison de sa composition qui combine une fabacée riche en protéines (*Medicago arborea* L.) à une poacée riche en carbone (*Arundo donax* L.). Le mulch de ficus et le compost sont 11 à 14 fois plus riches en calcium que la tourbe, ce qui pourrait être en faveur de la croissance bactérienne (Smith 1992). Concernant le pH, le compost est le plus basique alors que la tourbe (6,6) et le mulch (7,28) sont considérés comme optimaux à la croissance des rhizobia (Saint et Macary Neyra 1989; Sunita et Kaushik, 2008). L'alcalinité du compost pourrait éventuellement gêner certaines bactéries acidophiles. Toutefois, la souche RSU9 utilisée dans cette étude est sélectionnée pour supporter un pH alcalin allant jusqu'à 9,5 (Fitouri 2011).

#### 3.2. Effet de la stérilisation des supports sur la survie des bactéries rhizobiales

La cinétique de croissance et de survie de la souche *Rhizobium sultae* RSU9 dans différents supports stériles et non stériles est présentée dans la figure 1. Durant les 6 premiers jours qui suivent l'inoculation bactérienne des supports, un accroissement de  $10^2$  à  $10^3$  bactéries/gramme de substrat a été noté pour l'ensemble des substrats et avec les deux techniques de conservations (stériles et non stériles). Cet accroissement correspond à la phase d'incubation des rhizobia en conditions optimales de température (28°C) (Temprano et al. 2002). Selon Albareda et al. (2008), cette période d'incubation est très utile et améliore la survie des bactéries rhizobiales sur les graines de soja car elle favorise leurs adaptations aux supports. Par contre, selon Kharvazi et al. (2007) cette phase de pré-conservation serait inutile pour la conservation de *Bradyrhizobium japonicum* sur l'ensemble des supports testés. En conditions stériles, après cette période d'incubation de 6 jours, un pallier représentant une moyenne de densité de  $10^{11}$  bactéries/gramme de substrat a été maintenu durant les 91 jours (environ 3 mois) qui suivent l'inoculation des supports. Par la suite, et après environ 5 mois (149 jours) et une année (365 jours) de conservation, la densité rhizobiale de RSU9 a respectivement chuté à  $10^9$  et  $10^7$  bactéries/gramme de substrat. Contrairement aux supports stériles, la densité de bactéries rhizobiales dans les supports non stériles a été en continuelle diminution (Figure 1, Tableau 2). Après une année de conservation. De pareils résultats sont attendus et confirment les observations de Roughley et Vincent (1967). Cette baisse serait en relation avec une prolifération d'autres microorganismes antagonistes aux rhizobia (Olsen et al. 1994; Paau 1991). En effet, un accroissement du nombre de contaminants qui absorbe le rouge Congo a été observé lors des comptages des bactéries rhizobiales sur boîtes (YAMA-RC).

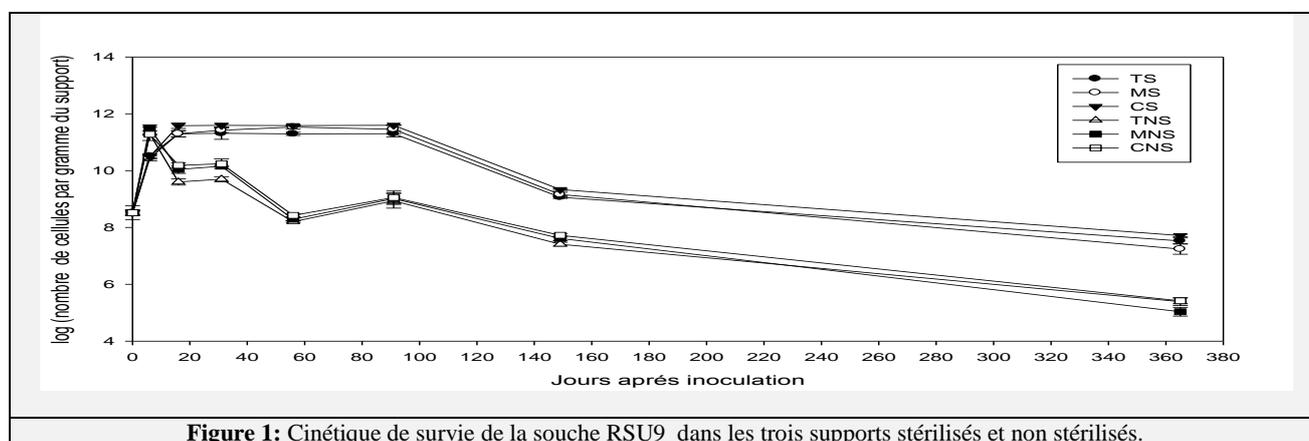


Figure 1: Cinétique de survie de la souche RSU9 dans les trois supports stérilisés et non stérilisés.

Chaque point correspond à une moyenne de trois valeurs. Les barres verticales représentent l'écart type. TNS: tourbe non stérilisée, MNS: mulch de ficus non stérilisé, CNS: compost non stérilisé; TS: tourbe stérilisée, MS: mulch de ficus stérilisé, CS: compost stérilisé

### 3.3. Effet de la nature des supportsur la conservation et la survie des bactéries rhizobiales

La viabilité des rhizobia dans les trois supports a été comparable durant la période d'incubation. Par la suite et selon le substrat de conservation, une variabilité de la densité bactérienne est notée.

**Tableau 2:** Viabilité de RSU9 dans les divers supports en nombre de bactérie par gramme de support

Conditions	Stériles					Non stériles					
	JAI	0	6	91	149	365	0	6	91	149	365
T		3,3 10 <sup>8</sup> a	3,3 10 <sup>10</sup> a	2 10 <sup>11</sup> a	1,2 10 <sup>9</sup> a	3,4310 <sup>7</sup> b	3,3 10 <sup>8</sup> a	2 10 <sup>11</sup> b	8,7 10 <sup>8</sup> a	2,6 10 <sup>7</sup> a	2,510 <sup>5</sup> b
M		3,3 10 <sup>8</sup> a	2,7 10 <sup>10</sup> a	2,8 10 <sup>11</sup> b	1,5 10 <sup>9</sup> b	1,8310 <sup>7</sup> a	3,3 10 <sup>8</sup> a	3,2 10 <sup>11</sup> c	1,1 10 <sup>9</sup> a	4,2 10 <sup>7</sup> b	1,110 <sup>5</sup> a
C		3,3 10 <sup>8</sup> a	3,1 10 <sup>10</sup> a	3,9 10 <sup>11</sup> c	2,1 10 <sup>9</sup> c	5,2310 <sup>7</sup> c	3,3 10 <sup>8</sup> a	1,9 10 <sup>11</sup> a	1,1 10 <sup>9</sup> a	5,3 10 <sup>7</sup> b	2,710 <sup>5</sup> b

JAI: Jours après l'inoculation; T: tourbe; M: mulch de ficus; C: compost. Chaque valeur correspond à une moyenne de trois répétitions.

Le compost a assuré la meilleure conservation (tableau 2) et ce quelque soit la technique de production (stérile ou non stérile). Le compost stérile a permis de maintenir les meilleures densités bactériennes avec des améliorations de la densité par rapport à la tourbe stérile variable de 95% à 51% respectivement après 3mois et 1année de conservation. En conditions non stériles, le compost a aussi donné la meilleure densité bactérienne durant toute la période de conservation, avec des améliorations par rapport à la tourbe de 26%, 103% et 20%respectivement de après 3 mois, 5 mois et 1 année de conservation.

La conservation sur Mulsh de ficus est moins efficace que celle du compost. En effet, comparativement au Mulsh, le compost améliore la densité rhizobiale de 40% à 185% respectivement après 5 mois et 1 année de conservation en condition stériles, et de 26 % à 160 % en conditions non stériles.

La richesse des différents supports en matière organique et en éléments minéraux est en relation directe avec la survie des bactéries (Smith, 1992). En effet, des corrélations positives entre la richesse du support en azote et la survie d'*Azospirillum lipoferum* ont été rapportées par Saranya et al. (2011). D'un autre coté, Gaid et Gaur (1990) associent l'effet des basses températures (4-10°C) à la réduction de la division et des activités métaboliques des cellules bactériennes. Cette réduction de la consommation de nutriments favoriserait la conservation des bactéries.

### 3.3. Evaluation du potentiel symbiotique de RSU9 conservé dans les divers supports

Le pouvoir symbiotique des bactéries rhizobiales RSU9 a été testé sur *Sulla coronarium* L. après 1 année de conservation à 4°C sur les différents supports (Tableau 3).

**Tableau 3:** Effet de la nature du support et de la stérilisation sur la nodulation et la croissance de *Sulla coronarium* L. après une année de conservation.

		NOD	PSN	PSA	PSR
		(nodules/plante)	(mg/plante)	(g/plante)	(g/plante)
Milieux stériles	T	9,33 d	0,020c	0,110d	0,103d
	M	7,33 c	0,016c	0,083c	0,064c
	C	11,00 d	0,028d	0,148e	0,134e
Milieux non stériles	T	6,00 bc	0,012bc	0,069c	0,059c
	M	4,33 b	0,005b	0,049b	0,029b
	C	7,00 c	0,018c	0,087cd	0,070c
Témoin non inoculé		0,00 a	0,000a	0,023a	0,013a

T: tourbe; M: mulch de ficus; C: compost. Chaque valeur correspond à une moyenne de trois répétitions.

L'inoculation du sulla avec les différents supports a engendré des formations nodulaires contrairement aux témoins non inoculés. Ce résultat montre de que tous les substrats ont conservé le pouvoir infectif de RSU9 même en absence de stérilisation. Toute fois, l'efficacité de la souche a varié selon la nature et la stérilisation du support. La stérilisation des supports a eu un effet bénéfique sur la conservation du pouvoir infectif et effectif de RSU9 avec les trois substrats. Cette pratique de stérilisation a permis de conserver un nombre optimum bactéries viables en moyenne 100 fois plus élevé avec les trois substrats. Ces bactéries ont assuré

une nodulation effective avec un maximum de nombre de nodules (11nodules/plante), de poids nodulaire (0,028 mg/plante) et de croissance aérienne (0,148 g/plante) et racinaire (0,134g/plante) enregistré avec le Compost. La conservation sur ce substrat est meilleure que celle sur tourbe. En effet en conditions stériles et comparativement à la tourbe, le compost a amélioré le nombre et le poids nodulaire de respectivement 18 % et 40%. Ce gain en nodulation a généré des améliorations des masses sèches aérienne et racinaire de respectivement 34,4% et 30,1%. Même en conditions non stériles, la conservation sur compost donne les meilleurs résultats avec des améliorations par rapport à la tourbe du nombre et du poids nodulaire respectivement de 16 % et 50%. Ce gain en nodulation a généré des améliorations des masses sèches aérienne et racinaire respectivement de 18,7% et 18,6%. Paradoxalement, la conservation des bactéries sur Mulsh de Ficus donne les plus faibles nodulations et croissance aérienne et racinaire du sulla aussi bien en conditions stériles, que celles non stériles. Ces résultats sont probablement en relation avec la libération de certains produits toxiques contenu dans le mulsh pendant la période de stockage et qui auraient des effets négatifs sur la survie de RSU9. Dans ce sens, Albareda et al. (2008) ont indiqué que l'utilisation du compost de liège comme support de conservation des rhizobia a été non toxique pour les souches testées. L'ensemble de ces résultats montre que la conservation des rhizobia pour une longue durée (plus de 5 mois) est possible et meilleure sur le compost comparativement à la tourbe et au Mulsh de Ficus. Ce effet est en relation avec la composition physico chimique du compost qui a permis la conservation aussi bien de la viabilité de la souche RSU9, mais aussi de ses potentiels symbiotiques et PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobia) (Albareda et al. 2008). Les résultats confirment celles du comptage de la densité bactérienne dans les différents supports, ce qui justifie la possibilité de l'utilisation du compost comme alternative à la tourbe. Dans ce sens, Mouhamed et Abdel Moneim (2010) ont signalé l'intérêt de l'utilisation d'un compost de jacinthe d'eau comme support d'inoculum pour l'amélioration de la nodulation, la croissance et le rendement de la féverole (*Vicia faba* L.). Bien que la conservation sur compost soit optimale dans cet essai, il est possible d'améliorer la survie des bactéries dans ce type de support par ajout de certains additifs tel que le calcaire (Ferrera et Castro, 2005).

#### 4. Conclusion

Quel que soit la durée de conservation, le compost à base de *Arundo donax* L et *Medicago arborea* L. assure la meilleure survie pour la souche RSU9. Après une année de stockage, l'inoculation du sulla avec le compost comme support de conservation des rhizobia, a donné les meilleures nodulations (11 nodules /plante, en conditions stériles) et (7 nodules /plante, en conditions non stériles) générant une amélioration de la production de matière sèche par rapport à la tourbe de 35% et 19 % respectivement en conditions stériles et non stériles. L'ensemble de ces résultats montre le potentiel du compost à être utilisé comme substituant à la tourbe dans la production des inocula rhizobiaux.

#### Remerciements :

Nos vifs remerciements et reconnaissances s'adressent à tous les membres de l'association Abel Granier et ATAE (Association Tunisienne d'Agriculture Environnementale) et en particulier Mme May Granier, qui ont participé au financement et à la réalisation de ce travail.

#### 5. Références bibliographiques

- Albareda M, Rodriguez-Navarro D, Camacho M, Temprano FJ (2008) Alternatives to peat as carrier for rhizobial inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 2771-2779.
- Burton JC (1979) Rhizobium inoculation and soybean production. IN F.T. Corbin (ed.). World soybean research conference II: Proceedings (pp. 89-100). Boulder: Westview press.
- Corby HDL (1976) A method of making a pure-culture, peat-type, legume inoculant, using a substitute for peat. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. P.S. Nutman (ed.). Cambridge University Press. pp. 169-173.
- Ferreira E.M., Castro I.V. 2005 Residues of the cork industry as carriers for the production of legume inoculants. *Silva Lusitana* 13 : 159-167.
- Fitouri Dhane S (2011) Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. INAT. 145p
- Fitouri Dhane S, Ben Jeddi F, Zribi K, Rezgui S et Mhamdi R (2012) Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de *Rhizobium sulae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *Journal of Applied Biosciences* 51: 3642– 3651.
- Fitouri Dhane S, Trabelsi D, Saisi S, Zribi K, Ben Jeddi F, Mhamdi R, (2012) Diversity of rhizobial nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Annals of Microbiology* 62: 77-84.

- Gaur AC, et Gaiind S (1990)** Shelf life of phosphate-solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature and low moisture. *Canadian Journal of Microbiology* 36 : 846-849.
- Graham-Weiss LD, Bennet ML, et Paau AS (1987)** Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. *Applied and Environmental Microbiology* 53:2138-2140.
- Kharvazi K, Rejali F, Seguin P, et Miransari M (2007)** Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 780-784.
- Kishore GK, Pande S, et Podile AR (2005)** Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Letters in Applied Microbiology* 40: 260-268.
- Lupwayi NZ, Olsen PE, Sande ES, Keyser HH, Collins MM, Singleton PW, et Rice WA (2000)** Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research* 65: 259-270.
- Mohamed MH et Abdel Moniem AB (2010)** Evaluation of water hyacinth and Sugarcane Bagasse Composts as a Carrier for Rhizobium Inoculants and their effects on Faba Bean. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6: 1022-1028.
- Montagne D, Bernard P (1984)** Croissance des Rhizobiums dans les fermenteurs IRAT, suivie dans les inoculums. *Agronomie tropicale* pp. 39-42.
- Okon Y et Labandera-Ganzalez CA (1994)** Agronomic application of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1591-1601.
- Olsen PE, Rice WA et Collins MM (1994)** Biological contaminants in North American legume inoculants. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 699-701.
- Paau AS, Graham LL et Bennett M (1991)** Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects*, C. Keel, B. Koller, and G. Défago (eds.), pp. 399-403, IOBC/WPRS Bulletin, Zurich, Switzerland.
- Pauwels JM, Vanranst E et Verloo M (1992)** Manuel de laboratoire de pédologie, Publication agricole N° 28, Belgique, 167p.
- Peterson HL et Loynachan TE (1981)** The significance and application of Rhizobium in agriculture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13:311-331.
- Rebah BF, Prévost D, Yezza A et Tyagi RD (2007)** Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production. *Bioresource Technology* 18: 3535-3546.
- Roughley RJ (1970)** The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil* 32 : 675 – 701.
- Roughley RJ et Vincent JM (1967)** Growth and survival of Rhizobium spp. in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology* 30:32-376.
- Saint Macary H et Neyra M (1989)** Sélection et conditionnement d'un support pour inoculum. In *Fiche technique de la fixation symbiotique de l'azote*. FAO (Ed). Rome.
- Saranya K, Krihnan S, Kumutha K, French J (2011)** Potential of biochar as an alternate carrier to lignite for the preparation of biofertilizer in India. *International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology* 4: 197-176.
- Singleton PW, Boonkerd N, Carr TJ et Thompson JA (1997)** Technical and market constraints limiting legume inoculant use in Asia. In: Rupela, O.P., Johansen, C., Herridge, D.F. (Eds.), *Extending Nitrogen Fixation Research to Farmers' Fields*. ICRISAT, Patancheru, AP, India, pp. 17-38.
- Smith RS (1992)** Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 485-492.
- Somasegaran P (1985)** Inoculant production with diluted liquid cultures of Rhizobium spp. and autoclaved peat: Evaluation of diluents, Rhizobium spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 398-405.
- Stephens JHG et Rask HM (2000)** Inoculant production and formulation. *Field Crop Research* 65:249-258.
- Jones JB (1991)** Kjeldahl method for nitrogen determination. Micro-macro Publishing, Athens, p 79
- Strijdom BW et Deschodt CC (1976)** Carriers of rhizobia and the effect of prior treatment on the survival of rhizobia. In: Nutman PS (ed) *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press, London, pp 151-158.
- Sunita et Kaushik (2008)** Biofertilizers for Sustainability, Agroresources and technology. In: *Potential Microorganisms for sustainable agriculture: A techno- Commercial Perspective*. Maheshwari D. K. et Dubey R.C (Ed). I.K. International publishing House. India. pp. 67-87.
- Temprano FJ, Albareda M, Camacho M, Daza A, Santamaria C et Rodriguez- Navarro DN (2002)** Survival of several Rhizobium/Bradyrhizobium strains on different inoculants formulations and inoculated seeds. *International Microbiology* 55: 81-86.
- Tilak KVBR et Subba Rao NS (1978)** Carriers for legume (Rhizobium) inoculants. *Fert. News*. 23:25-28.
- Vadez V, Rodier F, Payre H et Drevon JJ (1996)** Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 871-878.