

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE, HEALTH
AND ENVIRONMENT

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

Centre de Biotechnologie
Laboratoire de Microbiologie des Sols

**Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de
rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses
à graines (arachide, haricot, niébé et soja)**

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie des Sols et de l'Environnement

Par :

NDOKON BIKANG Anne Nora

Matricule : 17A2719

Licenciée ès-sciences



Sous la co-direction de :

NWAGA Dieudonné

Professeur

Université de Yaoundé I

MEGUEKAM TEKAM Liliane

Chargé de Cours

Université de Yaoundé I

Année académique : 2022-2023

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



THE UNIVERSITY OF YOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE, HEALTH AND
ENVIRONMENT

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

Centre de Biotechnologie
Laboratoire de Microbiologie des Sols

**Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de
rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des
légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)**

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Option : Microbiologie des Sols et de l'Environnement

Par :

NDOKON BIKANG Anne Nora

Matricule : 17A2719

Licenciée ès-sciences

Sous la co-direction de :

NWAGA Dieudonné
Professeur
Université de Yaoundé I

MEGUEKAM TEKAM Liliane
Chargé de Cours
Université de Yaoundé I

Année académique : 2022-2023

DEDICACE

A

Mes parents chéris

Ma sœur

Mes frères

REMERCIEMENTS

« Je remercie le seigneur Dieu pour la grâce, l'amour et la santé »

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Sols, section Biotechnologie Végétale du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson (Yaoundé I). Il est le fruit du soutien matériel, financier et moral de plusieurs personnes que je tiens à remercier sincèrement :

Prof. NWAGA Dieudonné, Professeur au Département de Microbiologie et Chef de la section Végétale au Centre de Biotechnologie de Nkolbisson et du Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'Université de Yaoundé I, qui a dirigé ce travail tout en assurant un bon cadre à sa réalisation grâce à son expertise, sa disponibilité, ses conseils et critiques ;

Dr MEGUEKAM TEKAM Epse FONON Liliane, Chargé de Cours au Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I pour sa disponibilité, sa patience, son expertise et ses conseils tout au long de ce travail ;

Pr ESSIA NGANG Jean Justin, Chef du Département de Microbiologie et à tous les enseignants du Département de Microbiologie pour la formation offerte et mon édification à la recherche tout au long de mon cursus académique ;

Le président et les membres du jury, pour leur disponibilité à examiner ce travail. Leurs critiques et suggestions me permettront d'améliorer la qualité scientifique de ce travail ;

Dr ADAMO Souleymanou, Chargé de Cours à l'Université de Dschang ; Pr FOKOM Raymond, Maitres de Conférences à l'Université de Douala ; Dr SONTSA- DONHOUNG Martial, Chargé de Recherche à l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement pour leurs conseils techniques et pratiques au laboratoire ;

Les doctorants BAHDJOLBE Marcellin, MBASSI Gilbert, FOKA Ebenezer pour leur assistance, leurs conseils pratiques et surtout leur bienveillance durant la réalisation de ce travail ;

Mes parents Mr et Mme BIKANG, ma sœur et mes frères Henriette, Nelson, Romuald et maman Duplexine pour leur amour inconditionnel, leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études ainsi que tous les membres de ma famille et mes proches amis ;

Mes aînés et camarades de promotion en particulier BOLDA, EMAPI, KUETE, MEFIRE, MELI, MOHAMADOU, MOUNDEM, NDZIE, NGAMCHERA, OBE, POKAM, TCHANMEU, WAKEM, et tous ceux dont les noms ne figurent pas dans ce mémoire pour leurs conseils, leur aide et leur accompagnement durant la réalisation de celui-ci.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iii
LISTES DES FIGURES.....	v
LISTES DES TABLEAUX.....	vi
LISTES DES ANNEXES.....	vii
LISTES DES ABREVIATIONS.....	viii
RESUME.....	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I.1- Généralités sur les légumineuses	3
I.2- Espèces étudiées : arachide, haricot, soja, niébé.....	4
I.2-1- Description de l'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	4
I.2-2- Description du haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5
I.2-3- Description du niébé (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp).....	6
I.2-4- Description du Soja (<i>Glycine max</i>)	8
I.3- Fixation biologique de l'azote	9
I.3-1- Généralités	9
I.3-2- Rhizobia	12
I.3-3- Etablissement de la symbiose légumineuse-rhizobium	12
I.4- Formulation d'un biofertilisant : production et contrôle qualité.....	14
I.4-1- Généralités	14
I.4-2- Sélection et production des souches	14
I.4-3- Transporteurs pour le biofertilisant rhizobien.....	14
I.4-4- Types de formulations et mode d'application.....	15
I.4-5- Contrôle qualité et conservation d'un biofertilisant rhizobien.....	17
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	19
II.1-Site d'expérimentation.....	19
II.2- Matériel.....	19
II.2-1- Matériel végétal	19

II.2-2- Matériel bactérien	20
II.2-3- Matériel pour la formulation des biofertilisants	20
II.2-4- Milieux de culture.....	21
II.2-5- Matériel de laboratoire.....	21
II.3- Méthodes	22
II.3-1- Authentification des différentes souches de rhizobia	22
II.3-2- Dispositif expérimental 1 : Effet des souches de rhizobia sur les cultures en condition semi-contrôlé et inoculation.....	23
II.3-3- Formulations des biofertilisants.....	24
II.3-4- Evaluation de la croissance et de la viabilité du consortium rhizobien dans les différentes formulations	26
II.3-5- Milieux de croissance alternatifs du consortium rhizobien	26
II.3-6- Techniques d'enrobage des graines	27
II.3-7- Dispositif expérimental 2 : effet des biofertilisants sur la croissance du soja en champ.....	28
II.3-8- Evaluation de l'effet des biofertilisants et de la méthode d'enrobage sur les paramètres biochimiques des plantes de soja.....	29
II.3-9- Collecte des données en champ	30
II.3-10- Analyse statistiques des données	30
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	31
III.1- Résultats	31
III.1-1- Authentification des souches de rhizobia.....	31
III.1-2- Viabilité des souches de rhizobia dans les formulations de biofertilisants	32
III.1-3- Effet des formulations de biofertilisants et de la méthode d'enrobage sur la croissance du soja en champ	36
III.2- Discussion	45
III.2-1- Authentification des souches de rhizobia.....	45
III.2-2- Biofertilisants rhizobiens : viabilité et milieux alternatifs pour la croissance du consortium rhizobien	45
III.2-3- Potentiel des formulations de biofertilisants à base de rhizobia fixateur d'azote sur la croissance des plants de soja	47
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
ANNEXES	A

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Plants d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	5
Figure 2. Plantule de haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	6
Figure 3. Plants de niébé (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp)	8
Figure 4. Plants de soja (<i>Glycine max</i>)	9
Figure 5. Principales voies de transformation et acquisition des nutriments à médiation microbienne associées aux biofertilisants (Mitter <i>et al.</i> , 2021).....	11
Figure 6. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose Rhizobia-légumineuse (Tortora <i>et al.</i> , 2003).....	13
Figure 7. Différentes catégories de biofertilisants (Kumar <i>et al.</i> , 2022).....	15
Figure 8. Processus de normalisation pour la production du biofertilisant (Raimi <i>et al.</i> , 2021).	18
Figure 9. Semences des différentes variétés de légumineuses	20
Figure 10. Bocaux contenant des Inocula de rhizobia présélectionnés au Centre de Biotechnologie de l'UYI.....	20
Figure 11. Matériels de formulation des biofertilisants.	21
Figure 12. Boîtes de pétri contenant des graines germées	23
Figure 13. Dispositif expérimental I pour authentification des souches de rhizobia	24
Figure 14. Dispositif expérimental II : Effet des différentes formulations sur les performances du soja en pot.....	29
Figure 15. Croissance du consortium dans les différentes formulations après 4 jours d'incubation.....	34
Figure 16. Viabilité du consortium rhizobien dans les formulations en fonction du temps....	35
Figure 17. Croissance du consortium Rhizobien BOSD dans les milieux alternatifs.	36
Figure 18. Effets des biofertilisants sur la teneur en chlorophylle totale dans les plantes de soja	42

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Quantité d'azote fixée par différentes souches microbiennes (Kumar et <i>al.</i> , 2022)	11
Tableau 2. Caractéristiques des isolats de rhizobia utilisés.	22
Tableau 3. Composition des formules de biofertilisants à base de produits locaux	25
Tableau 4. Propositions de milieux de croissance des rhizobia à base de produits locaux.....	27
Tableau 5. Taille, nombre et surface foliaire des plantes de légumineuses inoculées durant la floraison.....	31
Tableau 6. Caractéristiques de la nodulation et les biomasses organes des plantes de légumineuses inoculées durant la floraison.....	32
Tableau 7. Propriétés physicochimiques des matériaux pour la formulation des biofertilisants	33
Tableau 8. Effets des biofertilisants sur la taille, le nombre de feuilles et la surface foliaire des plants de soja pour la méthode d'enrobage par effluent.....	37
Tableau 9. Effets des biofertilisants sur la taille, le nombre de feuilles et la surface foliaire des plants de soja pour la méthode de deux par deux.....	37
Tableau 10. Effets des biofertilisants sur la nodulation des plants de soja pour la méthode d'enrobage par effluent.	38
Tableau 11. Effets des biofertilisants sur la nodulation des plants de soja pour la méthode d'enrobage de deux par deux.....	39
Tableau 12. Effets des biofertilisants sur la biomasse des plantes de soja pour la méthode d'enrobage par effluent	40
Tableau 13. Effets des biofertilisants sur la biomasse des plantes de soja pour la méthode d'enrobage de deux par deux.....	41
Tableau 14. Effets des biofertilisants sur les teneurs en azote et en protéine totale des plants de soja pour la méthode par effluent.....	43
Tableau 15. Effets des biofertilisants sur les teneurs en azote et en protéine totale des plants de soja pour la méthode de deux par deux	44

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux pour 1 litre	A
Annexe 2. Authentification des souches de rhizobia	B
Annexe 3. Milieux de croissance des rhizobia et test de viabilité	B
Annexe 4. Effets des formulations et de la méthode d'enrobage sur les plants de soja.....	C
Annexe 5. Dispositif expérimental en champ et analyses de laboratoires.....	F

LISTES DES ABREVIATIONS

AGRIBIOCAM	: Agriculture Biologique du Cameroun
AFNOR	: Association Française de Normalisation
BFA	: Bactéries Fixatrices d'Azote
BNL	: Bactéries Nodulant les Légumineuses
CBT	: Centre de Biotechnologie
CMA	: Champignons Mychoriziens Arbusculaires
FAO	: Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	: Food and Agriculture Organization of United Nations
GIC	: Groupement d'Initiative Commune
IRAD	: Institut de Recherche Agricole pour le Développement
MINADER	: Ministère de l'Agriculture et Développement Rural
ONG	: Organismes Non Gouvernementales
PGPB	: Plant Growth Promoting Bacteria
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	: Potentiel d'Hydrogène
UFC	: Unité Formant Colonie
USDA	: United State Department of Agriculture
YEMA	: Yeast Extract Mannitol Agar
YEMA + RC	: Yeast Extract Mannitol Agar + Rouge Congo
YMB	: Yeast mannitol Broth

RESUME

La formulation d'un biofertilisant rhizobien est un processus complexe qui nécessite plusieurs étapes de conception afin d'aboutir au produit final. Les légumineuses sont des cultures riches en protéines et ont la capacité de s'associer à des organismes appelés rhizobia qui vivent dans les nodosités des racines de celles-ci permettant ainsi la fixation biologique de l'azote. La présente étude avait pour objectif général de rechercher la meilleure formulation du biofertilisant rhizobien dans le but d'améliorer les performances des légumineuses. L'objectif spécifique 1 consistait à authentifier les souches de rhizobia, pour cela 2 souches et un consortium rhizobien BOSD ont été testés sur 4 cultures à savoir : Nka11 pour l'arachide et le niébé, Pvnk7 pour le haricot et le consortium BOSD pour le soja. Une augmentation considérable des paramètres de croissance des plantes de légumineuses inoculées est observée ; de plus, l'effet biomasse est plus important chez le soja avec le consortium (+72 %). L'objectif spécifique 2 a permis d'évaluer la viabilité du consortium rhizobien dans les différentes formulations, on note une croissance exponentielle du consortium dans les différentes formules de biofertilisants 4 jours après incubation. Par ailleurs, la formule B3 (extrait de pois cajun + mélasse de canne à sucre) a la charge bactérienne la plus élevée (8,89 log UFC/ml) par rapport au milieu YMB (8,72 log UFC/ml). L'évaluation de la durée de vie du consortium après 56 jour de comptage à température ambiante (25-35° C) dans les formulations montre une diminution progressive celui-ci. La formule B5 (extrait de pois cajun + mélasse de canne à sucre avec 1% de poudre blanche) quant à elle, enregistre la plus grande charge (6,74 log UFC/ml) par rapport au milieu YMB (6,49 log UFC/ml). Le milieu enrichi à l'extrait de soja/lait en poudre favorise le mieux la croissance du consortium rhizobien par rapport aux autres ; de plus il utilise toute les sources de carbone alternatifs présents dans ces milieux pour se développer. L'objectif spécifique 3 a permis de tester l'effet des formulations et de la méthode d'enrobage sur la croissance du soja, le digestat associé à un adhésif (huile) ou avec de la poudre de blanche (1%) présente une meilleure nodulation et croissance chez le soja avec une augmentation de +200 à +250 % ; de plus elle permet aussi une augmentation significative de la teneur en azote et en protéine totale de +700 à +900 % par rapport l'inoculum bactérien (B0). Ces résultats constituent un progrès considérable dans l'amélioration non seulement des inoculants à base de fixateurs d'azote mais aussi dans la fertilité et la production des légumineuses à graines.

Mots clés : Formulation, Biofertilisant, Fixateurs d'azote, Rhizobia, Enrobage, Légumineuses à graines.

ABSTRACT

The formulation of a rhizobial biofertilizer is a complex process that requires several design steps to achieve the final product. Legumes are protein-rich crops and have the ability to associate with organisms called rhizobia which live in their root nodules, thus allowing biological nitrogen fixation. The general objective of the present study was to research the best formulation of rhizobial biofertilizer with the aim of improving the performance of legumes. Specific objective 1 consisted of authenticating the rhizobia strains, for this 2 strains and rhizobial consortium BOSD were tested on 4 crops namely : Nka11 for peanut and cowpea, Pvnk7 for bean and the BOSD consortium for soybean. A considerable increase in the growth parameters of inoculated legumes plants is observed ; in addition, the biomass effect is very important in the soybean with the consortium (+72 %). Specific objective 2 allowed to evaluate the viability of rhizobial consortium in the different formulations, we note an exponential growth of the consortium in the different biofertilizer formulas days after incubation. Furthermore, formula B3 (pegeon pea + sugar cane molasses) has the highest bacterial load (8,89 log CFU/ml) compared to YMB medium (8,72 log CFU/ml). The evaluation of shelf life of the consortium after 56 days of counting at room temperature (25-35° C) in the formulations shows a progressive decrease. Formula B5 (pegeon pea + sugar cane molasses with 1% of white powder) recorded the greatest load (6,74 log CFU/ml) compared to YMB medium (6,49 log CFU/ml). The medium enriched with soybean extract/ milk powder best promotes the growth of the rhizobial consortium compared to the others ; moreover it uses all the alternative carbon sources present in these environments to develop. Specific objective 3 made it possible to test the effect of the formulations and coating method on the growth of soybeans, the digestate associated with an adhesive (oil) or with white powder (1%) presents better nodulation and growth in soybean with an increase of +200 to +250 % ; in addition, it also shows a significant increase in the nitrogen and total protein content from +700 to +900 % compared to the bacterial inoculum (B0). The results constitute considerable progress in the improvement not only of nitrogen-fixing inoculants but also in the fertility and production of grain legumes.

Keywords : Formulation, Biofertilizer, Nitrogen Fixing, Rhizobia, Coating, grain legumes.

INTRODUCTION GENERALE

Le biofertilisant désigne un produit contenant des microorganismes du sol appliqué aux plantes pour favoriser leur croissance (Herrmann et Lesueur, 2013). Cependant, il est souvent utilisé à tort comme synonyme d'une large gamme de produits tels que le fumier vert ou animal, les cultures intercalaires ou encore un engrais chimique enrichis en matières organiques (Bhattacharyya et Jha, 2012). Ils sont plutôt définis comme des formulations de cellules vivantes ou latentes de microorganismes, qui fournissent un avantage supplémentaire d'une part dans l'absorption des nutriments et d'autre part sur les performances des plantes lorsqu'ils sont inoculés dans la rhizosphère (Kumar et *al.*, 2022). Les microorganismes qu'ils contiennent sont appelés PGPR (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes) (Yadav et *al.*, 2017) et affectent de façon directe le développement des plantes en facilitant l'absorption des nutriments par ces dernières (fixation de l'azote, solubilisation du Phosphore), induisant une augmentation de la surface (production d'hormones), ou en réduisant l'effet nocif d'agents pathogènes (Bhattacharyya et Jha, 2012). Les biofertilisants sont d'une grande importance économique, réduisant ainsi l'utilisation des engrais synthétiques (Zhang et *al.*, 2021) et leur application est perçue comme une technologie innovante et respectueuse de l'environnement afin d'améliorer la fertilité et le développement des sols (Fasusi et *al.*, 2021).

La fixation biologique de l'azote est réalisée par plusieurs espèces de légumineuses en raison de leur symbiose avec les rhizobia du sol. C'est le cas du soja, du niébé, du haricot et de l'arachide (Hara et Oliveira, 2005). Ces associations jouent un rôle socio écologique important dans la protection de l'environnement et sont également exploités par les agriculteurs pour obtenir des rendements agricoles plus élevées (Lupwayi et *al.*, 2006). La production annuelle des inoculants rhizobiens est estimée à environ 2000 tonnes dans le monde (Ben Rabah et *al.*, 2007). Les souches rhizobiennes sont disponibles sur le marché sous forme de bioinoculants (O'callaghan, 2016) et répondent à environ 79 % de la demande mondiale des biofertilisants.

Les biofertilisants constituent environ 5 % du total des engrais disponibles (Verma et *al.*, 2019) avec une valeur estimée à 2,3 milliards de dollars. La valeur économique de ceux-ci est évaluée à 3,9 milliards de dollars d'ici 2025, avec un taux de croissance annuel de 11,6 % au cours de la période de prévision (Kumar et *al.*, 2022). Cependant, plusieurs analyses ont montré que certains biofertilisants présentent des résultats alarmants pour ce qui est de leur qualité (Herridge, 2008). Par ailleurs, sur un total 65 biofertilisants commercialisés, environ 37 % pourrait être considérés comme « purs » et 63 % comme contaminés d'une ou plusieurs souches

bactériennes (Herrmann *et al.*, 2015). Ainsi, 90 % de tous les inocula de légumineuses produits dans le monde seraient reconnus pour n'avoir aucun effet pratique sur la productivité de la légumineuse pour laquelle ils sont utilisés (Catroux *et al.*, 2001).

La formulation des biofertilisants est un processus délicat et se résume en quatre étapes essentielles à savoir : la sélection et la multiplication des souches dans un fermenteur, le choix du support de formulation et enfin le contrôle qualité et les tests d'efficacité en conditions de terrains (Rami *et al.*, 2021). La formulation peut être soit sous forme solide ou soit liquide et les matériaux utilisés peuvent être des sources biodégradables que l'on retrouve localement (le compost, le biochar, la poudre de maïs, soja, poids cajan, l'argile, le charbon de Bois, etc), riches en nutriment et non toxique pour l'environnement et le microorganisme inoculé. Une bonne formulation doit tenir compte de la durée de conservation et les conditions optimales de développement des microorganismes.

Toutes ces avancées dans le domaine du développement des biofertilisants au niveau mondiale ont suscité plusieurs interrogations parmi lesquelles la question de recherche de ce travail qui est celle de savoir si une meilleure formulation du biofertilisant rhizobien peut-elle améliorer les performances agricoles des légumineuses à graines ? L'hypothèse de recherche qui en découle est : les formulations de biofertilisant à base de rhizobia permettraient de meilleures performances chez les légumineuses à graines. L'objectif général de ce travail est de : rechercher la meilleure formulation du biofertilisant à base de rhizobia dans le but d'améliorer les performances des légumineuses à graines. Plus spécifiquement il s'agira de :

- Authentifier les souches de rhizobia de la collection disponible en laboratoire ;
- Evaluer la viabilité des différentes formulations de biofertilisants à base de rhizobia ;
- Evaluer l'influence des différentes formulations ainsi que des méthodes d'enrobage sur les performances de quelques légumineuses.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1- Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses sont des végétaux regroupés dans la famille des Fabacées (Fabaceae). Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés (concept de « plante hôte ») (Yahara *et al.*, 2013). Avec près de 770 genres et plus de 19 500 espèces, les légumineuses sont après les orchidées et les astéracées la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique (The Legume Phylogeny Working Group, 2013). D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite et jouent des rôles écologiques importants dans quasiment tous les biomes terrestres, même les plus extrêmes (Schrire *et al.*, 2005). Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effet de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet *et al.*, 2006).

L'importance des légumineuses découle principalement de leur pouvoir à établir une association symbiotique fixatrice de l'azote atmosphérique (N₂) par association avec des bactéries issues de la rhizosphère appelées rhizobium au sein de structures racinaires appelées nodules ou nodosités (Graham et Vance, 2003). Cette symbiose peut permettre la fixation de 60 à plus de 600kg d'azote/ha/an (Nwaga, 2000). Grâce à leur richesse en protéines azotées, les légumineuses fournissent au moins 33 % des besoins de l'humanité en protéines. Cette part est essentiellement fournie par le haricot, le petit pois, le pois chiche et la fève (Vance *et al.*, 2000). En industrie agroalimentaire, certaines légumineuses peuvent être transformées en farine utilisée pour faire du pain, des beignets, chips, pâtes à tartiner etc., ou même utilisées sous forme liquide pour produire des laits, yaourts, et les préparations pour nourrissons (García *et al.*, 1998). Utilisées en rotation des cultures ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses sont considérées comme engrais verts et apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Bado, 2002). En comparaison avec la fertilisation chimique, la fixation de l'azote atmosphérique réalisée par la symbiose légumineuses-rhizobia est « gratuite » pour une production de biomasse ou de grains presque équivalente à celle obtenue avec les espèces non fixatrices d'azote (Andrews *et al.*, 2013).

I.2- Espèces étudiées : arachide, haricot, soja, niébé

I.2-1- Description de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

L'arachide encore appelé cacahuète ou poids de terre ou pistache de terre ou encore cacao de terre est originaire du nord-ouest de l'argentine (Jarvis *et al.*, 2003). C'est une plante herbacée appartenant à la famille des légumineuses principalement à la sous famille des papilionacées (schrire *et al.*, 2005). Ses feuilles sont composées et longuement pétiolées ; chaque feuille renferme 4 folioles. Les fleurs sont jaunes ou parfois oranges, sessiles et plus nombreuses aux nœuds inférieurs de la tige. Sa tige principale est dressée et ses ramifications sont ascendantes. Le système racinaire pivotant porte des nodosités fixatrices d'azote atmosphérique (Lazali, 2009). Les fruits sont généralement des gousses cylindriques, plus ou moins ligneuses et couverts d'un réseau de nervure qui mûrit à une profondeur de 3 à 5cm. L'arachide a un cycle de développement optimal à une température voisine de 30° dans des conditions écologiques adaptées à un climat tropical.

L'arachide possède une qualité nutritionnelle très développée de par sa composition chimique et ses différents dérivés obtenus à la suite de sa transformation. Elle renferme environ 45 à 50 % de lipides, 25 à 30 % de protéines, 5 à 12 % de carbohydrate et 3 % de fibres (Foncéka, 2010). Elle est utilisée en alimentation humaine et animale. La production mondiale d'arachides non décortiquées s'élève à 47 millions de tonnes en 2017 (ONG pour l'alimentation et l'agriculture). La Chine et l'Inde représentent 56 % de la production mondiale. En Afrique, le Nigéria est en tête de liste en terme de production, suit de Sénégal, le Tchad, le Ghana et la république démocratique du Congo (FAOSTAT, 2017). D'après la FAO (2014), le rendement moyen de production sur 10 ans (2003 à 2013) de l'arachide au Cameroun est de 1,36 t/ha.

L'arachide est sensible à un grand nombre de maladies telles que : la cercosporose, la rouille, la rosette de l'arachide et la contamination à l'aflatoxine provoquée par les champignons du genre *Aspergillus* (Torrès *et al.*, 2014). La pourriture du collet des plantes due à de nombreux champignons qui peuvent causer de graves dégâts dans les jeunes semis. Les ravageurs quant à eux sont : les pucerons, les rats, les citadelles, les larves de différents coléoptères, les thysanoptères (*Enneothrips flavens* et *Caliothrips brasiliensis*) et les cigales (*Empoasca kraemeri*).



Figure 1. Plantes d'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

I.2-2- Description du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) est une plante originaire d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud dans la région d'Andine. Elle appartient à la classe des Magnolopsida et au genre *phaseolus* (Guignard, 1998). Les plantes de haricot comporte deux types de feuilles différents, les deux premières feuilles sont simples et opposées munies de pétioles. Les suivantes ont un radis composé de trois fioles. Les nervures du limbe renferment des vaisseaux qui sont le prolongement de ceux du pétiole et de la tige (Hamdani, 2012). Les tiges renferment de nœud qui sont des points d'attachent des supports dans le sens du mouvement des aiguilles d'une montre pouvant atteindre une hauteur d'environ 2 à 2,5 mètres pour la variété rampante, alors que pour la variété naine les tiges peuvent atteindre une hauteur de 60 cm. Toutes ces tiges plus ou moins couvertes de poils, sont cannelées et rugueuses (Hamdani, 2012). Le système racinaire est constitué d'une racine principale dominante et des racines latérales qui portent des radicelles plus fines. On observe une association symbiotique à ce niveau entre la plante et la bactérie du genre *Rhizobium* qui permet une fixation de l'azote atmosphérique et fournit en ammonium (Guignard, 1998). Le haricot est une culture se développant à des températures de 20 à 25° C et a des exigences importantes en terme d'eau et de lumière. Le haricot est une plante qui nécessite des sols meubles, peu profonds et un pH entre 5,5 et 7 (Dutartre, 2015).

L'Afrique orientale, Centrale et Australe sont les principales régions productrices de haricot commun après l'Amérique latine (Brésil, Cordillère des Andes, ...) (Jansa et al., 2011). Le haricot est classé au premier rang des légumes secs consommés à l'échelle mondiale avec une production estimée à plus de 27 millions de tonnes pour une superficie de 34,5 millions

d'hectares en 2020 (FAOSTAT, 2022). La production africaine est de 7 millions de tonnes /an sur environ 8 millions d'ha. La République démocratique du Congo, le Rwanda, l'Ouganda et le Kenya sont les grands producteurs de haricot commun en Afrique. Le Cameroun a une production estimée à 422 171t sur 309 036 ha soit un rendement de 1,37 t/ha (FAOSTAT, 2022). Il est cultivé principalement dans la zone de l'ouest et du Nord-Ouest Cameroun avec des prix variables en fonction de la variété et la zone de production.

Le haricot est une espèce attaquée par plusieurs insectes et ravageurs (*Uromyces appendiculatus* et *Botrytis cinerea*). Néanmoins plusieurs champignons sont responsables des maladies retrouvés la plupart du temps chez le haricot : *Collectrichum lindemuthianum* (responsable de l'antracnose du haricot), *Sclerotinia sclerotiorum* (responsable de la sclérotinoïse ou pourriture blanche), *Fusarium* spp responsable de la fusariose du collet ou maladie du pied (Faucher *et al.*,2018).



Figure 2. Plantule de haricot (*Phaseolus vulgaris* L)

I.2-3- Description du niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp)

Le niébé est une légumineuse à graines comestibles qui appartient à la famille des Fabaceae, à la tribu des Phaseoleae et au genre *Vigna*. Les espèces cultivées comprennent 11 sous-espèces ainsi qu'un grand nombre d'espèces apparentées, dont plusieurs sont utilisées comme légumes ou comme plantes fourragères (Dumet *et al.*, 2008). Les deux premières feuilles de *Vigna* sont simples et opposées. Les trois suivantes sont formées de trois folioles

ovales, de couleur verte d'environ 10 à 12 cm de long, terminées chacune par une pointe. Elles possèdent des nervures bien visibles à la base du pétiole. Les tiges sont frêles, cylindriques, lisses ou rugueuses présentant des ramifications et sa taille varie suivant les cultivars. Le système racinaire du niébé est pivotant et profond pouvant descendre jusqu'à 0,8 m. C'est au niveau des racines que se trouvent les nodules qui sont le siège de la fixation symbiotique grâce aux Bactéries Fixatrices d'Azote (BFA). Les fleurs sont de couleur blanche, jaune, bleutée ou violacée. C'est un plant autogame à plus de 98 % (Mahamne, 2007). Les fruits sont des gousses allongées, quasi-cylindriques, droites ou légèrement courbées, la taille variant de 8 à 15 cm. Le niébé peut être cultivé en conditions pluviales, sous irrigation ou avec l'humidité résiduelle du sol le long des fleuves à des températures de 28 à 30° C. Les zones appropriées pour la culture du niébé au Cameroun se trouvent dans les régions du Nord et de l'Extrême-Nord en raison de l'adéquation entre des températures moyennes minimale et maximale de 28,6 et 39,8° C (Hawaou, 2017).

Le niébé s'adapte très bien aux conditions climatiques, édaphiques et socio-économiques en Afrique du point de vue agronomique. Il contribue à une adaptation à la sécheresse, un haut potentiel de fixation de l'azote biologique et une adaptation à une gamme large de pH (4,5-9). Une estimation de 6,7 million de tonnes de niébé sont produites tous les ans sur 12,7 millions d'hectares environ dans le monde. En Afrique subsaharienne, le Nigeria arrive en tête avec une production moyenne annuelle de 3,2 millions de tonnes pour une superficie (ha) de 3,4 millions, soit un rendement de 0,95 tonnes/ha, suivi du Niger, Burkina-Faso et la Tanzanie. Le Cameroun quant à lui occupe la cinquième place avec une production de 156 239 tonnes, pour une superficie (ha) de 179 761 et un rendement de 0,87 tonnes/ha (FAOSTAT, 2014). Les régions du Nord et de l'Extrême-Nord fournissent 96 % de la production nationale du niébé soit 78 163 tonnes et 109 428 tonnes respectivement (MINADER, 2016). A ce jour, la culture du niébé couvre une superficie estimée à 514 739 ha au Cameroun, pour une production estimée à 195 408 tonnes avec une part estimée à 2,91 % de la production mondiale de niébé qui représentent une masse monétaire de 73 milliards de FCFA (MINADER, 2016).

Le niébé est attaqué par de nombreux maladies et ravageurs. Différentes maladies touchent différentes parties de la plante à divers stades de sa croissance à savoir la mosaïque du niébé transmise par le puceron *Alphis craccivora* ou *Cowpea alphidborne mosaic virus* (CabMV) qui est l'une des maladies les plus redoutables du niébé ; l'anthracnose causée par *Colletotrichum lindemuthianum* (Désamours, 1995). Les insectes nuisibles tels que les

pucerons, les thrips sur fleurs, les bruches constituent des contraintes majeures à la production du niébé partout où il est cultivé. Les dégâts dus aux insectes nuisibles peuvent atteindre 80-100 %, en l'absence d'une lutte efficace (Dudje et *al.*, 2009).



Figure 3. Plantes de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp)

I.2-4- Description du Soja (*Glycine max*)

Le soja ou soya ou pois chinois ou haricot oléagineuse est une légumineuse originaire de l'Asie de l'Est plus précisément au nord de la Chine (Yinghui et *al.*, 2008). C'est une plante herbacée de la famille des Fabiaceae, du genre *Glycine* et de l'espèce *Glycine max*. Elle comporte environ plus de 300 variétés qui se différencient par le port, la couleur des graines et la période de floraison. Les feuilles sont trifoliolées (comportant rarement cinq folioles) et rappellent généralement la forme des feuilles de haricot. Les fleurs sont généralement blanches ou pourpres, de petites tailles presque imperceptibles et apparaissent à l'aisselle des feuilles, groupées en grappes de 3 à 5. Des fruits sous forme bosselées et velues, de couleur variable en fonction des variétés et contenant 2 à 4 graines riches en protéines (Doré et *al.*, 2006). Le système racinaire s'organise autour d'une racine pivot qui se ramifie en racelles. Par ailleurs, les racines à nodosités du soja améliorent la composition azotée du sol avant la culture d'autres plantes comme le blé ou le maïs. Le soja se cultive sur un climat chaud à un pH compris entre 5,5 et 6,5 et des températures optimales de 20 à 30° C.

Le soja est un aliment riche en nutriments et est constitué de : 40 % de protéines, 38 % de glucides et de 18 % de lipides. De plus, le soja est dépourvu de cholestérol, riche en oméga-3 (environ 7 %) et vitamine E et peu riche en acide gras saturés. Le soja est également utilisé dans la production des huiles, du yaourt, du lait, des saucisses et dans l'alimentation des nourrissons à faible poids. Il est largement utilisé dans l'alimentation des animaux en particulier de la volaille. La production mondiale du soja tourne autour de 340 millions de tonnes depuis

2017 et dont le premier mondial est les Etats unis avec une production de 123 664 230 tonnes suivit du Brésil avec 114 599 168 tonnes, l'Argentine avec 54 971 626 tonnes, la Chine avec 13 152 688 tonnes, l'Inde avec 10 981 000 tonnes, le Paraguay avec 10 478 000 tonnes et l'Union européenne avec 2 667 769 tonnes (FAOSTAT, 2017). Au Cameroun la culture du soja pesait déjà environ 550 millions de FCFA en 2015 (FAO, 2015). Au Cameroun, le soja est majoritairement produit dans le grand Nord en général mais aussi à l'Ouest et au Nord-Ouest.

Le soja est attaqué par plusieurs maladies dues à la présence des champignons tels que : *Thanatephorus cucumeris* induisant des nécroses brunes au niveau du collet, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* responsable des taches décolorées sur les tiges. La sclérotiniose (*Sclerotinia sclerotiorum*) observée dans les régions qui cultivent d'autres protéagineux et enfin le mildiou (*Peronospora manshurica*) qui ne cause pas de dégâts majeurs. Les principaux ravageurs sont : la mouche grise des semis (*Delia platura*), la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) peut aussi s'attaquer au soja. Le nématode à kyste (*Heterodera glycines*) est le principal ravageur.



Figure 4. Plantes de soja (*Glycine max*)

I.3- Fixation biologique de l'azote

I.3-1- Généralités

L'azote est le nutriment vital le plus important pour la croissance et la productivité des plantes. Elle entre dans la composition de plusieurs éléments essentiels tels que : la chlorophylle, les acides aminés et les acides nucléiques (Wermer et Newton, 2005). Bien que, le principal réservoir de l'azote se retrouve dans l'atmosphère sous forme de diazote (N_2), celle-ci n'est pas directement utilisée par les plantes et ne devient disponible que par les BFA (figure

5) (Mitter et *al.*, 2021). L'azote atmosphérique est transformé en forme disponible pour les plantes par le processus de fixation biologique de l'azote par lequel N_2 est transformé en NH_3 par les microorganismes fixateurs d'azote (Singh et *al.*, 2015). Le processus de fixation de l'azote est catalysé par une enzyme complexe connue sous le nom de complexe nitrogénase (Choudhary et Varma, 2017). La dinitrogénase reductase fournit des électrons avec un pouvoir réducteur élevé, tandis que la dinitrogénase utilise ces électrons pour réduire le N_2 en NH_3 . Structurellement le système de fixation d'azote présente des variations selon les différents genres bactériens. La majeure partie du processus de fixation biologique de l'azote est catalysé par l'activité de la molybdène nitrogénase, que l'on retrouve chez tous les diazotrophes (Mus et *al.*, 2018). Les gènes responsables de la fixation de l'azote appelés gènes NIF, se retrouvent dans les systèmes symbiotiques et libres. L'activation symbiotique des gènes NIF chez *Rhizobium* dépend d'une faible concentration d'oxygène, qui est régulée par un autre ensemble de gènes appelés gènes FIX également couramment trouvés dans les systèmes de fixation d'azote symbiotiques et libres (Wongdee et *al.*, 2018). Plusieurs PGPR sont capables de coloniser les tissus internes des plantes et ainsi d'améliorer leur effet favorisant la croissance en fournissant un environnement limitant l'oxygène nécessaire à l'activation de la fixation de l'azote et à un transfert plus efficace de l'azote vers les plants hôtes (Nyoki et Ndakidemi, 2018). La fixation biologique de l'azote représente une alternative aux engrais chimiques en raison de son impact économique et environnemental (Lobo et *al.*, 2019). L'équation du processus de fixation biologique de l'azote par la nitrogénase est décrite suivant la réaction (kumar et *al.*, 2022) :



Les quantités d'azote fixé sont souvent difficiles à évaluer. Elles sont généralement élevées, comprises entre 10 et 80 kg N/ha/an. Dans certains cas, elles peuvent être beaucoup plus fortes 300 kg N/ha/an pour certaines espèces. Toutefois, c'est surtout par les retombées annuelles de litière que les espèces à actinorhizes enrichissent le sol en azote. Les quantités de litière produites dépassent généralement plusieurs tonnes/ha (parfois 10 tonnes ou plus), ce qui présente des apports en azote dépassant souvent 150 kg N/ha/an. L'activité fixatrice est fortement dépendante du nombre de nodosités formées et dépend aussi du partenaire végétal. En effet celui-ci fournit l'énergie nécessaire à la réduction de N_2 et les squelettes carbonés pour l'assimilation du NH_3 formé. Les espèces ou individus à forte activité photosynthétique auront ainsi la plus forte activité fixatrice (Hmida et Saoudi, 2010).

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

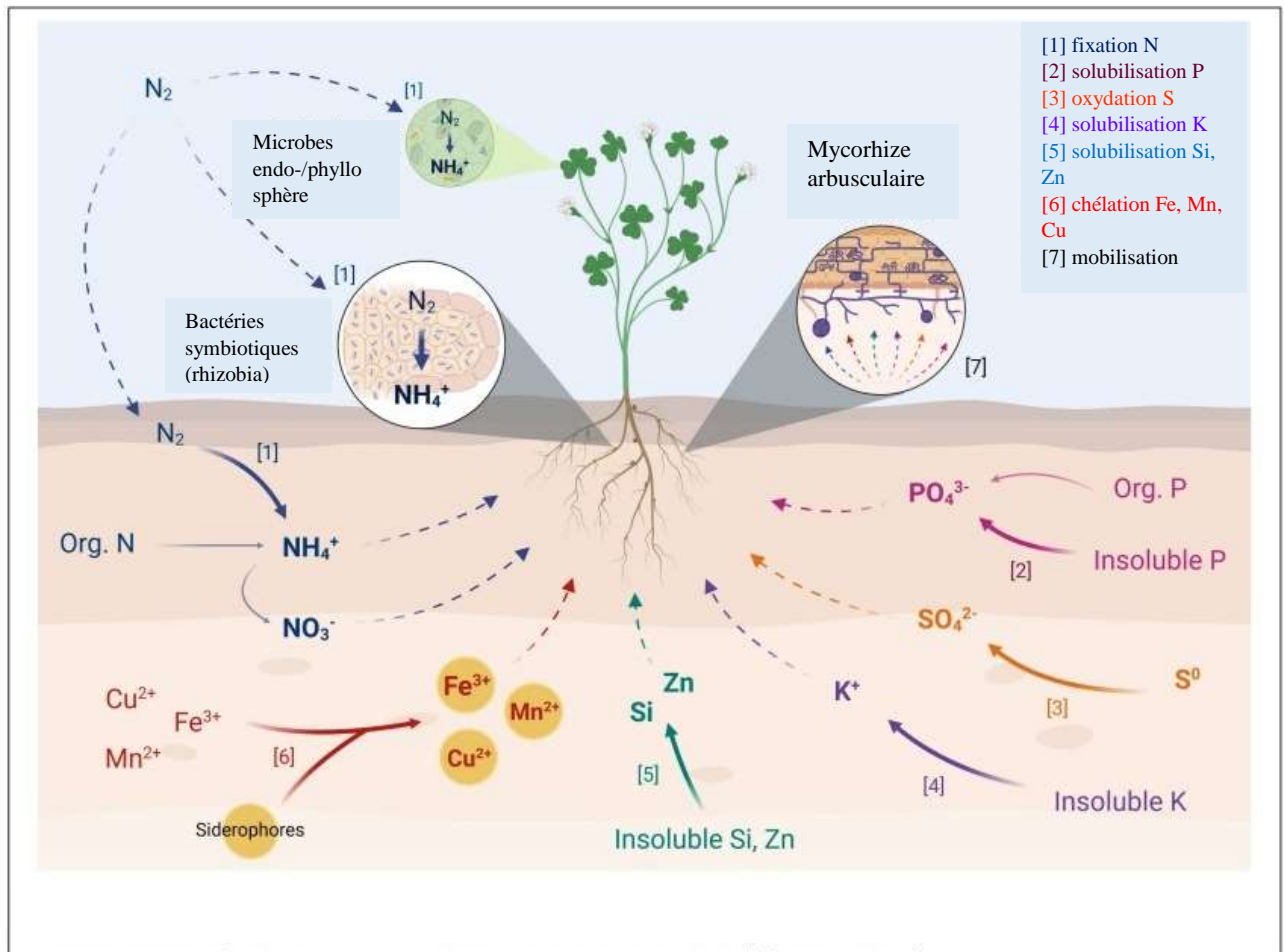


Figure 5. Principales voies de transformation et acquisition des nutriments à médiation microbienne associées aux biofertilisants (Mitter *et al.*, 2021).

Tableau 1. Quantité d'azote fixée par différentes souches microbiennes (Kumar *et al.*, 2022)

Catégories	Microorganismes	Quantité N/ha/an
Symbiotiques	Rhizobium	50 – 300 kg N
	Azolla-anabaena	30 – 60 kg N
	Frankia	89,7 kg N
Associés	Azospirillum	20 – 160 kg N
	Acetobacter ; Diazotrophicus	20 – 150 kg N
Fixateurs libres	Azotobacter	20 – 40 kg N
	Blue green algae	20 – 40 kg N

I.3-2- Rhizobia

Les Rhizobia désignent communément les bactéries du sol et de la rhizosphère capable d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses et de favoriser leur croissance dans les sols pauvres en azote (Sprent et *al.*, 2017). Ce sont des bactéries Gram négatifs (protéobactéries), non sporulantes, qui se distinguent sous deux formes : la forme non bactéroïde ou végétative où les bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles et la forme bactéroïde, à l'intérieur des cellules du cortex racinaire ; les Rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004). Ce sont des bactéries chimioorganotrophes, aérobies ou micro-aérophiles et peuvent se contenter d'une faible tension en oxygène se développant facilement dans les milieux de culture proche de la neutralité (pH situé entre 6 et 7) mais plus exactement à 6,8 avec une source de carbone et une source d'azote. La température idéale de croissance se situe entre 28-30° C (Somasegaran et Hoben, 1994). Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est un des milieux solides, les plus utilisés pour la culture de Rhizobia (Vincent, 1970). Le trait le plus important est leur capacité de former des nodules sur les racines (ou parfois sur la tige) dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique (N₂) a lieu.

I.3-3- Etablissement de la symbiose légumineuse-rhizobium

Dans cette symbiose, la plante fournit du carbone photosynthétique à la bactérie et en retour celle-ci ravitaille la plante en azote issue de la fixation et de la réduction de l'azote atmosphérique (79 % des gaz atmosphérique) en ammoniac. Cette association est initiée grâce à un dialogue moléculaire entre les partenaires microbiens et végétaux (Perret et *al.*, 2000). C'est le partenaire végétal qui synthétise en premier les flavonoïdes qui activent le gène de nodulation chez la bactérie ; l'expression de ce gène de nodulation va aboutir à la production des facteurs de nodulation qui vont permettre aux partenaires microbiens d'infecter leurs partenaires végétaux au niveau des poils absorbants des racines et initier la formation des nodules (Perret et *al.*, 2000).

Dans la rhizosphère, les racines végétales synthétisent des molécules qui sont généralement des flavonoïdes et des acides aminés (opines, octropines...) qui stimulent la multiplication des bactéries fixatrices d'azote (Rhizobia) dénommées actuellement Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL) ; ces molécules attirent ces bactéries vers les poils absorbants des racines. Au contact bactéries-racines, il s'effectue une reconnaissance entre les molécules de la racine et celles de la bactérie appelée "dialogue moléculaire" à travers

l'interaction polysaccharides bactériens et lectines des légumineuses. C'est à ce niveau que se réalise la spécificité BNL espèce de Légumineuse. A l'issue de ce dialogue, il y a compatibilité ou non entre les rhizobia et la racine de la légumineuse. Chez certaines espèces de légumineuses, les rhizobia entrent par les blessures ou ouvertures (groupe de l'arachide) ; mais chez la plupart, cela s'effectue à travers le poil absorbant qui s'incurve ; il se développe ensuite un "cordon d'infection" dans lequel évoluent les bactéries dans la racine. Vers les tissus des racines, dans les cellules, les rhizobia se différencient (augmentation de volume et polyploïdisation) et entraîne des modifications morphologiques et physiologiques et une énorme augmentation de la taille des cellules de la racine qui s'hypertrophient, se dédifférencient pour former les nodules (Nwaga, 2018).

La symbiose Rhizobia-plante hôte prend en compte deux critères à savoir : l'aptitude à noduler ou infectivité et l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique ou effectivité. Ces deux critères peuvent être appréciés du point de vue des bactéries ou de la plante hôte et sous l'influence des conditions environnementales. Au sein de cette association symbiotique, les bactéries procurent aux légumineuses une forme d'azote utilisable pour la synthèse de leurs protéines et les légumineuses quant à elles, procurent aux bactéries d'une part l'énergie indispensable à la fixation de l'azote et, d'autres part les molécules carbonées nécessaires à la production de leurs propres molécules azotées (Raven et *al.*, 2000).

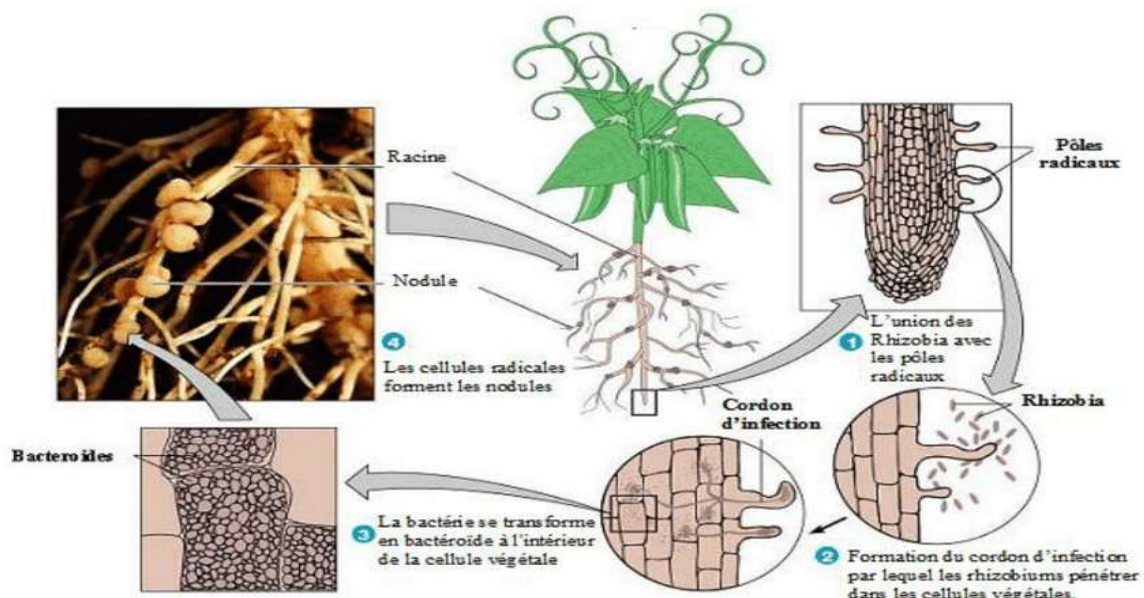


Figure 6. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose Rhizobia-légumineuse (Tortora et *al.*, 2003)

I.4- Formulation d'un biofertilisant : production et contrôle qualité

I.4-1- Généralités

La formulation d'un biofertilisant efficace est un processus de plusieurs étapes qui entraîne une ou plusieurs souches de microorganismes contenues dans un support particulier avec des agents de collage ou d'autres additifs qui aident à protéger les cellules pendant le stockage et le transport (Xavier et *al.*, 2004). Une bonne formulation fournit des conditions optimales pour améliorer la persistance du microorganisme dans le sol et maximiser leur activité afin d'obtenir les avantages maximaux après inoculation (McQuilken et *al.*, 1998).

I.4-2- Sélection et production des souches

Le choix des microorganismes à être inoculé est très critique. Les traits souhaitables pour un inoculum (bactérien et fongique) comprennent sa stabilité génétique, sa capacité à produire un effet sur les cultures cibles, la capacité à rivaliser avec les populations autochtones, de migrer du site d'inoculation aux hôtes et de persister dans le sol parfois hostile en l'absence de l'hôte (Herrmann et Lesueur, 2013). Pendant la production, la souche peut être capable de croître dans un milieu artificiel, se multiplier ou survivre dans les transporteurs, sur les graines, dans le sol et être compatibles avec des produits agrochimiques qui pourraient être appliqués sur les graines (Herridge et *al.*, 2008). Pour les inocula bactériens, les souches bactériennes sélectionnées sont généralement cultivées dans du bouillon liquide pour atteindre des niveaux de populations élevés. La production à grande échelle de bactéries dans des cultures pures utilisant des bioréacteurs est une pratique assez commune dans les pays développés (Malusa et *al.*, 2012). Dans les pays en développement, l'accès aux installations de culture bactérienne à grande échelle est difficile en raison des coûts élevés, des frais de composition limités et des problèmes opérationnels (Herridge et *al.*, 2008).

I.4-3- Transporteurs pour le biofertilisant rhizobien

Le transporteur est un véhicule de livraison des microorganismes vivants de l'usine sur le terrain (Bashan, 1998). Il représente la majeure partie (en volume ou poids) du biofertilisant et a une importance énorme dans la livraison d'un bon nombre de cellules viables et en bonne condition physiologique. Il fournit une niche de protection temporaire aux inocula microbiens dans le sol, physiquement en créant des micro-habitats de protection ou nutritionnellement par la disposition d'un substrat spécifique (Arora et *al.*, 2011). Idéalement, un bon transporteur répond aux caractéristiques suivantes (Bashan, 1998 ; Herridge et *al.*, 2008 ; Malusa et *al.*, 2012) : une bonne capacité d'absorption d'humidité, une bonne capacité de tampon de pH et

pH ajustable facilement. Il doit être chimiquement et physiquement uniforme pour assurer la stabilité. Il devrait être stérile ou facile à stériliser, être exempt de matériaux de forme forfaitaire et compatible avec un broyage fin pour mélanger avec d'autres composés (nutriments, adjuvants). Optimiser les conditions de stockage et d'inoculation : un bon support doit assurer une durée de conservation suffisante (au moins 2 à 3 mois à température ambiante), adhérer aux graines et permettre une libération rapide et contrôlée des microorganismes dans le sol près des racines de l'hôte. Être économiquement et écologiquement durable : cela implique un bon coût et une qualité cohérente. Le transporteur doit être exempt de matériaux toxiques, biodégradables et minimisant les risques environnementaux (dispersion des cellules à l'atmosphère ou à l'eau souterraine). Le choix du transporteur définit également la forme du biofertilisant (liquides, solides ou autres) et peut être sous formes organiques, inorganiques ou synthétiques.

I.4-4- Types de formulations et mode d'application

Les biofertilisants sont la formulation des cellules vivantes ou latentes de microbes, qui fournit un avantage supplémentaire dans l'absorption des nutriments et les performances des plantes dans la rhizosphère (Kumar et al., 2022). La technique de formulation du biofertilisant se fait de façon simple avec un faible coût d'installation et peut être composé d'un ou plusieurs souches microbiennes diversifiées comprenant l'acétobacter, l'azotobacter, le Bacillus, les Pseudomonas, les rhizobiums, les PGPB et les CMA (Basu et al., 2021).

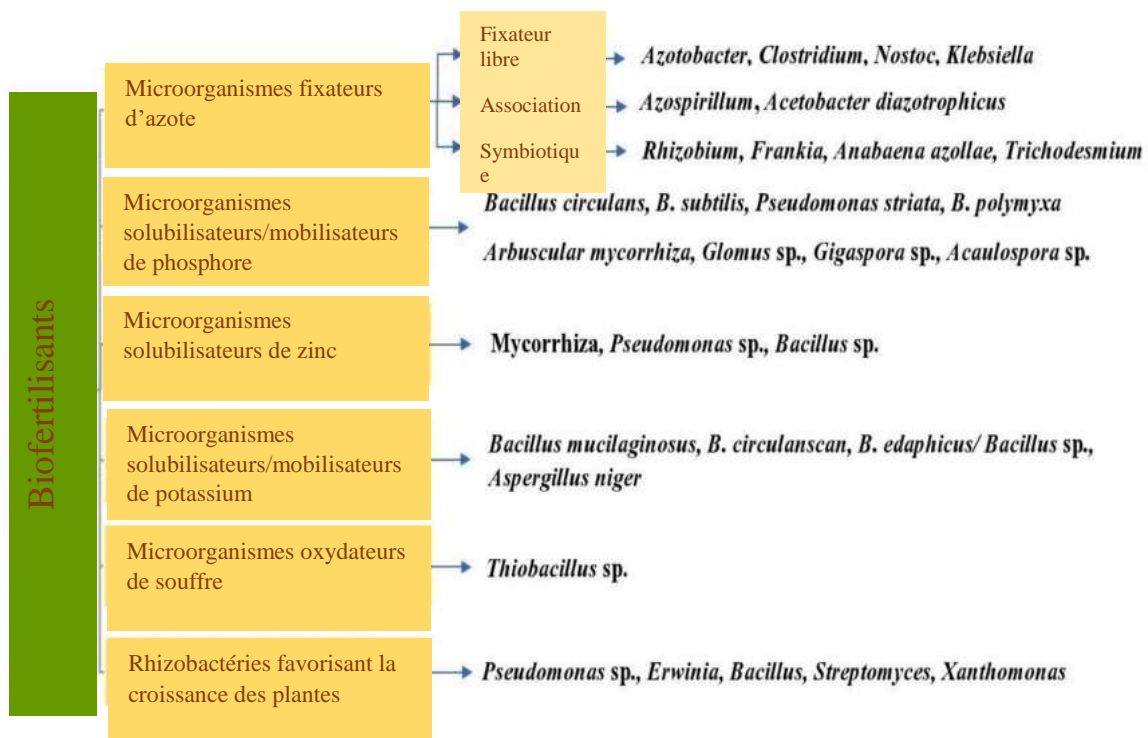


Figure 7. Différentes catégories de biofertilisants (Kumar et al., 2022)

I.4-4-1- Formulation liquide

Les formulations liquides sont basées sur des solutions aqueuses (bouillon), des huiles minérales ou organiques, des suspensions à base d'huile ou de polymère (Xavier et *al.*, 2004 ; Malusa et *al.*, 2012). Ils ont été promus comme étant plus faciles à gérer et à appliquer soit sur les graines ou dans le sol, et leur popularité a augmenté au cours de la dernière décennie (Stephens et Rask, 2000 ; Xavier et *al.*, 2004). Contrairement aux formulations solides à base de transporteurs, les formulations liquides permettent d'inclure suffisamment de quantités nutritives nécessaire à la protection de cellules pour améliorer leur performance. L'avantage d'une formulation liquide est que sa durée de conservation est plus élevée (au moins Deux ans) par rapport aux formulations solides (6 mois voire 12 à 18 mois pour certaines souches). Ils ont quelques inconvénients majeurs à savoir : la durée de conservation limitée dans certains cas, les conditions de refroidissement nécessaires pour un stockage à long terme et les couts accrues ; un fait qui limite leur utilisation aux pays développés et empêche leur utilisation dans la plupart des pays en développent (Stephens et Rask, 2000).

I.4-4-2- Formulation solide

Les formulations solides sont des préparations de culture microbienne sous forme de granulés ou de poudres et contiennent des molécules porteuses organiques ou inorganiques. La formulation d'un inoculum solide peut être associé en fonction de la taille des particules et des applications (Lee et *al.*, 2016). La formulation solide contenant des protecteurs, des additifs et des supports, peut être humide ou sèche mais la composition reste plus ou moins la même. Cependant dans la formulation humide, il n'y a pas de processus de séchage grâce auquel la teneur en eau reste élevée tout au long du stockage et même pendant les applications (Kumar et *al.*, 2022). En outre la formulation humide est basée sur l'alginate (Liffourrena et Lucchesi, 2018), la tourbe (Oliveira et *al.*, 2017) l'argile (Schoebitz et *al.*, 2014), les boues de biogaz mélangées avec un sol enrichi et le biochar (Tripti et *al.*, 2017). Les transporteurs doivent être sélectionnés sur la base du cout, de la toxicité, de la stabilité chimique et de la gestion adaptée par les agriculteurs (Malusa et *al.*, 2012 ; Bashan et *al.*, 2014).

I.4-4-3- Autres formulations

Une large gamme de matériaux naturels et dérivées ont été testés et évalués comme des transporteurs alternatifs pour divers microorganismes. Les principaux conducteurs pour l'utilisation d'un nouveau transporteur semblent être son approvisionnement et leur cout plutôt que leur besoin de qualité supérieure et qui fonctionne contre leur adoption plus répandue

(Stephens et Rask, 2000 ; Herridge 2008). Plusieurs matrices bon marché comprenant des boues d'eau, des composts, des scies, des sacs de sucre, du lactosérum ou des résidus agroindustriels enrichis ont été évalués (Albareda et *al.*, 2008).

I.4-4-4- Modes d'application du biofertilisant rhizobien

Pour qu'une souche de biofertilisant devienne efficace elle doit posséder la capacité compétitive pour sa survie, sa persistance et son établissement dans les conditions environnementales fournies (Sindhu et Dadarwal, 2000). Les résultats de performance de l'inoculation des biofertilisants sont plus lents par rapport aux engrais chimiques, mais leur effet est de longue durée ce qui se traduit par une amélioration de la fertilité des sols (Kumar et *al.*, 2022). Il existe plusieurs méthodes d'application de biofertilisants à savoir le trempage des racines, l'application au niveau du sol et l'inoculation des graines avec application d'une formulation soit liquide soit solide (Mahanty et *al.*, 2017). Des précautions doivent être prises avant l'application comme éviter de stocker le biofertilisant pendant la nuit et à l'exposition directe du soleil. De plus la température optimale de conservation du biofertilisant se situe entre 0° C et 35° C. Pour l'application sur les graines, le biofertilisant est dilué avec de l'eau ou avec de l'adhésif formant une suspension, à laquelle les graines sont ajoutées et mélangées de manière à fournir un revêtement uniforme, les graines enrobées sont ensuite séchées à l'air avant d'être semées dans un champ ou une unité expérimentale (Lawal et Baboloda, 2014). Pour les racines, elles sont plongées dans la suspension de biofertilisant diluée et maintenues pendant un moment après elles sont transplantées. L'application sur le sol se fait lorsque l'agriculteur est sur le point de semer les graines. Avant le semis, le biofertilisant est pulvérisé ou étalé sur le sol (Lawal et Baboloda, 2014).

I.4-5- Contrôle qualité et conservation d'un biofertilisant rhizobien

Pour maximiser les chances d'une bonne inoculation des plantes, la formulation d'un biofertilisant doit combiner un certain nombre de caractéristiques à savoir : (i) offrir un environnement protecteur aux microorganismes (composition, pH et teneur en eau), permettant leur croissance optimale et empêchant le déclin de leur population (lors du stockage, du transport ainsi qu'après leur introduction dans le sol) ; (ii) être respectueuse de l'environnement et (iii) constituer un outil rentable et facilement utilisable (Herrmann et Lesueur, 2013). La conservation d'un biofertilisant se fait généralement en condition de température ambiante (entre 0° C et 35° C) avec une teneur en matière organique d'au moins 20 % quel en soit l'aspect physique du biofertilisant pour une durée de vie de 6 mois (Raimi et *al.*, 2021). L'efficacité des

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

inocula microbienne sur la plante hôte après la formulation et la conservation est un paramètre important dans le processus de contrôle qualité ; c'est le cas des rhizobia avec une meilleure nodulation des racines des légumineuses (Bashan et *al.*, 2014).

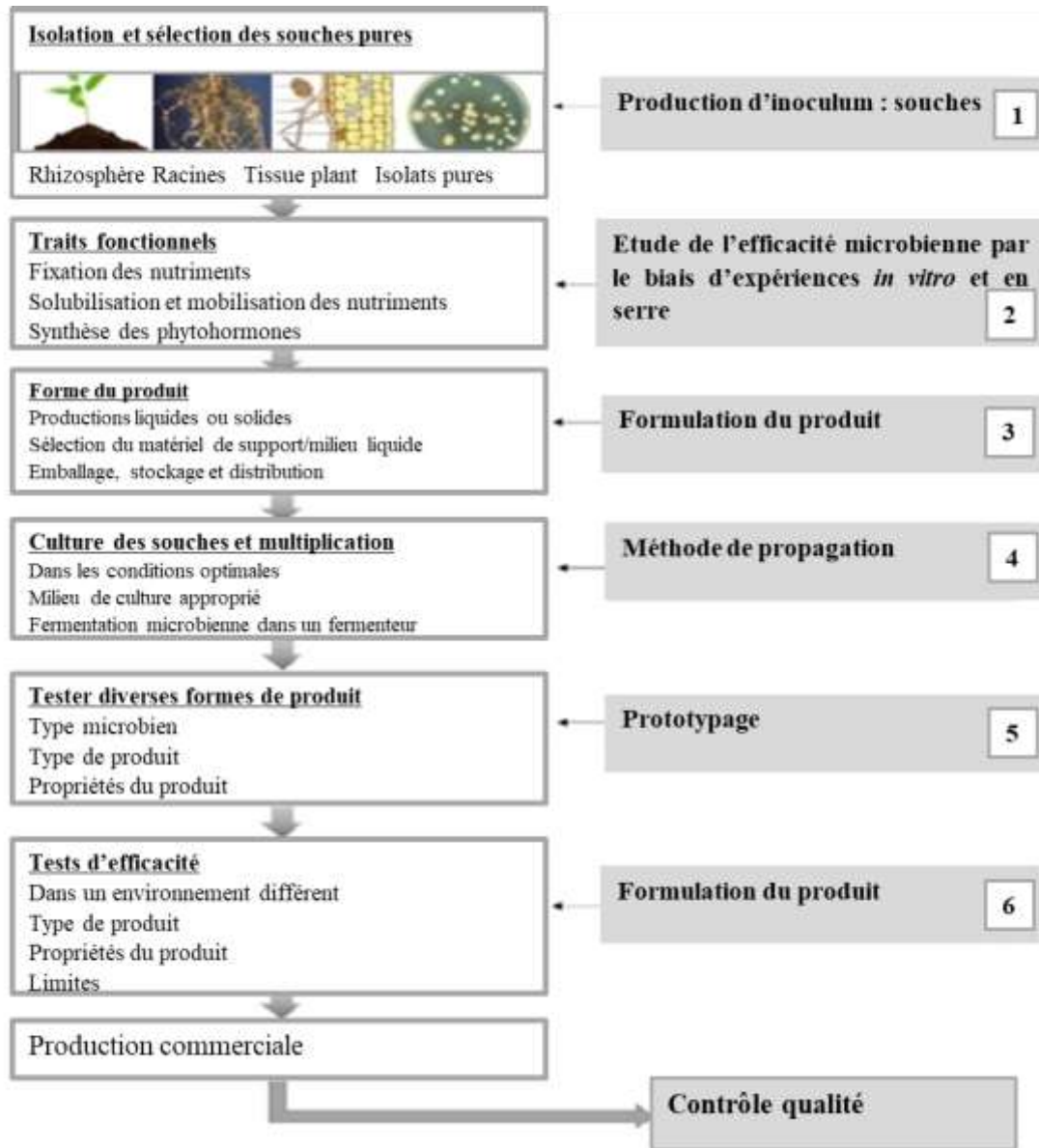


Figure 8. Processus de normalisation pour la production du biofertilisant (Raimi et *al.*, 2021).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1-Site d'expérimentation

Les expériences en pots sont réalisées d'une part au jardin botanique de l'Université de Yaoundé I Ngoa-Ekellé pour celles en serre (3°59'10''Nord, 11°49'59''Est) et d'autre part dans le quartier Fougerol Ngouso pour celles en champ (4°21'0''Nord, 12°40'60''Est) situé dans la région du Centre-Cameroun, département du Mfoundi. Il y règne un climat équatorial de type guinéen caractérisé par une pluviométrie bimodale avec deux saisons de pluies et deux saisons sèches, une température moyenne variant entre 22° C et 42° C et une pluviométrie moyenne annuelle varie de 1600-1900 mm. Les tests microbiologiques et biochimiques ont été effectués au laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre de Biotechnologie (CTB) de l'Université de Yaoundé I. En serre, les paramètres contrôlés étaient la température, la quantité d'eau apportée et la quantité d'azote fixé.

II.2- Matériel

II.2-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour de cette expérimentation était constitué de semences de légumineuse :

- Des graines d'arachides (variétés rouge et brune), toutes originaires de la région du Centre et provenant du marché local avec un cycle de développement de 60 et 70 jours respectivement (figure 9 a et 9 b) ;
- Des graines de haricot (variétés Feb-192 et Ecapan-021), provenant de l'IRAD de Foumbot avec un cycle de développement de 85 et 90 jours chacun (figure 9 c et 9d) ;
- Des graines de niébé (figure 9e) de la variété communément appelée « Haricot à œil brun » de couleur marron ou brun provenant de Bafia et a un cycle de développement de 90 jours ;
- Des graines de soja de la variété Docko (figure 9f) originaire de la région de l'Adamaoua et provenant de l'IRAD de Wakwa avec un cycle de développement de 105 jours.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)



Figure 9. Semences des différentes variétés de légumineuses

a : Rouge du centre ; **b :** Brune du centre ; **c :** Ecapan-021 ; **d :** Feb-192 ; **e :** Bafia et **f :** Docko.

II.2-2- Matériel bactérien

Les inocula étaient constitués du milieu YMB et des isolats de rhizobium présélectionnés en boîte de Pétri, provenant du laboratoire de Microbiologie des sols du centre de biotechnologie de l'Université de Yaoundé I.



Figure 10. Bocaux contenant des Inocula de rhizobia présélectionnés au Centre de Biotechnologie de l'UYI.

1 : YMB + Pvnk7 ; **2 :** YMB + Nka11 ; **3 :** YMB + Bosd1 ; **4 :** YMB + Bosd2 ; **5 :** YMB +Bosd4 ; **6 :** YMB +Bosd6 et **7 :** YMB + BOSD.

II.2-3- Matériel pour la formulation des biofertilisants

Les matériaux utilisés pour la formulation des biofertilisants étaient constitués de sous-produits issues de l'industrie agroalimentaire pour certains (bouse de bœuf, biochar, charbon de bois, mélasse de canne à sucre et digestat), des poudres pour d'autres (pois cajun et poudre de coquille) ainsi que la terre de champ provenat de Garoua.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

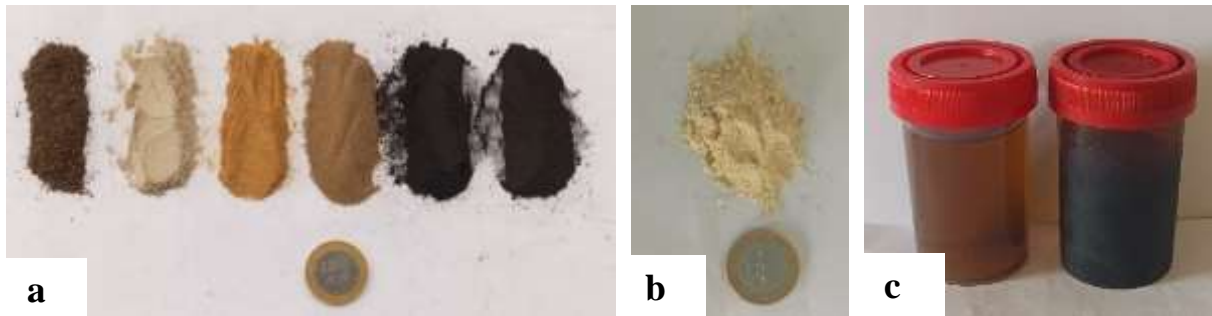


Figure 11. Matériels de formulation des biofertilisants.

a : matériaux pour les formulations solides (bouse de bœuf, poudre de coquille, substrat d'enrobage, terre de garoua, biochar de coque d'arachide et feuilles de litières et charbon de bois) ; **b** : poudre de pois cajan; **c** : matériaux pour les formulations liquides (digestat et mélasse de canne à sucre).

II.2-4- Milieux de culture

Différents milieux de culture ont servi à évaluer la croissance des isolats de rhizobia :

✓ **Milieux liquides :**

- Le milieu YMB (Yeast Mannitol Broth);
- Les milieux B3 et B4 (tableau 3) ;
- Les milieux de croissance alternatifs pour les BNL (tableau 4).

✓ **Milieux solides et semi-solides :**

- Le milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar);
- Les milieux B1, B2, B5 et B6 (tableau 3).

II.2-5- Matériel de laboratoire

Appareils : un autoclave pour stériliser les substrats et les milieux de culture. Une balance électronique (Sartorius) utilisée pour peser le matériel végétal et les réactifs. Une hotte à flux laminaire pour travailler en milieu stérile. Un bain marie (Kotter Mann) pour chauffer les milieux et préparer les milieux de croissance. Un agitateur magnétique pour agiter les milieux. Un spectrophotomètre à UV visible pour mesurer les densités optiques des milieux de croissance. Un pH-mètre (Eutech Instruments) pour le contrôle du niveau d'acidité et de basicité des solutions. Un vortex (Reantix 2788) pour mélanger les milieux avant dilution.

Solutions et réactifs : L'hypochlorite de sodium (4%), l'eau distillée stérile, l'alcool 90° pour désinfecter les semences. Le chlorure d'hydrogène (10 %) pour laver le sable. L'eau du robinet.

Verrerie : les erlenmeyers, la burette, les pipettes, les boîtes de Petri, l'éprouvette, les tubes à essai, les bocaux en verre, les micropipettes.

II.3- Méthodes

II.3-1- Authentification des différentes souches de rhizobia

II.3-1-1- Origine et caractéristiques des souches de rhizobia utilisés

Les souches de rhizobia utilisées pour cette étude et dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous (Bahdjolbé, 2019) sont fournis par le laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I.

Tableau 2. Caractéristiques des isolats de rhizobia utilisés.

Souches	Nka11	Pvnk7	Bosd 4	Bosd 1	Bosd 2	Bosd 6
Caractéristiques						
Gram	-	-	-	-	-	-
Type de colonie	Batonnet	Batonnet	Batonnet	Batonnet	Batonnet	Batonnet
Taille de la colonie (mm)	Grande	Grande	Moyenne	Moyenne	Petite	Moyenne
Plage de diamètre de la colonie (mm)	4- 5	4	2- 4	2-4	2	2-4
Couleur de la colonie sur YEMA+ RC	Blanche	Beige	Rose	Rose	Rose	Rose
Cinétique de croissance de la colonie	Rapide	Rapide	Rapide	Rapide	Rapide	Rapide
Temps de croissance de la colonie (heures)	0-48	0-48h	0-24h	0-24h	0-24h	0-24h
Regroupement	Individualisé	Individualisé	Individ Ualisé	Individualisé	Individualisé	Individualisé
Etat frais	Mobile	Mobile	Mobile	Mobile	Mobile	Mobile
Test à la catalase	+	+	+	+	+	+
Tolérance à l'aluminium 50 µM	+	+	+	+	+	+
Solubilisation du phosphore	+	+	+	+	+	+
Tolérance à la température 28°C	++	++	++	++	++	++
Tolérance à la température 37°C	++	++	++	+++	+++	+++
Température tolérance 47°C	+	+	++	+	+	-
Test antifongique	+	+	+	+	+	+

- Pas de croissance; + croissance; ++ bonne croissance; +++ très bonne croissance.

II.3-1-2- Germination aseptique des graines et préparation des inocula liquides de rhizobia

Environ 200 graines apparemment saines et morphologiquement semblables sont sélectionnées par variétés, introduites dans l'hypochlorite de sodium à 4 % pendant 1 à 2 min, puis rincées à l'eau distillée stérile. Ensuite, elles sont trempées dans l'alcool à 70° pendant 1 min et enfin rincées abondamment à l'eau distillée stérile. Les graines désinfectées sont pré germées sur du sable Sanaga stérilisé à 121° C pendant 1h à l'autoclave, lavé à l'eau chaude contenant le chlorure d'hydrogène à 2 % et additionné à une solution d'agarose contenu dans des boîtes de Pétri ; l'ensemble est conservé à l'obscurité à l'humidité relative de 33 %. La germination a été observé après 5 jours. Les graines étaient considérées comme germées lorsque la radicule perçait le tégument et s'allongeait d'au moins 1cm (Figure 12).

La préparation des inocula liquides a consisté au repiquage des souches de rhizobia présélectionnés en boîte de Pétri (Nka₁₁, PvNk₇, Bosd₁, Bosd₂, Bosd₄, Bosd₆), dans des bocaux en verre contenant du milieu YMB préalablement effectué (annexe 1). Le mélange est ensuite agité pendant 24 h et le temps de croissance était de 4 jours (Vincent, 1970).



Figure 12. Boîtes de pétri contenant des graines germées

II.3-2- Dispositif expérimental 1 : Effet des souches de rhizobia sur les cultures en condition semi-contrôlé et inoculation.

Pour chaque variété, six graines germées sont repiquées sur 300 g de sable précédemment stérilisé, acidifié avec du HCl à 2 % et lavé à l'eau chaude contenu dans des pots en plastiques. Après 5 jours, 3 jeunes plants sont transférés sur 2000 g du sable précédemment traité ; le tout contenu dans des sachets en plastiques de 3l et classés sur des étagères en bois

constituant ainsi des pots de culture. Ces pots sont disposés en deux blocs non randomisés de trois répétitions chacun. Le premier bloc noté T0 servant de témoin, tandis que le second dit expérimental reçoit 2 ml de culture de la souche correspondante près des racines des plantes cinq jours après le second repiquage selon la méthode de Vincent (1970). Ainsi, le niébé et l'arachide reçoivent l'inoculum de la souche Nka11, le haricot celui de la souche Pvnk7 et le soja celui du consortium rhizobien BOSD. L'arrosage des plants s'est fait deux fois par jour à savoir le matin avec de l'eau distillée stérile et le soir avec une solution nutritive de Jensen dilué au dixième (annexe1). Les paramètres de croissance des plantes de chaque variété ont été mesurés dans sa période de floraison (Vincent 1970).

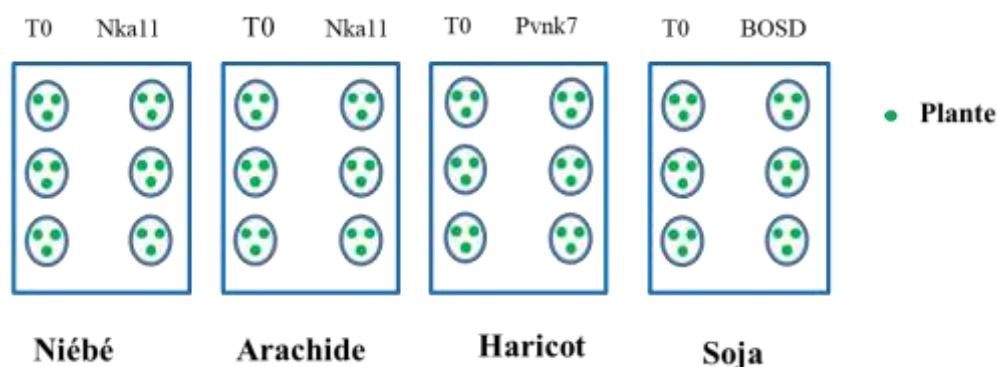


Figure 13. Dispositif expérimental I pour authentification des souches de rhizobia

II.3-3- Formulations des biofertilisants

Elle est faite avec des produits locaux de divers états. Les différentes associations de ces matériaux a permis de les classer en trois groupes à savoir : formulation solide, formulation liquide et formulation semi-solide (tableau 3). Le choix des produits (organique et inorganique) est fait d'une part en fonction de leur faible coût, leur accessibilité et d'autre part de leur capacité à fournir de l'azote et du carbone nécessaire pour la croissance des rhizobium (Nwaga et al., 2010).

Les formulations de biofertilisants à partir des combinaisons de ces différents supports sont consignées dans le tableau 3. Le milieu YMB (B0) est préparé suivant la méthode standard de Vincent (1970). Pour les formulations B1 et B2, Les matériaux solides (ci-dessous) sont broyés puis passé au tamis de 80 micromètres de diamètre et mélangé dans les proportions indiquées dans le tableau 4 pour une masse finale de 100 g avant d'être autoclavé à 121° C pendant 30 min. Un ajout de 40 ml d'inoculum de consortium ($5,1 \times 10^9$ UFC/ml) est effectué dans chacune de ces deux formulations (Pastor Bueis et al., 2019). La préparation de B3 est

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

faite par ajout de 2 ml de mélasse de canne à sucre à 98 ml d'extrait de pois cajan (Somasegaran et Hoben, 1985). Tandis que celle de B4 est obtenue par dilution de 80 ml de digestat avec 20 ml d'eau distillée.

La préparation des formulations B5 et B6 est respectivement semblable à celle de B3 et B4 avec ajout de 1g de poudre blanche dans chacune d'elle. Les pH de ces formulations (B3, B4, B5 et B6) sont rajustés à 6,8 à l'aide des solutions aqueuses de HCl et KOH. Elles sont ensuite autoclavées à 121° C pendant 30 minutes et quatre colonies y sont par la suite ajoutées. Toutes les formulations sont conservées par la suite à température ambiante durant l'évaluation de la viabilité des rhizobia.

Tableau 3. Composition des formules de biofertilisants à base de produits locaux

Types de formulations	Codes	Matériels utilisés
Solides	B1	YMB + biochar (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %).
	B2	YMB + charbon (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %).
Liquides	B0	YMB
	B3	Extrait de poids cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml)
	B4	Digestat.
Semi-solides	B5	Extrait de pois cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml)+ 1 % de poudre blanche.
	B6	Digestat +1 % poudre blanche.

II.3-3-1- Détermination des paramètres physicochimiques des matériaux de formulation

Les paramètres physicochimiques sont déterminés au préalable sur les supports solides à savoir : le biochar, le charbon de bois, le substrat d'enrobage, la poudre blanche, la terre de champ, le poids cajun et la poudre de bouses de bœuf ainsi que les supports liquides notamment le digestat et la mélasse de canne à sucre au Laboratoire de l'Unité de Recherche d'Analyse des Sols et de Chimie de l'Environnement (URASCE) de l'Université de Dschang. Les méthodes utilisées sont ceux de Pawels et al (1992), respectant les normes ISO, AFNOR NF et EN.

II.3-4- Evaluation de la croissance et de la viabilité du consortium rhizobien dans les différentes formulations

L'évaluation de la croissance du consortium 4 jours après inoculation suivie de sa viabilité mensuelle durant 56 jours est faite suivant la méthode de dénombrement après dilution décimale décrite par Arora *et al* (2014). Environ 1g ou 1 ml de chaque formulation suivant son état physique est placé dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile puis agiter au vortex. Une série de dilution décimale à partir de ce tube est ensuite effectuée jusqu'à la dilution 10^{-6} . 10 μ l de chaque dilution de 10^{-5} et 10^{-6} sont prélevés et ensemencés sur milieu YEMA en trois répétitions chacun et les boîtes de Pétri sont incubés à $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h. Les colonies individualisées sont comptées après 24 h d'incubation et la charge bactérienne obtenue par calcul du nombre de rhizobia par ml de solution et exprimé en log UFC/ml :

$$C_{N(\text{cellules/suspension})} = \frac{\text{nombre de colonies comptés} \times \text{facteur de dilution}}{\text{Volume d'inoculum déposé}}$$

II.3-5- Milieux de croissance alternatifs du consortium rhizobien

Cette expérimentation est faite suivant la méthode décrite par Ngo mimb *et al* (2014). Seize milieux de croissance sont préparés pour évaluer le développement du consortium. Ces milieux sont riches en carbone comme : le mannitol (fournit par le Centre de Biotechnologie de la Terre de l'Université de Yaoundé I), le saccharose, la mélasse de canne à sucre et le lait en poudre (achetés sur les marchés locaux) ainsi qu'en azote : levure, soja, haricot et pois cajun sous forme d'extraits (tableau 4).

La préparation des extraits est faite selon la méthode de (Somasegaran et Hobben, 1985). L'extrait de levure est préparé à partir de 40 g de levure ajouté dans 1000 ml d'eau distillée stérile. La solution est portée à ébullition, puis décantée, embouteillée et autoclavée à 121°C pendant 30 minutes. Pour les extraits de soja, le poids cajun et le haricot, 100g de poudre de chaque matériau est ajouté à 1000ml d'eau et l'ensemble mixé. Le mélange est ensuite bouilli lentement pendant deux heures, refroidi, décanté, embouteillé et autoclavé à 121°C pendant 30 minutes.

Tableau 4. Propositions de milieux de croissance des rhizobia à base de produits locaux

Pour II Eléments	Différentes formules des milieux															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10
E	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
F	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-
G	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-
H	-	-	-	40	-	-	-	40	-	-	-	40	-	-	-	40
I*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J*	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
K*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A : Mannitol ; **B** : Saccharose ; **C** : Mélasse de canne à sucre ; **D** : Lait en poudre ; **E** : Extrait de soja ; **F** : Extrait de pois cajun ; **G** : Extrait de haricot ; **H** : Extrait de levure ; **I** : NaCl (50mg/ml) ; **J** : MgSO₄ (10 g/l) ; **K** : CaCl₂ (40 g/l) ; **L** : FeCl₃ (4 g/l) mg/ml ; * : Solutions stocks ; le pH de chaque milieu est ajusté 6,8 avant de l'autoclaver à 121°C pendant 20 min.

Quatre colonies de chaque souche sont prélevées des boîtes de Pétri précédentes puis inoculés dans les différents milieux de croissance ci-dessus (tableau 4). La lecture des densités optiques est faite à l'aide du spectrophotomètre à UV visible à 600 nm tous les 24 heures pendant 4 jours au terme desquels, les milieux sont centrifugés à 8000 tr/min à 4° C pendant 20 min (Nwaga et Ngo Nkot, 1998). Le culot obtenu après centrifugation estensemencé dans les boites de pétri contenant le milieu YEMA afin de déterminer la biomasse fraîche (mg /ml) du consortium utilisé.

II.3-6- Techniques d'enrobage des graines

Chaque formulation précédemment préparée est utilisée avec les adhésifs tels que l'huile de palmiste et la poudre de maïs pour l'enrobage des graines. Deux méthodes d'enrobage (Woomer, 2010) étaient utilisées à savoir :

II.3-6-1- La méthode par effluent

Cette méthode consistait à mélanger chaque formulation précédemment préparée avec chaque adhésifs (huile de palmiste et poudre de maïs) séparément, puis y ajouter les graines de soja. Ainsi, pour 0,05g ou 0,05 ml suivant l'état physique de la formulation, ajouter 0,15 ml de solution d'huile de palmiste ou 0,15 g de poudre de maïs et transvasé le mélange dans un récipient contenant 5g de graines de soja. L'ensemble est remué soigneusement ensuite étaler sur une surface propre à l'ombre et enfin semer en champ après 24 h.

II.3-6-2- La méthode de deux par deux

Cette méthode par contre consistait à recouvrir les graines de soja avec l'huile de palmiste ou la poudre de maïs et ensuite y ajouté les différentes formulations. Ainsi 5 g de graines de soja sont placés dans un sachet en plastique ajouté par la suite 0,1 ml d'huile de palmiste ou 0,1 g de poudre de maïs. Le sachet est gonflé, fermé et secoué doucement pendant environ une minute. Environ 0,05g ou de 0,05 ml des différentes formulations est y est ajouté et le tout secoué. Les graines sont étalées sur une surface propre à l'ombre avant d'être semées en champ le lendemain.

II.3-7- Dispositif expérimental 2 : effet des biofertilisants sur la croissance du soja en champ

Les graines de soja enrobées sont semées par trio sur 7 kg de substrat constitué d'un mélange terre noire et sable (3v/v) contenu dans des pots de culture de 5 l. les sachets sont disposés en deux blocs factoriels complètement randomisés correspondant aux deux techniques d'enrobage. Chaque bloc est constitué de deux sous blocs correspondant aux adhésifs utilisés à savoir l'huile de palmiste et la poudre de maïs, et chaque sous bloc est constitué de 10 traitements correspondant aux différentes formulations avec six répétitions chacune (Figure 14). Les traitements effectués sont : un traitement témoin (T0), un traitement avec l'inoculum bactérien (T1), un traitement enrobé de poudre blanche (T1 + Pb). Pour les traitements à l'huile de palmiste, nous avons : T1 + h (inoculum bactérien + huile), T2 + h (B1 + huile), T3 + h (B2 + huile), T4 + h (B3 + huile), T5 + h (B4 + huile), T6 + h (B5 + huile) et T7 + h (B6 + huile). Les mêmes traitements sont répétés pour la poudre de maïs, soit 20 traitements par méthode d'enrobage pour un total de 360 plants par méthode d'enrobage et 720 plants pour tous l'expérimentation.

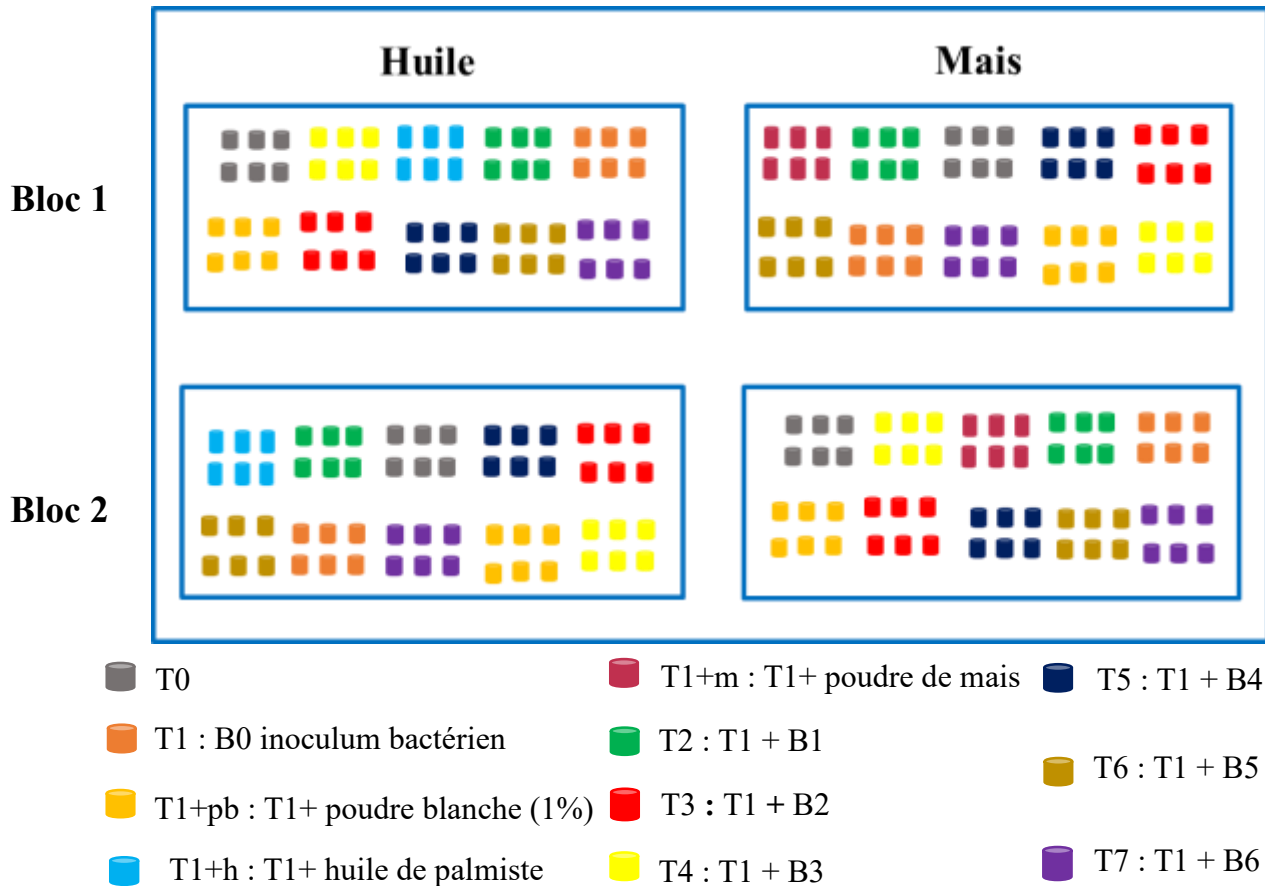


Figure 14. Dispositif expérimental II : Effet des différentes formulations sur les performances du soja en pot.

II.3-8- Evaluation de l'effet des biofertilisants et de la méthode d'enrobage sur les paramètres biochimiques des plantes de soja

II.3-8- 1- Evaluation de l'effet des biofertilisants sur la teneur en chlorophylle totale

La chlorophylle est dosée dans les feuilles adultes récoltées 4 semaines après semis. Environ 2 g de feuilles fraîches sont finement découpées puis broyées dans un mortier avec une pincée de sable stérile et de carbonate de calcium. Le broyat obtenu est déposé dans 20 ml d'éthanol à 90° incubé 3 min à l'air libre. La solution obtenue est filtrée à l'aide d'un entonnoir portant un papier filtre Whatman N°4. Le filtrat est ensuite dilué en ajoutant 50 ml d'éthanol à 90°. La lecture des densités optiques est effectuée à l'aide du spectrophotomètre. La teneur en chlorophylle totale des extraits est obtenue en utilisant la formule d'Arnon (1949).

$$\text{Chlorophylle totale} = (0,0202 \times \text{D.O } 645) - (0,0802 \times \text{D.O } 663) \text{ mg/g (Zinga et al., 2016)}$$

II.3-8- 2- Evaluation de l'effet des biofertilisants sur l'azote total et protéines totales

Le dosage de l'azote total est effectué selon la méthode décrite par (Devani *et al.*, 1989). Les parties aériennes des plantes sont séchées à l'étuve à 65° C pendant 48 h puis broyées et tamisées à l'aide d'un tamis fin. La minéralisation consiste à peser 0,2 g d'échantillon de matière sèche (feuilles broyées) additionnées de 5 ml d'acide sulfurique concentré et 0,5 g de catalyseur de minéralisation. L'ensemble est chauffé à 200° C jusqu'à minéralisation complète (environ 3h), le minéralisat obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Après ajout de quelques gouttes de phénolphtaléine 1%, de la soude à 40 %, les échantillons distillés sont titrés par la solution de H₂SO₄ N/50 jusqu'au virage à la coloration rose. Les densités optiques sont lues à 412 nm au spectrophotomètre. La quantité d'azote de chaque échantillon est déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une solution de sulfate d'ammonium à 0,4 mg/g fraîchement préparée. La teneur en protéines brutes a été obtenue en multipliant la teneur en azote par le facteur conventionnel 6,25.

II.3-9- Collecte des données en champ

Les paramètres de croissance sont mesurés au jour 52 après semis (Vincent, 1970). Ainsi, La taille des plantes est mesurée à l'aide d'une règle graduée ; la surface foliaire déterminée par la formule suivante $S \text{ (cm}^2\text{)} = 2/3 \times L \times l$; le nombre de feuille est déterminé par comptage manuel. En ce qui concerne la nodulation, les plantes sont récoltées, les parties aériennes sont détachées des parties souterraines ; les nodules sont collectés et comptés, leurs masses ainsi que celles des différents organes de la plante déterminée à l'aide d'une balance électronique de précision 0.001g.

II.3-10- Analyses statistiques des données

Les données de chaque paramètre sont collectées et introduites dans le logiciel SPSS version 23.0 pour l'analyse des variances (ANOVA). Le test de Duncan au seuil de 1% a été réalisé pour comparer les moyennes entre elles. Le logiciel Microsoft Excel 2016 a permis de présenter les résultats sous formes d'histogrammes et de courbes avec les moyennes \pm écart type.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Résultats

III.1-1- Authentification des souches de rhizobia

III.1-1-1- Effets des souches de rhizobia sur les paramètres morphologiques

Le tableau 5 présente l'effet des souches de rhizobia testés sur les différents paramètres morphologiques de chaque variété. L'analyse de ce tableau montre que : l'apport de Nka11 dans la rhizosphère entraîne une augmentation significative de la taille des plantes chez les variétés Bafia, Rouge et Brune-Centre comparativement aux témoins. Il en est de même pour la souche Pvnk7 et le consortium Rhizobien BOSD chez les variétés Ecapan-021, Feb-192 et Docko. Pour ce qui du nombre de feuilles, l'apport de la souche Nka11 dans la rhizosphère des plantes entraîne une augmentation considérable ($P \leq 0,01$) de ce paramètre uniquement chez la variété Bafia. L'apport de la souche Pvnk7 entraîne un effet similaire uniquement chez la variété Ecapan-021 et de même que le consortium BOSD chez la variété Docko. Quant à la surface foliaire, l'apport de la souche Nka11 dans la rhizosphère des plantes entraîne une augmentation significative ($P \leq 0,01$) de la surface foliaire chez les variétés Bafia, Rouge et Brune-Centre. Il en est de même pour la souche Pvnk7 chez les variétés Ecapan-021 et Feb-192 et le consortium chez la variété Docko.

Tableau 5. Taille, nombre et surface foliaire des plantes de légumineuses inoculées durant la floraison

Variétés	Traitements	Tailles des plants (cm)	Nombre de feuilles/ plants	Surface foliaire (cm ²)
Var Bafia	T0	18,16 ± 0,60a	5 ± 0,57b	2,37 ± 0,23b
	Nka11	19,83 ± 0,92a	6 ± 0,1a	3,07 ± 0,06a
Var Rouge-Centre	T0	25,67 ± 0,88b	20 ± 0,1a	1,27 ± 0,24b
	Nka11	28,33 ± 0,88a	20 ± 0a	1,77 ± 0,23a
Var Brune-Centre	T0	26,33 ± 0,44b	20 ± 0a	1,4 ± 0,11b
	Nka11	30,33 ± 0,33a	20 ± 0a	1,77 ± 0,08a
Ecapan-021	T0	19 ± 0,57a	6 ± 0b	7,06 ± 0,20b
	Pvnk7	20,33 ± 1,2a	7 ± 0,57a	8,54 ± 0,34a
Feb-192	T0	20,33 ± 0,33b	6 ± 0a	2,54 ± 0,36b
	Pvnk7	22 ± 0,57a	6 ± 0a	3,32 ± 0,34a
Var Docko	T0	26,67 ± 0,33b	14 ± 0b	8,68 ± 0,34b
	BOSD	35,33 ± 0,88a	16 ± 0,57a	15,55 ± 0,74a

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et n=3.

III.1-1-2- Effets des souches de rhizobia sur la nodulation et la biomasse fraîche

Le nombre et le poids des nodules des différents plants traités sont consignés dans le tableau 7. Il en ressort de son analyse que : l'apport des souches de rhizobia influence significativement ($P \leq 0,01$) le nombre et le poids des différentes variétés par rapport aux Témoins. Il en est de même pour la biomasse totale fraîche par conséquent la biomasse aérienne et racinaire fraîche avec des effets variant de 46 % pour la variété Bafia, 68 % pour la variété Rouge-Centre et 67 % pour celle Brune-Centre chez les plantes inoculées avec la souche Nka11. Des effets de 49 % pour la variété Ecapan-021 et de 51 % pour Feb-192 avec la souche Pvnk7 et de 72 % pour la variété Docko avec le consortium BOSD.

Tableau 6. Caractéristiques de la nodulation et les biomasses organes des plantes de légumineuses inoculées durant la floraison

Variétés	Traitements	Nombre de nodules /plants	Poids des nodules (g/plants)	Biomasse aérienne fraîche (g/plants)	Biomasse racinaire fraîche (g/plants)	Biomasse totale fraîche (g/plants)	Effet (%)
Var Bafia	T0	0b	0b	0,74 ± 0,02b	0,52 ± 0,04b	1,26 ± 0,03b	-
	Nka11	6,33 ± 0,33a	0,22 ± 0,01a	1,07 ± 0,07a	0,76 ± 0,03a	1,84 ± 0,11a	+ 46
Var Rouge-Centre	T0	0b	0b	0,94 ± 0,01b	0,63 ± 0,01b	1,57 ± 0,02b	-
	Nka11	8,67 ± 0,33a	0,26 ± 0,01a	1,52 ± 0,04a	1,11 ± 0,04a	2,63 ± 0,11a	+ 68
Var Brune-Centre	T0	0b	0b	0,97 ± 0,07b	0,67 ± 0,04b	1,65 ± 0,11b	-
	Nka11	6,33 ± 0,33a	0,19 ± 0,006a	1,65 ± 0,1a	1,1 ± 0,05a	2,75 ± 0,15a	+ 67
Ecapan-021	T0	0b	0b	0,95 ± 0,02b	0,5 ± 0,03b	1,46 ± 0,05b	-
	Pvnk7	10 ± 0,57a	0,29 ± 0,008a	1,47 ± 0,08a	0,7 ± 0,04a	2,18 ± 0,11a	+ 49
Feb-192	T0	0b	0b	0,83 ± 0,03b	0,32 ± 0,01b	1,15 ± 0,03b	-
	Pvnk7	6,67 ± 0,33a	0,17 ± 0,003a	1,03 ± 0,07a	0,7 ± 0,03a	1,74 ± 0,05a	+ 51
Var Docko	T0	0b	0b	1,2 ± 0,05b	0,46 ± 0,03b	1,66 ± 0,08b	-
	BOSD	13,33 ± 0,66a	0,52 ± 0,003a	1,83 ± 0,21a	1,06 ± 0,08a	2,86 ± 0,14a	+ 72

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=3$.

III.1-2- Viabilité des souches de rhizobia dans les formulations de biofertilisants

III.1-2-1- Analyses physico-chimiques des différents matériaux de formulation

Les caractéristiques des différents matériaux pour la formulation sont présentées dans le tableau 7. L'analyse de celui-ci montre d'une part que, certains matériaux sont acides (pH variant entre 4,82 et 6,7), d'autres basiques (pH variant entre 7,8 et 9,68) et d'autre part que, Les taux en carbone et en azote total dans les différents supports relèvent une abondance chez

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

la mélasse de canne à sucre par rapport au substrat d'enrobage. La teneur en phosphore quant à elle, est plus abondante dans la bouse de bœuf et moins dans la poudre blanche.

Tableau 7. Propriétés physicochimiques des matériaux pour la formulation des biofertilisants

Echantillons	Supports solides							Supports liquides	
	Biochar de coques d'arachides et feuilles de litières	Charbon de bois	Bouse de de bœuf	Poudre blanche (coquille)	Poudre de pois cajun	Substrat d'enrobage	Terre de champ Garoua	Digestat	Mélasse de canne à sucre
Paramètres									
pH-eau	8,2	7,8	8,4	8,3	6,3	6,7	6,0	9,68	4,82
Matières organiques									
Mo (%)	94,60	76,30	64,90	3,70	95,50	2,76	3,31	Nd	Nd
Co (%)	47,30	38,15	32,47	1,85	47,75	1,60	1,92	17,05	49,60
No tot (%)	1,67	0,84	2,11	0,13	3,11	0,12	0,14	74,67	1520,40
Cations échangeables (mg/100g)									
Calcium	1290	890	1770	1050	610	7,60	2	Nd	Nd
Magnésium	72	403	184	62	378	10	1,20	Nd	Nd
Potassium	1526	6628	3091	56	5268	2,26	0,71	Nd	Nd
Sodium	96	574	245	80	392	0,21	0,05	Nd	Nd
P disponible (mg/Kg)	29,06	9,26	323,66	1,20	116,7	2,13	3,89	Nd	Nd

N tot : azote totale ; **MO** : matière organique ; **CO** : carbone ; **P** : phosphore ; **Nd** : non déterminé.

III. 1-2-2- Effets des formulations sur la croissance du consortium rhizobien BOSD

La croissance du consortium a été évaluée sur toutes les formules développées. Les valeurs des différentes charges bactériennes sont exprimées en log UFC/ ml présenté dans la figure 15. L'analyse de cette figure montre que les charges dans les différentes formules croissent de manières exponentiels. Par ailleurs on n'observe pas de différences significatives entre les traitements B1, B4 (8,73 et 8,74 log UFC/ ml) et le traitement témoin B0 (8,72 log UFC/ml). La formule B3 (8,89 log UFC/ml) quant à elle, a la charge la plus élevée par rapport aux autres formules.

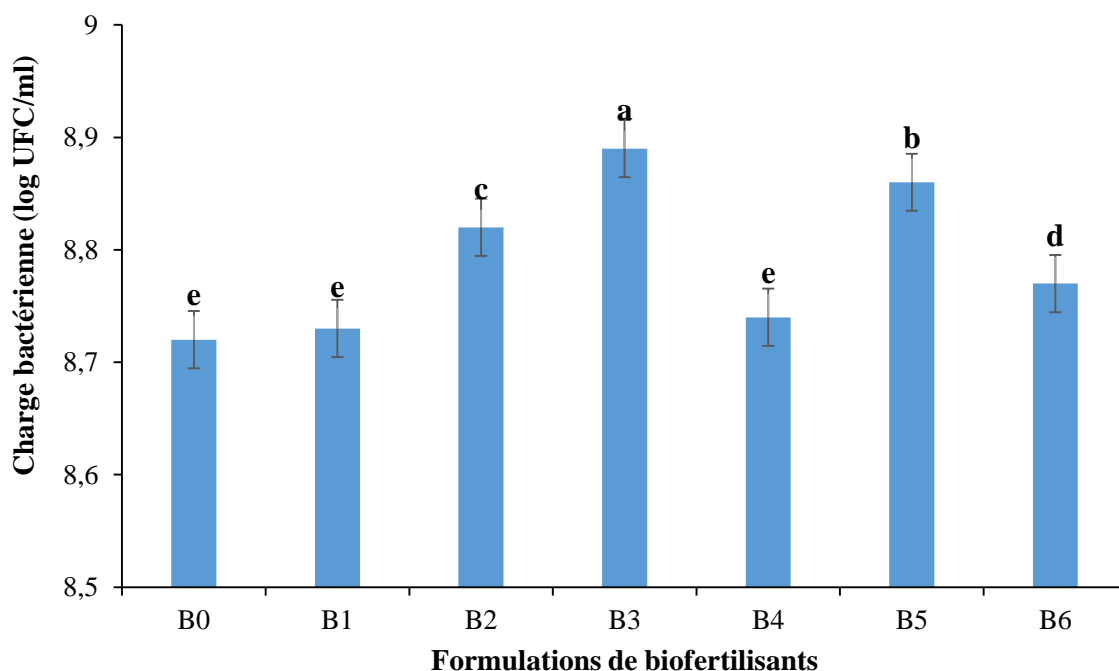


Figure 15. Croissance du consortium dans les différentes formulations après 4 jours d'incubation.

B0 : YMB ; B1 : YMB + biochar (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %) ; B2 : YMB + charbon (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %) ; B3 : Extrait de poids cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml) ; B4 : Digestat ; B5 : Extrait de pois cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml) + 1 % de poudre blanche ; B6 : Digestat +1 % poudre blanche.

III.1-2-3- Viabilité du consortium rhizobien dans les différentes formulations

La viabilité du consortium dans les différentes formulations a été évaluée tous les 7 jours (7^e, 14^e, 21^e, 28^e, 35^e, 42^e, 49^e et 56^e jour) pendant 2 mois après la croissance. Les résultats sont consignés dans la figure 16 et exprimés en log UFC/ml. L'analyse de celle-ci montre que l'allure générale des courbes est décroissante, ainsi la viabilité diminue avec la durée de conservation des différentes formulations de biofertilisants. Toutes les formules (B1 à B6) ont des charges variant entre 6,5 et 6,74 log UFC/ml par rapport au témoin B0 (6,49 log UFC/ml) après 56 jour de dénombrement. La formule B5 (6,74 log UFC/ml) a la charge bactérienne la plus élevée par rapport aux autres formules et la formule B3(6,5 log UFC/ ml) la plus faible.

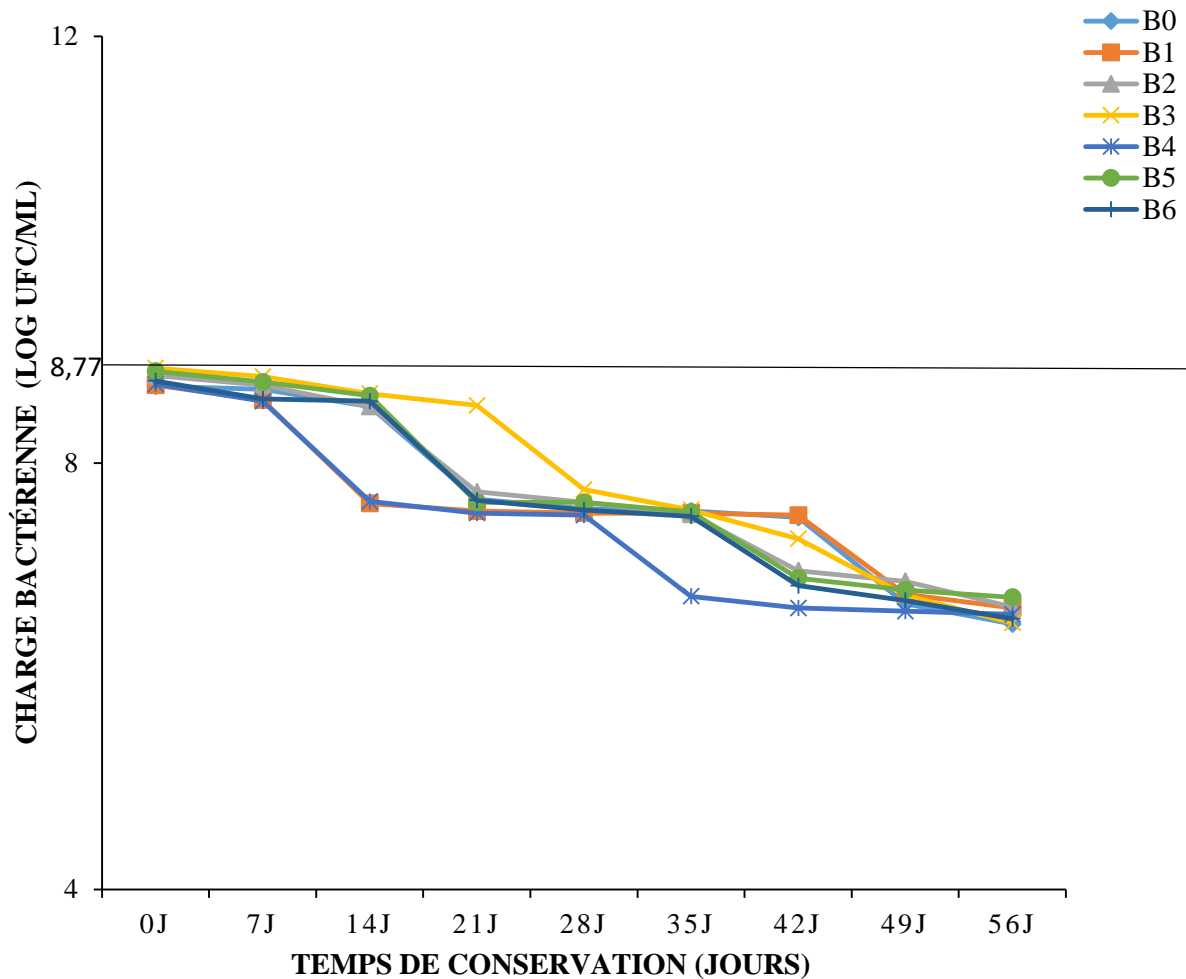


Figure 16. Viabilité du consortium rhizobien dans les formulations en fonction du temps.

B0 : YMB ; B1 : YMB + biochar (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %) ; B2 : YMB + charbon (5 %) + substrat d'enrobage (10 %) + poudre de blanche (5 %) + terre de champ (20 %) + bouse de bœuf (60 %) ; B3 : Extrait de poids cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml) ; B4 : Digestat ; B5 : Extrait de pois cajan (98 ml) + mélasse de canne à sucre (2 ml) + 1 % de poudre blanche ; B6 : Digestat +1 % poudre blanche.

III.1-2-4- Milieux de croissance alternatifs du consortium Rhizobien

La charge bactérienne a été déterminée tous les 24 h pendant 4 jours dans 16 milieux alternatifs (figure 17). L'analyse de cette figure montre que : dans les milieux enrichis en saccharose, l'apport des sources d'azote permet une augmentation de la charge bactérienne dans tous les milieux à l'exception de l'extrait de soja dont les charges restent constantes. Pour les autres milieux enrichis en mannitol, lait en poudre et mélasse de canne à sucre, l'apport des extraits enrichis en source d'azote ont permis une augmentation des charges bactériennes du consortium durant la période d'évaluation.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

Tableau 8. Effets des biofertilisants sur la taille, le nombre de feuilles et la surface foliaire des plants de soja pour la méthode d'enrobage par effluent

Paramètres Traitements	Tailles des plants (cm)	Nombre de feuilles / plants	Surface foliaire (cm ²)
T0	25,67 ± 0,44g	14 ± 0,57efg	9,48 ± 0,42ghi
T1	33,41 ± 0,71bcd	13,83 ± 0,40fg	13,78 ± 0,33bc
T1 + h	33,33 ± 0,54bcd	15,83 ± 0,70abcdefg	11,77 ± 0,64cdefg
T1 + m	32,66 ± 0,65cde	15,83 ± 0,70abcdefg	13,49 ± 0,66bcd
T1 + Pb	28,75 ± 0,30f	14,67 ± 0,33defg	9,82 ± 0,61ghi
T2 + h	30,08 ± 0,93ef	14,83 ± 0,54cdefg	9,40 ± 0,74hi
T2 + m	34,58 ± 0,78bc	15,33 ± 0,49bcdefg	13,29 ± 0,63bcde
T3 + h	28,67 ± 0,66f	14,67 ± 0,49defg	10,45 ± 0,74fgh
T3 + m	35,91 ± 0,35ab	16,83 ± 0,16abcd	14,44 ± 0,36b
T4 + h	37,25 ± 0,87a	18,17 ± 0,98a	14,99 ± 0,91a
T4 + m	33,5 ± 0,84bcd	16,33 ± 0,49abcdef	13,26 ± 0,56bcde
T5 + h	32,33 ± 1,09cde	17,17 ± 0,60abc	12,53 ± 0,33bcdef
T5 + m	32,91 ± 0,49cd	15,83 ± 0,54abcdefg	14,75 ± 0,42ab
T6 + h	31 ± 0,51def	16,67 ± 0,49abcde	11,63 ± 0,55cdefgh
T6 + m	25,25 ± 0,47g	12,33 ± 0,49g	7,81 ± 0,26i
T7 + h	31,25 ± 0,44def	17,33 ± 0,42ab	11,30 ± 0,25defgh
T7 + m	28,75 ± 0,30f	14,33 ± 0,66efgh	10,96 ± 0,46efgh

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

Tableau 9. Effets des biofertilisants sur la taille, le nombre de feuilles et la surface foliaire des plants de soja pour la méthode de deux par deux.

Paramètres Traitements	Tailles des plants (cm)	Nombre de feuilles / plants	Surface foliaire (cm ²)
T0	25,67 ± 0,44h	14 ± 0,57cd	9,48 ± 0,42 e
T1	33,41 ± 0,71de	13,83 ± 0,40cd	13,78 ± 0,33b
T1 + h	33,33 ± 0,54de	15,83 ± 0,70abc	11,77 ± 0,64bcde
T1 + m	32,67 ± 0,65de	15,83 ± 0,70abc	13,49 ± 0,66bc
T1 + Pb	28,75 ± 0,30fgh	14,67 ± 0,33bcd	9,82 ± 0,61de
T2 + h	29,17 ± 0,58fg	13 ± 0,77d	10 ± 0,99de
T2 + m	31,17 ± 0,94def	15,83 ± 0,47abc	9,89 ± 0,53de
T3 + h	30,33 ± 0,71ef	13,50 ± 0,5cd	9,49 ± 0,78 e
T3 + m	40,58 ± 1,08a	17,33 ± 0,66a	23,09 ± 0,92a
T4 + h	39,83 ± 1,19a	15,33 ± 0,55abcd	10 ± 0,66de
T4 + m	36,58 ± 1,14bc	16,83 ± 0,79ab	14,23 ± 0,55b
T5 + h	27,08 ± 0,32gh	14 ± 0,36cd	9,04 ± 0,27 e
T5 + m	28,75 ± 0,92fgh	15,33 ± 0,61abcd	9,59 ± 0,45 e
T6 + h	31,75 ± 0,47def	14 ± 0,36cd	14,41 ± 0,99b
T6 + m	33,75 ± 0,85cd	15,5 ± 0,5abc	12,44 ± 0,80bcd
T7 + h	37,67 ± 0,51ab	14 ± 0,51cd	9,67 ± 0,46de
T7 + m	33,91 ± 0,93cd	16,67 ± 0,55ab	10,99 ± 0,41cde

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

III.1-3-2- Effets des formulations et de la méthode d'enrobage sur la nodulation des plantes de soja

Le nombre et le poids des nodules ont été évalués ainsi que l'effet de la nodulation sur les plantes de soja. Les différentes valeurs sont présentées dans les tableaux 10 et 11. Leur analyse montre que l'apport des biofertilisants entraîne une augmentation significative du nombre et du poids des nodules peu importe la méthode d'enrobage. Pour ce qui est de l'effet de la nodulation sur les plantes de soja, les traitements T2 + m, T3 + m et T4 + h ont des effets plus importants (+163, +191 et +178 % respectivement) que les autres traitements par rapport à T1 ceci pour la première méthode d'enrobage. Le traitement T6 + h par contre a un effet moins important (-14 %) par rapport à T1 de même que le traitement T1 + Pb (-18 %) (tableau 10).

Tableau 10. Effets des biofertilisants sur la nodulation des plants de soja pour la méthode d'enrobage par effluent.

Paramètres Traitements	Nombre de nodules /plant	Effet /T1 (%)	Poids des nodules (mg/plant)
T0	0j	-	0n
T1	3,67 ± 0,21ghi	-	62,17 ± 0,40j
T1 + h	4,5 ± 0,22dfgh	+54	70,33 ± 0,21i
T1 + m	5,5 ± 0,22def	+50	73,17 ± 0,3h
T1 + Pb	3 ± 0,36i	-18	28,83 ± 0,3m
T2 + h	5,67 ± 0,3de	+23	84,33 ± 0,21f
T2 + m	10 ± 0,51ab	+163	164,58 ± 0,45ab
T3 + h	4,83 ± 0,3efg	+32	81,5 ± 0,42g
T3 + m	10,67 ± 0,33a	+191	181,33 ± 0,66a
T4 + h	8 ± 0,36c	+178	179 ± 0,25ab
T4 + m	4 ± 0,25fghi	+89	99,5 ± 0,61 e
T5 + h	5,33 ± 0,33def	+45	149,58 ± 0,63bc
T5 + m	6,5 ± 0,42d	+77	59,58 ± 0,73k
T6 + h	3,17 ± 0,3hi	-14	57,5 ± 0,42l
T6 + m	5,17 ± 0,47def	+41	80,33 ± 0,66g
T7 + h	6 ± 0,36de	+63	114,33 ± 0,35d
T7 + m	8,67 ± 0,66bc	+145	164,5 ± 0,5ab

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

Pour la méthode d'enrobage de deux par deux, le traitement T7 + h a un effet plus important (+250 %) que les autres traitements par rapport à T1. Par ailleurs, les traitements T2 + h, T5 + h (-5 %) et T7 + m (-14 %) ont des effets moins importants par rapport à T1 (tableau 11).

Tableau 11. Effets des biofertilisants sur la nodulation des plants de soja pour la méthode d'enrobage de deux par deux.

Paramètres Traitements	Nombre de nodules /plant	Effet /T1 (%)	Poids des nodules (mg/plant)
T0	0j	-	0m
T1	3,67 ± 0,21hi	-	62,17 ± 0,4i
T1 + h	4,5 ± 0,22ghi	+54	70,33 ± 0,21h
T1 + m	5,5 ± 0,22fg	+50	73,17 ± 0,3h
T1 + Pb	3 ± 0,36i	-18	28,83 ± 0,3l
T2 + h	3,5 ± 0,42hi	-5	100,5 ± 1,33 e
T2 + m	4 ± 0,25ghi	+8	84,33 ± 0,66g
T3 + h	5 ± 0,36gh	+36	90,5 ± 0,76f
T3 + m	9,5 ± 0,34bc	+118	132,67 ± 1,33c
T4 + h	10,67 ± 0,49b	+191	151,83 ± 2,33b
T4 + m	8,17 ± 0,47cd	+122	113,5 ± 0,92c
T5 + h	3,5 ± 0,34hi	-5	39,5 ± 0,76k
T5 + m	4 ± 0,36ghi	+8	56 ± 0,73j
T6 + h	6,5 ± 0,67ef	+77	110,33 ± 0,84cd
T6 + m	7,83 ± 0,47de	+113	109,33 ± 0,66d
T7 + h	12,83 ± 0,47a	+250	178,83 ± 0,83a
T7 + m	3,17 ± 0,3i	-14	70,5 ± 0,92h

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

III.1-3-3- Effets des formulations et de la méthode d'enrobage sur le rendement des plantes de soja

Les rendements en biomasse ainsi que leurs effets ont été évalués et les résultats sont consignés dans les tableaux 12 et 13. L'analyse de ces différents tableaux montre que : l'apport des biofertilisants entraîne une augmentation significative des différentes biomasses pour les deux méthodes d'enrobage. Pour la méthode d'enrobage par effluent, les traitements T3 + h et T4 + h ont des effets plus importants en terme de biomasse totale fraîche (+160 % et +200 %)

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

par rapport à T1. Par contre, les traitements T4 + m et T6 + m ont des effets moins importants en biomasse totale fraîche (-70 % et -40 %) par rapport à T1 (tableau 12).

Tableau 12. Effets des biofertilisants sur la biomasse des plantes de soja pour la méthode d'enrobage par effluent

Paramètres Traitements	BAF (g/plant)	Effet (%)	BRF (g/plant)	Effet (%)	BAS (g/plant)	BRS (g/plant)	BTF (g/plant)	Effet /T0 (%)	Effet /T1 (%)	BTS (g/plant)
T0	0,47 ± 0,03f	-	0,37 ± 0,02f	-	0,28 ± 0,03cde	0,24 ± 0,02cde	0,83 ± 0,05h	-	-	0,54 ± 0,04def
T1	1,01 ± 0,11bcd	+115	1,12 ± 0,11de	+200	0,37 ± 0,02bcd	0,3 ± 0,02abcd	2,14 ± 0,16cde	+150	-	0,67 ± 0,02bcd
T1 + h	0,94 ± 0,006cdef	+100	0,29 ± 0,03f	-15,7	0,32 ± 0,21cde	0,1 ± 0,004f	1,27 ± 0,08fgh	+48,3	-102	0,39 ± 0,03f
T1 + m	0,9 ± 0,01cdef	+93,3	0,42 ± 0,02f	-16,2	0,31 ± 0,01cde	0,15 ± 0,009ef	1,21 ± 0,05fgh	+42,4	-108	0,57 ± 0,04cde
T1 + Pb	0,53 ± 0,04ef	+13	0,44 ± 0,03f	+19	0,31 ± 0,02cde	0,25 ± 0,01bcd	0,97 ± 0,08gh	+14	-136	0,56 ± 0,04de
T2 + h	1,1 ± 0,07bcd	+143	1,31 ± 0,02cd	+254	0,28 ± 0,02cde	0,23 ± 0,02cde	2,45 ± 0,27cd	+190	+40	0,52 ± 0,02def
T2 + m	1,39 ± 0,13bc	+196	0,97 ± 0,06de	+162	0,46 ± 0,05ab	0,29 ± 0,02abcd	2,36 ± 0,25cd	+200	+50	0,76 ± 0,04ab
T3 + h	1,25 ± 0,11bc	+166	2,24 ± 0,17a	+500	0,33 ± 0,03bcde	0,28 ± 0,01abcd	3,49 ± 0,35ab	+310	+160	0,61 ± 0,02bcd
T3 + m	1,44 ± 0,14ab	+206	1,29 ± 0,12cd	+249	0,52 ± 0,03a	0,34 ± 0,03ab	2,73 ± 0,09c	+220	+70	0,87 ± 0,06a
T4 + h	1,85 ± 0,12a	+294	2,01 ± 0,08ab	+443	0,52 ± 0,02a	0,38 ± 0,02a	3,87 ± 0,11a	+350	+200	0,9 ± 0,02a
T4 + m	0,69 ± 0,06def	+47	0,84 ± 0,07e	+127	0,2 ± 0,01 ^e	0,21 ± 0,03de	1,55 ± 0,05efg	+80	-70	0,42 ± 0,04ef
T5 + h	1,21 ± 0,07bc	+157	1,67 ± 0,13bc	+351	0,35 ± 0,02bcd	0,28 ± 0,01abcd	2,88 ± 0,16bc	+240	+90	0,64 ± 0,04bcd
T5 + m	1,03 ± 0,12bcd	+121	0,84 ± 0,07e	+127	0,35 ± 0,02bcd	0,24 ± 0,01bcde	1,83 ± 0,04def	+120	-30	0,6 ± 0,04bcd
T6 + h	1,17 ± 0,09bcd	+149	1,68 ± 0,15bc	+354	0,38 ± 0,04bc	0,28 ± 0,01abcd	2,85 ± 0,22bc	+240	+90	0,66 ± 0,05bcd
T6 + m	0,9 ± 0,08cdef	+91	0,89 ± 0,08de	+140	0,23 ± 0,01de	0,31 ± 0,02abcd	1,79 ± 0,05def	+110	-40	0,54 ± 0,04def
T7 + h	0,97 ± 0,25bcde	+106	0,91 ± 0,13de	+146	0,34 ± 0,07bcd	0,24 ± 0,04bcde	1,88 ± 0,1def	+120	-30	0,59 ± 0,006bcde
T7 + m	1,25 ± 0,12bc	+166	1,07 ± 0,11de	+189	0,39 ± 0,01abc	0,33 ± 0,02abc	2,46 ± 0,34cd	+172	+22	0,74 ± 0,04abc

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

Pour la méthode d'enrobage de deux par deux, le traitement T7 + h a un effet plus important en terme de biomasse totale (+250 %) par rapport à T1. Par ailleurs, les traitements T5 + h et

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

T6 + m ont des effets moins importants en biomasse totale (-80 % et -95 %) par rapport à T1 (tableau 13).

Tableau 13. Effets des biofertilisants sur la biomasse des plantes de soja pour la méthode d'enrobage de deux par deux.

Paramètres Traitements	BAF (g/plant)	Effet (%)	BRF (g/plant)	Effet (%)	BAS (g/plant)	BRS (g/plant)	BTF (g/plant)	Effet /T0 (%)	Effet /T1 (%)	BTS (g/plant)
T0	0,47 ± 0,03f	-	0,37 ± 0,02ij	-	0,28 ± 0,03e	0,24 ± 0,02def	0,83 ± 0,05h	-	-	0,54 ± 0,04de
T1	1,01 ± 0,11cd	+115	1,12 ± 0,11bcd	+200	0,37 ± 0,02cde	0,3 ± 0,02bcde	2,14 ± 0,16cd	+150	-	0,68 ± 0,02abcde
T1 + h	0,94 ± 0,006cde	+100	0,29 ± 0,03j	-15,7	0,32 ± 0,01de	0,1 ± 0,004g	1,27 ± 0,08efgh	+48,3	-102	0,39 ± 0,03e
T1 + m	0,9 ± 0,01cde	+93,3	0,42 ± 0,02hij	-16,2	0,31 ± 0,01de	0,15 ± 0,009fg	1,21 ± 0,05fgh	+42,4	-108	0,57 ± 0,04cde
T1 + Pb	0,53 ± 0,04ef	+13	0,44 ± 0,03hij	+19	0,31 ± 0,02de	0,25 ± 0,01def	0,97 ± 0,08gh	+14	-136	0,56 ± 0,04de
T2 + h	0,94 ± 0,05cde	+100	0,81 ± 0,05efg	+119	0,49 ± 0,02abc	0,46 ± 0,05a	1,75 ± 0,19cdefg	+105	-45	0,95 ± 0,11a
T2 + m	0,93 ± 0,09cde	+102	0,91 ± 0,07def	+146	0,48 ± 0,05abc	0,4 ± 0,02ab	1,86 ± 0,17cdef	+120	-30	0,89 ± 0,08ab
T3 + h	0,98 ± 0,07cd	+109	0,98 ± 0,08cde	+165	0,49 ± 0,03abc	0,37 ± 0,04abc	1,97 ± 0,23cdef	+131	-19	0,86 ± 0,09abc
T3 + m	0,81 ± 0,09cdef	+72	0,66 ± 0,02fghi	+78	0,56 ± 0,01a	0,38 ± 0,03abc	1,48 ± 0,15defgh	+73	-77	0,95 ± 0,08a
T4 + h	1,73 ± 0,13b	+268	1,24 ± 0,1bc	+235	0,53 ± 0,03ab	0,35 ± 0,02abcd	2,98 ± 0,33b	+250	+100	0,89 ± 0,05ab
T4 + m	1,09 ± 0,07cd	+132	1 ± 0,4cde	+170	0,43 ± 0,02bcd	0,33 ± 0,33bcde	2,09 ± 0,08cde	+145	-5	0,77 ± 0,08abcd
T5 + h	0,74 ± 0,06def	+57	0,71 ± 0,06efgh	+119	0,32 ± 0,01de	0,3 ± 0,02bcde	1,45 ± 0,13defgh	+70	-80	0,62 ± 0,05bcde
T5 + m	0,88 ± 0,05cde	+87	1,11 ± 0,09bcd	+203	0,28 ± 0,01e	0,29 ± 0,02bcde	2 ± 0,21cdef	+135	-15	0,57 ± 0,04cde
T6 + h	1,18 ± 0,09c	+119	0,82 ± 0,08efg	+122	0,31 ± 0,01de	0,22 ± 0,02ef	1,85 ± 0,21cdef	+120	-30	0,53 ± 0,04de
T6 + m	0,74 ± 0,06def	+57	0,58 ± 0,03ghij	+57	0,43 ± 0,03de	0,28 ± 0,01cde	1,32 ± 0,12defgh	+55	-95	0,71 ± 0,07abcd
T7 + h	2,28 ± 0,24a	+385	1,81 ± 0,06a	+389	0,6 ± 0,04a	0,34 ± 0,02abcd	4,10 ± 0,41a	+400	+250	0,94 ± 0,09a
T7 + m	1,19 ± 0,1c	+153	1,37 ± 0,11b	+270	0,38 ± 0,02cde	0,35 ± 0,03abcd	2,56 ± 0,15bc	+200	+50	0,74 ± 0,08abcd

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

III.1-3-4- Effets des biofertilisants et de la méthode d'enrobage sur la teneur en chlorophylle totale des plantes de soja

La teneur en chlorophylle totale a été déterminée 4 semaines après le semis et les résultats sont présentés dans la figure 19. L'analyse de celle-ci montre que : le traitement T4 + h a une teneur élevée en chlorophylle totale (125) avec un effet de (+11 %) par rapport à T0. Le traitement T4 + m quant à lui représente la plus faible teneur en chlorophylle totale (113) par rapport à T0 ceci pour la première méthode d'enrobage (figure 19 A). Pour la seconde méthode d'enrobage, c'est le traitement T7 + h qui a une teneur en chlorophylle totale élevée (122) avec un effet de (8 %) par rapport à T0 et les traitement T3 + h et T4 + m ont les plus faibles teneurs en chlorophylle totale (111,18 et 112 respectivement) avec des effets de (-1 % et -0,4 %) par rapport à T1 (figure 19 B).

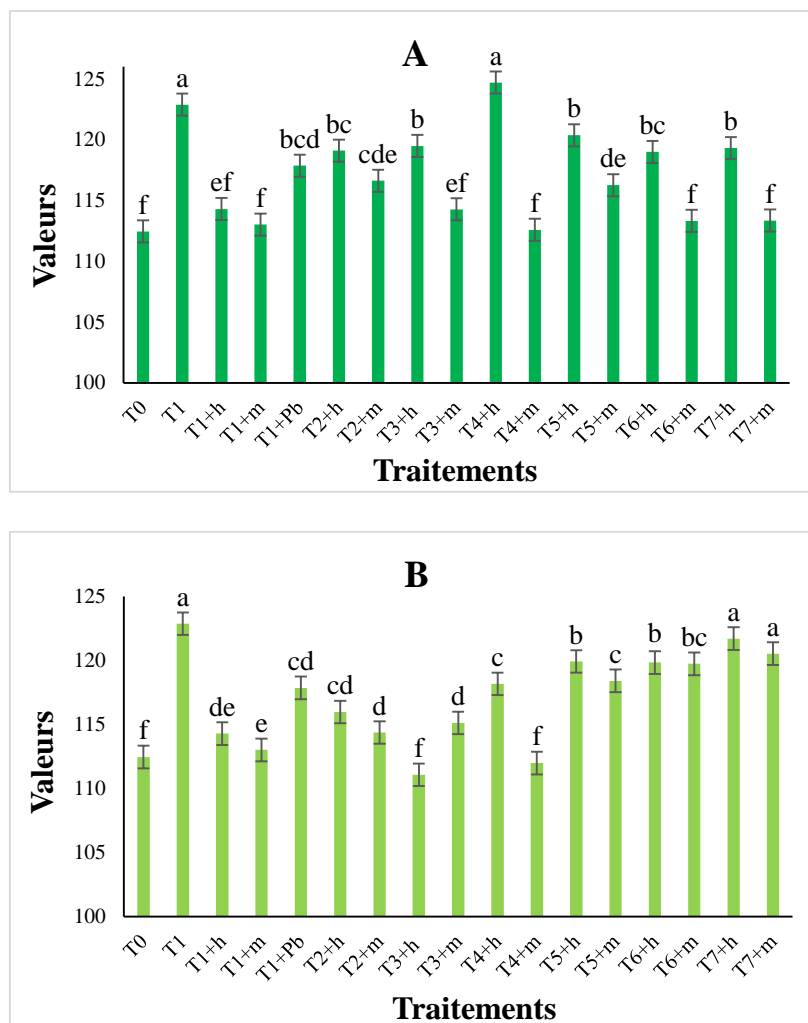


Figure 18. Effets des biofertilisants sur la teneur en chlorophylle totale dans les plantes de soja

A : méthode par effluent ; **B :** méthode de deux par deux.

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et $n=6$.

III.1-3-5- Effets des biofertilisants et de la méthode d'enrobage sur les teneurs en azote et en protéine totale des plantes de soja

Les teneurs en azote totale et protéine totale ont été déterminé dans les différents traitements après la récolte des feuilles. Les tableaux 14 et 15 présentent les valeurs de ces différents paramètres. L'analyse des données montre l'apport des biofertilisants entraine une augmentation significative de ces deux paramètres quel qu'en soit la méthode d'enrobage utilisée. Pour la première méthode d'enrobage, le traitement T4 + h augmente de manière significatif ($P \leq 0,01$) les teneurs en azote et protéine totale des plants de soja avec des effets de +861 et +935 % respectivement par rapport T1. Par contre, le traitement T3 + m a des effets faibles pour ces deux paramètres (-241 et -230 % respectivement) (tableau 14).

Tableau 14. Effets des biofertilisants sur les teneurs en azote et en protéine totale des plants de soja pour la méthode par effluent

Paramètres Traitements	Azote totale (mg/g)	Effets /T0 (%)	Effets /T1 (%)	Protéine totale (mg/g)	Effet s /T0 (%)	Effets /T1 (%)
T0	2,60 ± 0j	-	-	16,28 ± 0j	-	-
T1	8,68 ± 0,87h	+241	-	54,25 ± 5,42h	+230	-
T1 + h	13,02 ± 0f	+400	+159	81,38 ± 0f	+400	+170
T1+ m	10,42 ± 0g	+301	+60	65,10 ± 0g	+300	+70
T1 + Pb	5,21 ± 0i	+100	-141	32,55 ± 0i	+100	-130
T2 + h	14,76 ± 0,87e	+500	+259	92,23 ± 5,42e	+467	+237
T2 + m	13,02 ± 0f	+400	+159	81,38 ± 0f	+400	+170
T3 + h	28,85 ± 0,2b	+1010	+769	180,31 ± 1,25b	+1008	+778
T3 + m	2,60 ± 0j	0	-241	16,28 ± 0 j	0	-230
T4 + h	31,25 ± 0a	+1102	+861	195,31 ± 0a	+1165	+935
T4+ m	3,47 ± 0,87j	+33,4	-208	21,70 ± 5,42j	+35	-195
T5 + h	26,24 ± 0,2c	+909	+668	164,02 ± 1,26c	+907	+677
T5 + m	7,61 ± 0,2h	+193	-48	47,57 ± 1,25 h	+192	-38
T6 + h	18,23 ± 0d	+601	+360	113,93 ± 0d	+600	+270
T6 +m	7,81 ± 0h	+200	-41	48,83 ± 0h	+200	-30
T7 + h	13,02 ± 0f	+400	+159	81,38 ± 0f	+400	+170
T7 + m	5,21 ± 0i	+100	-141	32,55 ± 0i	+100	-130

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et n=6.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

Pour la seconde méthode d'enrobage, le traitement T7 + h qui présente aussi une augmentation significative ($P \leq 0,01$) pour ces deux paramètres avec des effets de +759 et +768 % respectivement par rapport à T1. Par ailleurs, le traitement T2 + h a les mêmes effets que le traitement T3 + m pour la première méthode d'enrobage (tableau 15).

Tableau 15. Effets des biofertilisants sur les teneurs en azote et en protéine totale des plants de soja pour la méthode de deux par deux

Paramètres Traitements	Azote totale (mg/g)	Effets /T0 (%)	Effets /T1 (%)	Protéine totale (mg/g)	Effets /T0 (%)	Effets /T1 (%)
T0	2,60 ± 0g	-	-	16,28 ± 0g	-	-
T1	8,68 ± 0,87e	+241	-	54,25 ± 5,42e	+230	-
T1 + h	13,02 ± 0d	+400	+159	81,38 ± 0d	+400	+170
T1+ m	10,42 ± 0e	+301	+60	65,10 ± 0e	+300	+70
T1 + Pb	5,21 ± 0f	+100	-141	32,55 ± 0f	+100	-130
T2 + h	2,60 ± 0g	0	-241	16,28 ± 0g	0	-230
T2 + m	13,03 ± 0,01d	+438	+197	81,58 ± 0,2d	+429	+199
T3 + h	2,62 ± 0,02g	+0,76	-240	16,39 ± 0,11g	+0,67	-229
T3 + m	7,74 ± 0,06e	+198	-43	48,55 ± 0,27e	+198	-32
T4 + h	23,23 ± 0,2b	+793	+552	145,32 ± 0,27b	+793	+563
T4+ m	23,37 ± 0,06b	+799	+558	146,07 ± 0,40b	+797	+567
T5 + h	5,21 ± 0f	+100	-141	32,55 ± 0gf	+100	-130
T5 + m	12,99 ± 0,86d	+400	+159	81,25 ± 0,12d	+400	+170
T6 + h	10,42 ± 0e	+301	+60	65,10 ± 0e	+300	+70
T6 +m	5,21 ± 0f	+100	-141	32,55 ± 0f	+100	-130
T7 + h	28,61 ± 0,03a	+1000	+759	178,81 ± 0,22a	+998	+768
T7 + m	15,63 ± 0c	+501	+260	97,66 ± 0c	+502	+272

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil ($P \leq 0,01$) et n=6.

III.2- Discussion

III.2-1- Authentification des souches de rhizobia

L'augmentation des paramètres de croissance observée chez les variétés de légumineuse testées en condition semi contrôlée serait due à l'effet spécifique de chaque souche bactérienne à son hôte (Cleyet-Maret et *al.*, 1996) ; ainsi, la souche Nka11 est spécifique de la rhizosphère du niébé, celle de Pvnk7 spécifique de la rhizosphère du haricot et les souches formant le consortium BOSD sont spécifiques de la rhizosphère du soja. Le comportement de l'arachide en condition d'inoculation croisée avec la souche Nka11 se traduit par l'interaction de cette souche provenant de la rhizosphère du niébé avec les racines de l'arachide induisant ainsi le développement de la légumineuse (Ngo Nkot, 2009).

L'apport des souches rhizobiennes dans la rhizosphère des légumineuses aurait favorisé la nutrition hydrominérale et azotée. Cet approvisionnement en éléments nutritifs a permis de stimuler de façon instantanée le phénomène de photosynthèse induisant ainsi une bonne croissance et un bon développement de ces cultures en terme de taille, nombre et surface foliaire. C'est le cas d'*Arachis Pintoi* après fertilisation avec les consortia rhizobiens (Rh3 + Pb3 et Rh3) (Mefire, 2021). L'augmentation du nombre de nodules en condition semi contrôlée révèle la présence des rhizobia dans la rhizosphère de ces cultures. De plus, la symbiose rhizobia-légumineuse au niveau des racines se matérialise par la formation des nodules, siège de la fixation biologique de l'azote indispensable à la croissance de la plante. Ce résultat s'accorde avec les observations d'Allito et *al* (2021) selon lesquelles, les légumineuses de la famille des Fabaceae en particulier le haricot, produisent un grand nombre de nodules lorsque les partenaires symbiotiques appropriés sont apportés. Par ailleurs, les plantes inoculées ont également produit une biomasse totale importante (72 % avec le consortium chez le soja) par rapport au témoin. Les travaux de Bahdjolbe (2019) montrent également une augmentation considérable de ce paramètre chez le niébé (de 69 à 114 %) avec les souches de rhizobia utilisées.

III.2-2- Biofertilisants rhizobiens : viabilité et milieux alternatifs pour la croissance du consortium rhizobien

Le composant majeur du biofertilisant étant les supports matériels, ces derniers sont généralement de nature organique, inorganique ou synthétique avec des propriétés physicochimiques appropriés pour maintenir les souches microbiennes dans de bonnes conditions physiologiques de stockage et sur le terrain (Malusa et *al.*, 2012). Outre un support

acceptable, la croissance des bactéries prend en compte plusieurs facteurs incluant un tampon de pH approprié, une bonne capacité de rétention d'eau élevée et une uniformité chimique et physique (Raimi et al., 2021). Les pH des différents matériaux utilisés pour la formulation des biofertilisants étaient compris entre 6 (terre de Garoua) à 9,68 (digestat). Le pH de croissance généralement proche de la neutralité, est connu pour supporter une large population et maintenir leur viabilité (Sahu et Brahma-prakash, 2016).

La croissance de la charge bactérienne dans les différentes formulations est traduite par une augmentation exponentielle de celle-ci par rapport au milieu B0 (YMB). Erdiansyah et al. (2022) ont montré que la souche de *Bradyrhizobium* poussait mieux dans les milieux alternatifs par rapport au milieu standard YMB. Ce constat est fait par une augmentation de la charge bactérienne de + 30 à + 36% dans ces milieux au bout de 4 mois d'évaluation. La formule enrichie à l'extrait de pois cajun additionné de mélasse de canne à sucre à la charge la plus élevée (8,89 log UFC/ml) par rapport au milieu standard YMB (8,71 log UFC/ml). Arfarita et al. (2022) ont également montré que les milieux enrichis à la mélasse de canne à sucre augmentent de façon considérable la croissance et la viabilité des souches de rhizobium.

La détermination de la durée de vie d'une souche microbienne dans une formulation est une étape cruciale dans le développement des biofertilisants (Lobo et al., 2019) et la survie prolongée des inocula durant le stockage est un effet désirable capable d'accroître l'application des formulations de biofertilisants en industrie (Bashan et al., 2014). L'efficacité du consortium rhizobien dans les différentes formulations s'est fait par évaluation de leur viabilité pendant 56 jours par comptage ; aboutissant ainsi à leur décroissance progressive tout au long de la durée de conservation. Les recherches de Pastor-Beuis et al (2019) ont montrés que la charge de la souche Rlp LCS0306 diminuait aux bout de 365 jours dans les quatre biofertilisants formulés. De plus, Les variations des charges dans les formulations (de 6,5 à 6,74 log/ml) diffèrent selon la nature de ceux-ci. En effet, la formule enrichie à l'extrait de pois cajun additionné de mélasse de canne à sucre plus 1% de poudre blanche donne le résultat le plus élevé en terme de charge par rapport au milieu standard YMB. Ce résultat est probablement dû aux différences de propriétés physicochimiques des matériaux de transport (Sohaib et al., 2020).

Le milieu YMB est un milieu liquide très efficace pour la croissance et le stockage des espèces de rhizobia. Sa composition en éléments synthétiques (mannitol, extrait de levure et d'autres composés complexes) traduit son indisponibilité auprès des agriculteurs et son prix extrêmement élevé (Erdiansyah et al., 2022). Les milieux alternatifs apparaissent comme

bénéfiques de par la disponibilité locale ainsi que leur coût abordable (Ngo Mimb et *al.*, 2014). La croissance du consortium dans les milieux développés est traduite par le développement de celui-ci avec une préférence pour le milieu enrichi à l'extrait de soja comme source d'azote et lait en poudre comme source de carbone par rapport au milieu extrait de levure/mannitol qui est le milieu standard YMB. Il utilise également toutes les sources de carbones alternatifs présents dans le milieu (saccharose, lait en poudre, mélasse de canne à sucre). En effet, Ngo Mimb et *al* (2014) a montré que la souche VUID1 utilise toutes les sources alternatives de carbone disponible (saccharose, Glycérol et lait de vache) pour se développer. Les espèces à croissance rapide de rhizobia et celles à croissance intermédiaire de rhizobia sont capables de croître dans des milieux contenant le saccharose comme source de carbone (Stowers et Eaglesham, 1983).

III.2-3- Potentiel des formulations de biofertilisants à base de rhizobia fixateur d'azote sur la croissance des plants de soja

Les rhizobia sont capables d'établir des relations symbiotiques avec les plantes de la famille des fabaceae (les légumineuses) en formant des nodules au niveau des racines ou des tiges (Masson-boivin et Sachs, 2018) induisant ainsi leur croissance et leur développement. Au Cameroun, cette association symbiotique est utilisée dans plusieurs espèces de légumineuses augmentant ainsi leur productivité (Nwaga et *al.*, 2010 ; Bahdjolbe, 2019). L'évaluation des paramètres de croissance des plants de soja présente augmentation significative ceux-ci avec les formulations et leurs effets variables en fonction de la méthode d'enrobage utilisée. Les effets de la nodulation et de la biomasse sont plus important avec le digestat additionné à l'huile de palmiste (+200 %) Pour la méthode d'enrobage par effluent et le digestat avec la poudre blanche (1%) additionné à l'huile de palmiste (+250 %) pour la méthode d'enrobage de deux par deux. Ngo Mimb et *al* (2014) a également montré l'effet bénéfique des biofertilisants sur la biomasse et la nodulation des plantes d'arachide.

La teneur en chlorophylle totale dans les différents traitements est évaluée par calcul en fonction des densités déterminées par spectrophotométrie. Les effets sont plus important avec les mêmes traitements obtenus pour chaque méthode d'enrobage (+11 % avec le digestat additionné à l'huile de palmiste et +8 % avec le digestat + poudre blanche (1%) additionné à l'huile de palmiste). Ces résultats corroborent ceux de Mfilinge et *al* (2014) lesquels, montrent une variation de la chlorophylle totale de 98 % à 40 % pour la 3^e et la 6^e semaine de l'inoculation des plantes avec les souches de rhizobia après le semis avec plusieurs variétés de haricot.

L'abondance en azote et en protéine totale est observée dans les mêmes formulations avec des effets variables de +700 % à + 900%. La fixation biologique de l'azote par les plantes de haricot, soja et niébé présente un effet significatif des biofertilisants sur la teneur en azote par rapport au témoin d'après les travaux de Htwe et *al* (2019). De plus, les microorganismes bénéfiques sont capables de fertiliser le sol enrichis en tous les éléments micro et macronutriments via la fixation de l'azote, la solubilisation ou la minéralisation du phosphore et du potassium, les facteurs de régulation de la croissance des plantes et la dégradation de la matière organique dans le sol (Sinha et *al.*, 2010).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de cette étude dont l'objectif général de ce travail était de rechercher la meilleure formulation du biofertilisant dans le but d'améliorer la production des légumineuses à graines. Les résultats ont montré que :

Les biofertilisants sont des combinaisons de microorganismes et autres composants permettent de booster la croissance des plantes et leurs formulations et applications donnent des résultats satisfaisants.

Les souches de rhizobia authentifiées augmentaient les paramètres de croissance des différentes légumineuses testées.

La croissance du consortium rhizobien dans les différentes formules après 4 jours d'incubation s'est traduit par une augmentation exponentielle de celui-ci avec la charge la plus élevée dans la formule B3(8,89 log/ml). Par contre sa survie se fait de manière décroissante en fonction de la durée de conservation de différentes formules (56 jours). Le choix de meilleur milieu de croissance du consortium rhizobien a permis de montrer qu'il s'adapte mieux dans les milieux enrichis en extrait de soja/lait en poudre et utilisant ainsi toute les ressources en carbone disponible.

Les biofertilisants améliorent les performances agronomiques (avec des effets en biomasse variant entre +200 pour le digestat et +250% pour le digestat +1% de poudre blanche) du soja en champ et augmentent les teneurs en chlorophylle, en azote et en protéine totale (+700 et +900%) de celui-ci quel que soit la méthode d'enrobage utilisé.

Nous recommandons ces biofertilisants pour la fertilisation et la production massive des légumineuses à graines. Néanmoins il serait intéressant pour des travaux futurs de :

- Rechercher la composition physicochimique idéale des matériaux adhésifs (adhésifs) des graines pour un meilleur suivi des performances des légumineuses,
- Faire des associations avec d'autres organismes bénéfiques enfin de booster le rendement d'autres espèces végétales cultivées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albareda M., Rodríguez-Navarro D. N., Camacho M. & Temprano F. J. 2008.** Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants : solid and liquid formulations. *Soil Biology Biochemistry*, 40 (1), 2771-2779.
- Allito B. B., Ewusi-Mensah N., Logah V. & Hunegnaw D. K. 2021.** Legume-rhizobium specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Scientific Reports*, 11, 1-13.
- Andrews M., Raven J. A. & Léa P. J. 2013.** Do plants need nitrate ? The mechanisms by which nitrogen from affects plants. *Annals of Applied Biology*, 163 (2), 174-199.
- Arfarita N., Imai T. & Prayogo C. 2022.** Utilization of Various Organic Wastes as Liquid Biofertilizer Carrier Agents towards Viability of Bacteria and Green Bean Growth. *Journal Of Tropical Life Science*, 12 (1), 1-10.
- Arnon D. I. 1949.** Studies of chlorophyll content by different methods in black gram (*Vigna mungo* L.). *International Journal of Agricultural Research*, 2 (7), 651-654.
- Arora N. K., Khare E. & Maheshwari D. K. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria : Constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* ; Maheshwari, D.K., Ed. *Springer : Berlin/Heidelberg, Germany* ; Volume 18, pp 97–116.
- Arora N. K., Tiwari, & Singh. R. 2014.** Comparative study of different carriers inoculated with nodule forming and free living plant growth promoting bacteria suitable for sustainable agriculture. *Journal Plant Pathology Microbiology*, 5, 229.
- Bado B. V. 2002.** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéennes et soudanaises du Burkina Faso. *PhD Thesis, Université de Laval, Canada* 197 p.
- Bahdjolbe M. 2019.** Symbiose *Vigna* sp. –*Bradyrhizobium* : étude préliminaire sur la caractérisation et la sélection des isolats pour les performances du niébé et du sorgho. Mémoire de Master en Microbiologie, Université de Yaoundé 1, 68 p.
- Bashan Y. 1998.** Inoculations of plants growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advance*, 16 (4), 729-770.

- Bashan Y., de- Bashan L. E., Prabhu S. R. & Hernandez J. P. 2014.** Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology : formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*, 378, 1-33.
- Basu A., Prasad P., Das S. N., Kalam S., Sayyed R. Z. & El Enshasy H. 2021.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a green bioinoculants : recent developments, constraints and prospects. *Sustainability*, 13 (3), 1140.
- Ben Rebah F., Prévost D., Yezza A. & Tyagi R. D. 2007.** Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production : a review. *Bioresource Technology*, volume 98, pp 3535-3546.
- Bhattacharyya P. N. & Jha D. K. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Catroux G., Hartmann A. & Revellin C. 2001.** Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil*, 230 (1), 21-30.
- Choudhary D.K. & Varma A. 2017.** Nitrogenase (a key enzyme) : structure and function. In : Hansen, A., Choudhary, D., Agrawal, P., Varma, A. (Eds.), *Rhizobium Biology and Biotechnology*. Springer, Cham, pp 293–307.
- Cleyet-Maret J. C., Rome S., Salducci X & Wery J. 1996.** Importances des composés phénoliques dans les interactions entre les plantes et les microorganismes : exemple des relations Rhizobium/légumineuses. *Botany Letters*, 13 (6), 521-529.
- Désamours L., 1995.** Etude du comportement de dix variétés de Vigna sur la ferme de Damien, 46 p.
- Devani M. B., Shihoo J. C., Shall S. A. & Suhagia B. N. 1989.** Spectrophotometrical method for microdetermination of nitrogen in Kjeldahl digest. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72 (2), 953-966.
- Doré C. & Varoquaux F. 2006.** Historique et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae, 840 p.
- Dugje I.Y., Omoigui L.O, Ekeleme F., Kamara A. & Ajeigbe.H. 2009.** Production du niébé en afrique de l'Ouest : *Guide du Paysan*. IITA, Ibadan, Nigeria. 20 p.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

- Dumet. 2008.** Directives pour la régénération : niébé. In : Dullo M. E., Thormann I., Jorge M. A. and Hanson J., editors. *Crop Specific Regeneration Guidelines [CD-ROM]*. CGIAR System-wide Genetic resource programme (SGRP), Rome, Italy, 8 p.
- Dutarte M. 2015.** Santé et adaptation du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). Mémoire de diplôme d'Ingénieur Agronome, Spécialité Production Végétale Durable, INRA, *SAD Paysage*, 70 p.
- Erdiansyah I., Taufika R., Widodo T. W., Damanhuri, Jannah D. M. & Prayitno H., 2022.** Viability of biofertilizer bacteria *Rhizobium* spp based on household waste. IOP Conf. Series : *Earth and Environmental Science*, 980 (1), 012009.
- FAO, 2014.** Statistiques de production alimentaire. FAO. www.fao.org
- FAO, 2015.** Statistiques de production alimentaire. FAO. www.fao.org
- FAOSTAT, 2014.** Base de données statistiques agricoles. FAO. www.fao.org
- FAOSTAT, 2017.** Base de données statistiques agricoles. FAO. www.fao.org
- FAOSTAT, 2022.** Base de données statistiques agricoles. FAO. www.fao.org visité en Novembre 2022.
- Fasusi O. A., Cruz C. & Babalola O. O., 2021.** Agricultural sustainability : Microbial biofertilizers in rhizosphere management. *Agriculture*, 11, 163.
- Faucher Y., Rioux S., Bourget N., Thibaudeau S., Duval B. & O'Donoghue L. 2018.** Evaluation de maladies racinaires du soya dans des champs de la Montérégie en 2014 et 2015. *Erudit Revues Phytoprotection*, 98 (1), 25-35.
- Foncéka D. 2010.** Elargissement de la base génétique de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea*) : Applications pour la construction de populations, l'identification de QTL et l'amélioration de l'espèce cultivée. *PhD Thesis Sciences*, Université de Montpellier, France. *Supreme Agronomy*, 162 p.
- Garcia M. C., Marina M. L., Laborda F. & Torre M. 1998.** Chemical characterization of commercial soybean products. *Food Chemistry*, 62 (3), 325-331.
- Guignard J. L. 1998.** Abrégé de Botanique, 10^{ème} édition révisée, Masson, Paris, 159 P.

- Graham P. H. & Vance C. p. 2003.** Legumes : importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131 (3), 872-877.
- Hamdani D. 2012.** Action des poudres et des huiles de quelques plantes aromatiques sur les paramètres biologiques de la bruche du haricot, *Acanthoscelides obtectus* Say (*Coleoptera : Bruchidea*). Diplôme de Magister en Sciences Biologiques, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie, 116 p.
- Hara F. A. dos S. & Oliveira L. A. 2005.** Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, volume 40, pp 667-672.
- Hawaou. 2017.** Lutte contre les bio-agresseurs pour la production de l'oignon (*Allium cepa* L.) à partir des champignons mycorhiziens et d'un agent de bio contrôle. Mémoire de Master en Microbiologie obtenue à l'Université de Yaoundé I, 54 p.
- Herrmann L. & Lesueur D. 2013.** Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (20), 8859–8873.
- Herrmann L., Atieno M., Brau L. & Lesueur D. 2015.** Microbial quality of commercial inoculants to increase BNF and nutrient use efficiency. In : de Bruijn F.J. (ed) Molecular microbial ecology of the rhizosphere. Biological Nitrogen Fixation, *Wiley-Blackwell*, Hoboken, pp 1031-1040.
- Herridge D. F., Peoples M. B & Boddey R. M. 2008.** Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311 : 1–18.
- Hmida C. & Saoudi A. 2010.** Etude de la variabilité des souches de rhizobium efficaces issues par radiomutagenèse pour le haricot. Mémoire de Microbiologie Industrielle en vue de l'obtention d'une Licence Appliquée en Biotechnologie. Université de La Manouba, Institut de Biotechnologie de Sidi Thabet, 54 p.
- Htwe A. Z., Moh S. M., Soe K. M., Moe K. & Yamakawa T. 2019.** Effects of Biofertilizer Produced from Bradyrhizobium and Streptomyces griseoflavus on Plant Growth, Nodulation, Nitrogen Fixation, Nutrient Uptake, and Seed Yield of Mung Bean, Cowpea, and Soybean. *Agronomy*, 9 (2), 77.

- Jansa J., Bationo A., Frossard E. & Rao I. M. 2011.** Options for improving plant nutrition to increase common bean productivity in Africa. In : Bationo A., Waswa B., Okeyo J., Maina F., Kihara J., Mokweunye U. (eds). Fighting poverty in Sub-saharan Africa : the multiples roles of the legumes in intergrated soil fertility management. *Springer*, pp 201-240.
- Jarvis A., Eerguson M. E., Williams D. E., Guarinol., Jones P. G. & Bramel P. 2003.** Biogeography of wild *Arachis* : Assessing conservation status and setting future priorities. *Crop Science*, 43(2), 1100-1108.
- Kumar S., Diksha, Sindhu S. S. & Kumar. R. 2022.** Biofertilizers : An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences* 3, 100094.
- Lawal T. E. & Babalola O. O. 2014.** Relevance of biofertilizers to agriculture. *Journal Humide Ecological*, 47 (1), 35–43.
- Lazali M. 2009.** Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) cultivée sous contrainte hydrique – Aspects morpho-physiologiques et agronomiques. Mémoire de Master en Biotechnologies Végétales, Institut National Agronomique – El Harrach – Alger. 91 p.
- Lee S. K., Lur H. S., Lo K. J., Cheng K. C., Chuang C. C. & Liu C. T. 2016.** Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (18), 7977–7987.
- Liffourrena A. S. & Lucchesi G. I. 2018.** Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells : preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *Journal Biotechnology*, 278, 28–33.
- Lobo C. B., Tomás M. S. J., Viruelb E., Ferreroa M. A. & Lucca M. E. 2019.** Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25.
- Lupwayi N. Z., Clayton G. W. & RICE, W.A. 2006.** Rhizobial inoculants for legume crops. *Journal of Crop Improvement*, 15, 289-321.

- Mahamne S. G. 2007.** Influence de la fertilisation phosphatée sur quelques composantes du rendement de la variété TN 5-78 de niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivée au champ en saison pluvieuse.
- Mahanty T., Bhattacharjee S., Goswami M., Bhattacharyya P., Das B. & Tribedi P. 2017.** Biofertilizers : A potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 3315–3335.
- Malusa E., Sas-Paszt L. & Ciesielska J. 2012.** Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 491206.
- Masson-Boivin C. & Sachs J. L. 2018.** Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia – the roots of success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7-15.
- McQuilken M. P., Halmer P. & Rhodes D. J. 1998.** Application of microorganisms to seeds. In : Burges H. D (ed) Formulation of microbial biopesticides. *Springer*, Berlin, pp 255–285.
- Mefire N. R. 2021.** Optimisation de la symbiose fixatrice d'azote et tolérance au stress hydrique entre les légumineuses fourragères (*Arachis pintoï* et *Vigna unguiculata*) et endophytes bactériens sélectionnés. Mémoire de Master en Microbiologie l'Université de Yaoundé 1, 58 p.
- Mfilinge A., Mtei K. & Ndakidemi P. 2014.** Effect of Rhizobium Inoculation and Supplementation with Phosphorus and Potassium on Growth and Total Leaf Chlorophyll (Chl) Content of Bush Bean *Phaseolus vulgaris* L. *Agriculture Sciences*, 5, 1413-1426.
- MINADER. 2016.** Chapitre 13 : agriculture, INS, Yaoundé, Cameroun, pp 187-207.
- Mitter E. K., Tosi M., Obregon D., Dunfield K. E. & Germida J. J. 2021.** Rethinking Crop Nutrition in Times of Modern Microbiology : innovative Biofertilizer Technologies. *Frontiers in Sustainable Food System*, 5, 606815.
- Mus F., Alleman A.B., Pence N., Seefeldt L.C. & Peters, J.W. 2018.** Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics*, 10, 523–538.
- Ngo Mimb J. A., Boyomo O., Ngo Nkot L., Nga H. N. & Nwaga D. 2014.** The use of local substrates in the production of legume nodulating bacteria inoculants for SubSaharan Africa : Preliminary results. *Journal of Applied Biosciences*, 75, 6183– 6191.

- Ngo Nkot L. 2009.** Acidité du sol comme facteur limitant la fixation de l'azote atmosphérique par l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) en zone de forêt dense humide. Thèse de doctorat/*PhD*, Université de Yaoundé I, 187 p.
- Nwaga D. & Ngo Nkot L. 1998.** Tolérance *in vitro* de rhizobia isolés de *Vigna unguiculata* au Cameroun en comparaison avec *Bradyrhizobium japonicum*. *Cahiers Agricultures*, 7, 407-410.
- Nwaga D. 2000.** Agriculture biologique et alternative de la biofertilisation dans l'utilisation des biofertilisants microbiens pour une agriculture biologique. Actes du 1er atelier de formation sur l'utilisation des biofertilisants, université de Yaoundé I (UMAB), Yaoundé, pp 22-27.
- Nwaga D., Jansa J., Abossolo A. M. & Frossard E. 2010.** The potential of soil beneficial microorganisms for slash-and-burn agriculture in the humid forest zone of Sub-Saharan Africa *In : soil biology and agriculture in the tropics*. Ed Dion P. Springer Heidelberg Dordrecht. London, New York, pp 80-107.
- Nwaga D. 2018.** Biotechnologies des symbioses. UY1, Yaoundé, Cameroun, 54 p.
- Nyoki D. & Ndakidemi P.A., 2018.** Root length, nodulation and biological nitrogen fixation of Rhizobium inoculated soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) grown under maize (*Zea mays* L.) intercropping systems and P and K fertilization. *Advances Bioresearch*, 9, 173–180.
- O'Callaghan M., 2016.** Microbial inoculation of seed for improved crop performance : issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 5729–5746.
- Oliveira A. L., Santos O. J., Marcelino P. R., Milani K. M. & Gonçalves L. S. 2017.** Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1873.
- Pastor-Bueis R., Sánchez-Cañizares C., James E. K. & González-Andrés F. 2019.** Formulation of a Highly Effective Inoculant for Common Bean Based on an Autochthonous Elite Strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, and Genomic-Based Insights Into Its Agronomic Performance. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2724.

- Pauwels J., E. van Ranst M. Verloo A. & Mvondo ZE. 1992.** Manuel de laboratoire de pédologie, méthodes d'analyses de sols et de plantes ; équipement et gestion des stocks de verrerie et de produits chimiques. Publications agricoles n° 28, A. G. C. D. Bruxelles. Belgique, 180 p.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W. J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology Molecular and Biology Review*, 64, 180–201.
- Perry J. J., Staley J. T. & Lory S. 2004.** Microbiologie. Edition Dunod, Paris, 95 p.
- Pinochet J., Freire I. & Schrank K. 2006.** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli. *Mircen Journal*, 3, 289-295.
- Raimi A. R., Roopnarain A. & Adeleke R. A. 2021.** Biofertilizer production in Africa : Current status, factors impeding adoption and strategies for success. University, South Africa. *Scientific African*, 11, 2468-2276.
- Raven H., Evert R. F. & Eichlorn S. E. 2000.** Biologie végétale. *La 6ème Edition américaine*. 945 p.
- Sahu P. K. & Brahma-prakash G. P. 2016.** Formulations of Biofertilizers—Approaches and Advances. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity : Functional Applications* ; Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R., Eds. *Springer : New Delhi*, India, Volume 2, pp179–198.
- Schoebitz M., Mengual C. & Rold'an A. 2014.** Combined effects of clay immobilized *Azospirillum brasilense* and *Pantoea dispersa* and organic olive residue on plant performance and soil properties in the revegetation of a semiarid area. *Science Total Environmental*, 466, 67–73.
- Schrire B. D., Lewis G. P. & Lavin M. 2005.** Biogeography of leguminosae. *Legumes of the World*, 6, 21-54.
- Sindhu S. S. & Dadarwal K. R. 2000.** Competition for nodulation among rhizobia in legume-Rhizobium symbiosis. *Indian Journal Microbiology*, 40 (4), 211–246.

- Singh S.R., Biswas D. & Bahadur L., 2015.** PGPR for sustaining crop productivity under salt stress. In : Arora, S., Singh, Y.P., Singh, A.K. (Eds.), *Advanced Techniques for Bioremediation and Management of Salt Affected Soils*. ICAR-Central Soil Salinity Research Institute Regional Research Station. Lucknow, pp 167–177.
- Sinha R. K., Valani D., Chauhan K. & Agarwal S. 2010.** Embarking on a second green revolution for sustainable agriculture by vermiculture biotechnology using earthworms : Reviving the dreams of Sir Charles Darwin. *Journal Agriculture Technology Sustainable Development*, 2, 113–128.
- Sohaib M., Zahir Z. A., Khan M. Y., Ans M., Asghar H. N., Yasin S. & Al-Barakah F. N. 2020.** Comparative Evaluation of Different Carrier-Based Multi-Strain Bacterial Formulations to Mitigate the Salt Stress in Wheat. *Saudi Journal Biology Sciences*, 27, 777–787.
- Somasegaran P & Hoben H. J. 1985.** *Methods in legumeRhizobium Technology*. NifTAL Project and MIRCEN, Paia, Hawaii-USA, 365 p.
- Somasegaran P. & Hoben H. J. 1994.** *Handbook for Rhizobia : Methods in Legumes Rhizobium Technology*. Springer-Verlag, New York, Inc., volume 1, 450p.
- Sprent J. I., Ardley J. & James E. K. 2017.** Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologistic*, 215, 40-56.
- Stephens J. H. G. & Rask H. M. 2000.** Inoculant production and formulation. *Field Crops Reseach*, 65, 249–258.
- Stowers M. D & Eaglesham A. R. J. 1983.** A stem-nodulating Rhizobium with physiological characteristics of both fast and slow growers. *Journal of General Microbiology*, 129, 3651-3655.
- The legume phylogeny working group. 2013.** Legume phylogeny and classification in the 21st century : progress, prospects and lessons for other species rich clades. *Taxon*, 62, 217-248.
- Tortora G. J., Funk B. R. & Case C.L. 2003.** *Introduction à la microbiologie*. Edition du Renouveau Pédagogique, Inc., 945p.

- Torres A. M., Barros G. G., Palacios S. A., Chulze S. N. & Battilani P. 2014.** Review on pre- and postpost harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Reseach International*, 62, 11– 19.
- Tripti K., Adarsh U., Zeba K. & Vipin A. 2017.** Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. *Journal Environment Manage*, 190, 20–27.
- Vance C. P., Graham P. H. & Allan D. L. 2000.** Biological nitrogen fixation : phosphorus- a critical future need ? In nitrogen fixation : from molecules to crop productivity, pp 509-514.
- Verma M., Mishra J. & Arora N. K. 2019.** Plant growth-promoting rhizobacteria : diversity and applications. In : Sobti, R.C. (Ed.), *Environmental Biotechnology : For Sustainable Future*. Springer Nature Singapore, Pte Ltd, pp 129–173.
- Vincent J. M. 1970.** A manuel for the practical study of root- nodule bacteria, Publications Ltd, Oxford, pp 73-97.
- Werner D. & Newton W. E. 2005.** Nitrogen fixation in Agriculture, forestry, Ecology, and the Environment. *Springer Science & Business Media*.
- Wongdee J., Boonkerd N., Teaumroong N., Tittabutr P. & Giraud E. 2018.** Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins that are functionally redudant during free-living. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1644.
- Woomer P. L. 2010.** Fixation biologique de l'azote et entreprise de légumineuse à graine : directives des maitres fermiers pour N2 Africa. Tropical Soil And Fertility Institute of International Centre for Tropical Agriculture, Nairobi, 17 p.
- Xavier I. J., Holloway G., Leggett M. & Bios P. 2004.** Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Managment*, 3 (1), 1-6.
- Yahara T., Javadi F., Onoda Y., de Queiroz L. P., Faith D P. & Davies S. 2013.** Global legume diversity assasment : concepts, key indicators and strategies. *Taxon*, 62, 249-266.

- Yadav A. N., Verma P., Singh B., Chauhan V., Suman A. & Saxena A. K. 2017.** Plant growth promoting bacteria : Biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Adv. Biotechnology and Microbiology*, 5, 1–16.
- Yinhui L., Rong X. G., Zhangxiong L., Yansong M., Lixia W., Linhai L. & Fanvun L. 2008.** Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr) in China. *Theoric Applied and Genetic*, 117, 857-871.
- Zhang J., Cook J., Nearing J. T., Zhang J., Raudonis R., Glick B. R. & Cheng Z., 2021.** Harnessing the plant microbiome to promote the growth of agricultural crops. *Microbiology Reseach*, 245, 1–14.
- Zinga I., Longue R. D., Komba E. K., Beaumont C. & Semballa S. 2016.** Evaluation de la teneur en protéines et en chlorophylle dans les feuilles de cinq variétés locales de manioc infectées par la mosaïque en République Centrafricaine. *Articles originaux. Tropicultura*, 1, 3-9.

ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux pour 1 litre

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

- Mannitol 10g
- Extrait de levure 0,5g
- KH_2PO_4 0,2 g
- NaCl 0,1g
- Eau distillée 1000ml
- pH ajusté à 6,8

Milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar)

- Milieu YMB + Agar (15g)

Milieu YEMA+ RC (Rouge Congo)

- Milieu YMA+ 5ml rouge congo

Eau physiologique

- Eau de robinet + 9 g de NaCl

Milieu Jensen : pour l'arrosage des plantes

- 10ml solution p ($\text{K}_2\text{HP0}_4$ à 20g/l)
- 10ml solution q ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 20g/l et NaCl à 20g/l)
- 20 ml solution R (CaHPa_4 à 50g/l)
- 10 ml solution D (FeCl_3 à 1,6g/l)
- 1ml oligo-élément de Jensen
- 1L Eau distillée
- Ajuster le pH à 6,7

Oligo-élément de Jensen

2,86 g H_3BO_3
2,03 g $\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$
0,22g $\text{Zn SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$
0,08g $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$
0,09 $\text{Na}_2\text{MoO}_4, \text{H}_2\text{O}$
1L Eau distillée

Annexe 2. Authentification des souches de rhizobia



Figure A. Plantes de légumineuses après floraison, racines de soja des différents traitements après récolte et nodules des plantes de niébé

Annexe 3. Milieux de croissance des rhizobia et test de viabilité



Figure B. Milieux de croissance alternatifs et formules de biofertilisants

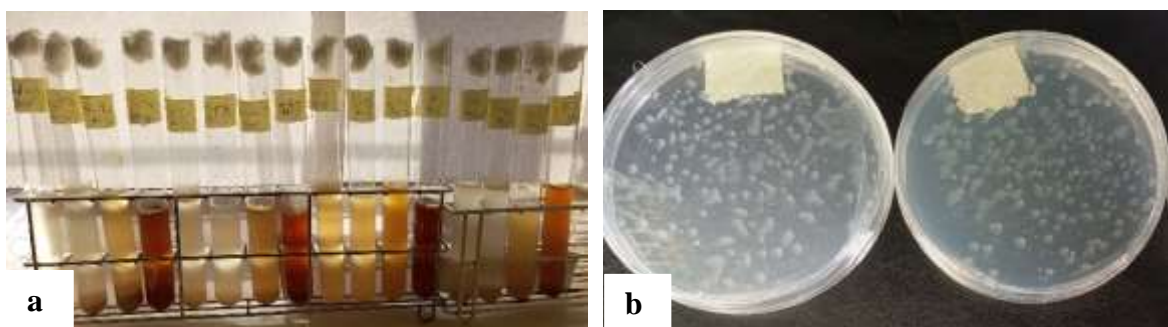


Figure C. Inoculation et dénombrement

a : les milieux inoculés avec le consortium BOSD après 4 jour de croissance ; **b :** boîte de pétri avec des colonies visibles.

Annexe 4. Effets des formulations et de la méthode d'enrobage sur les plants de soja

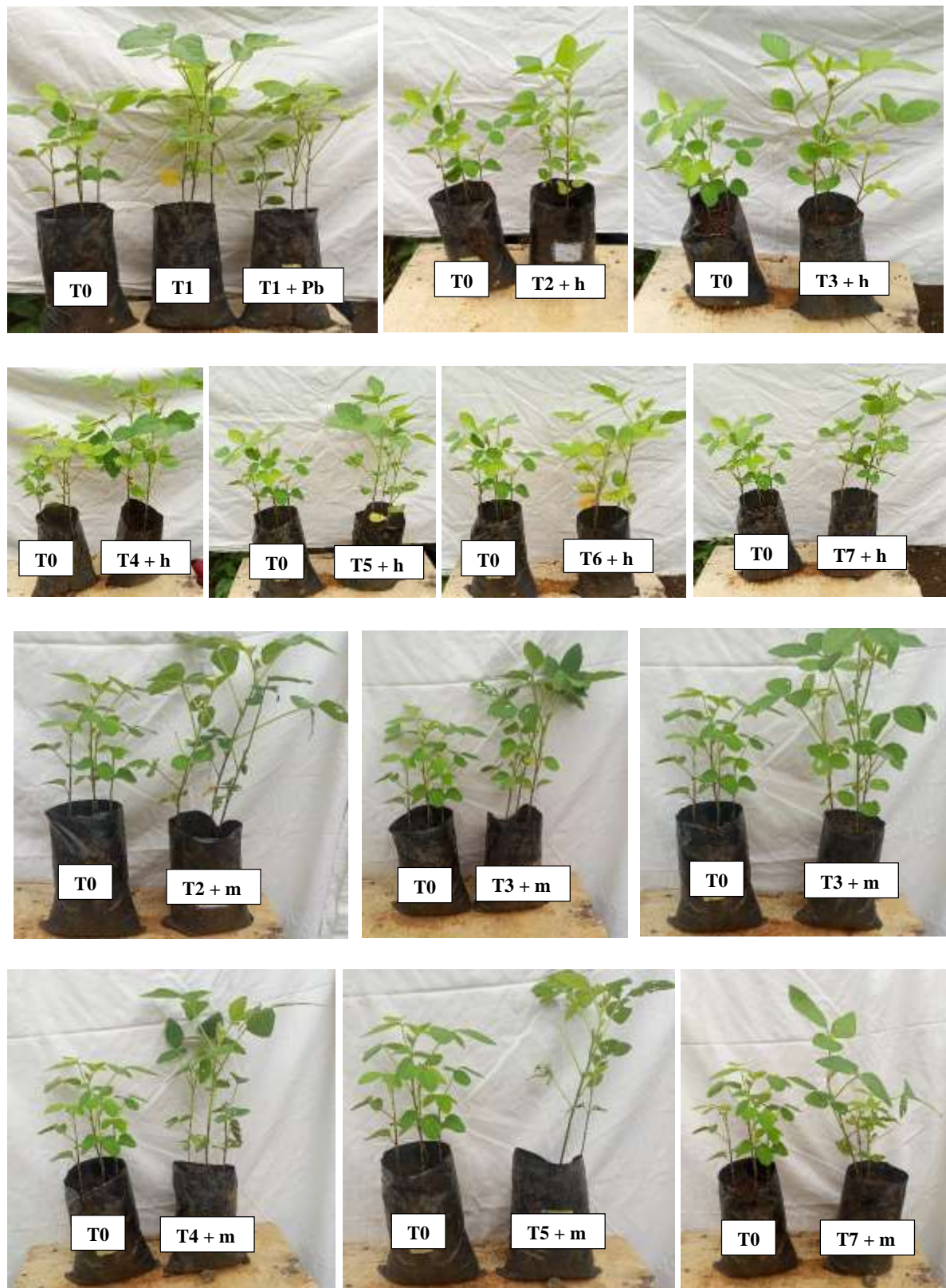


Figure D. Plantes de soja inoculées avec la méthode d'enrobage par effluent

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)



Figure E. Plantes de soja inoculées avec la méthode d'enrobage de deux par deux.

Essai de formulation d'un biofertilisant amélioré à base de rhizobia fixateur d'azote pour l'enrobage des légumineuses à graines (arachide, haricot, niébé et soja)

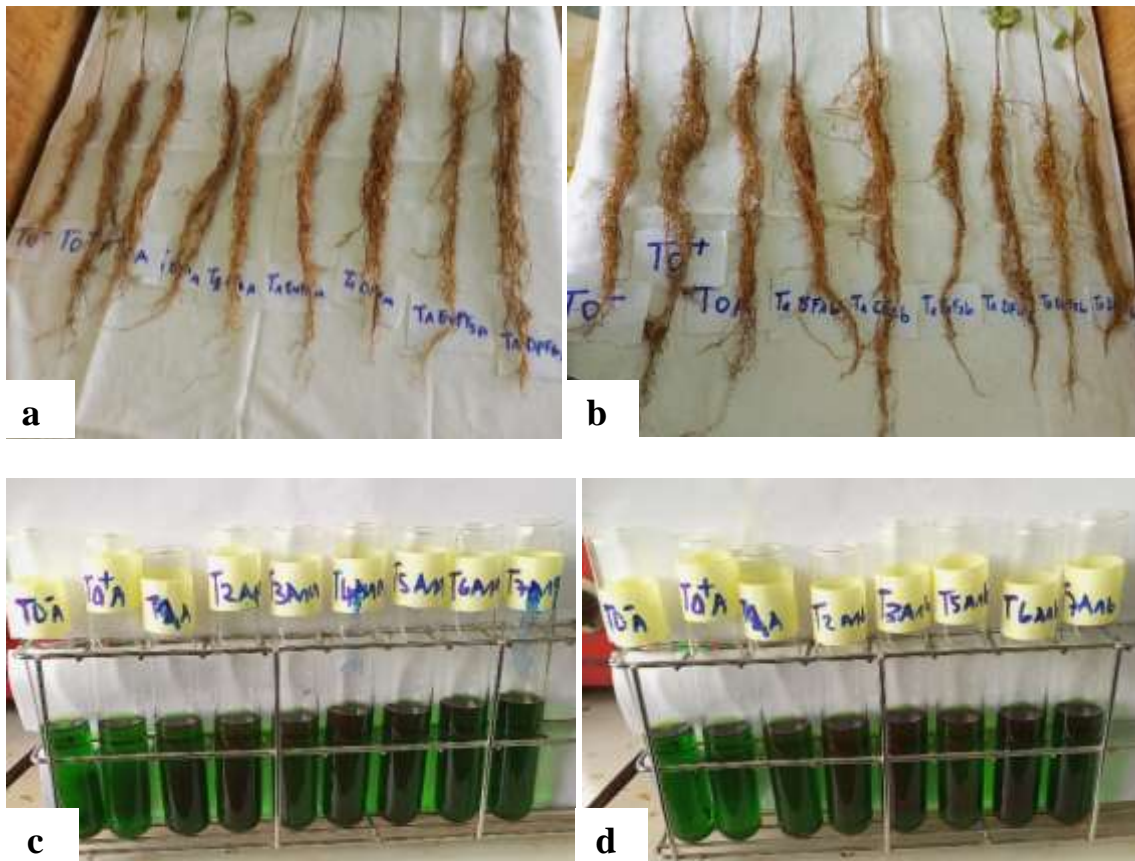


Figure F. Racines des plantes de soja et extraction de la chlorophylle des différents traitements.

a : racine des plants méthode1, adhésif huile de palmiste ; **b** : racine des plants méthode1, adhésif poudre de maïs ; **c** : chlorophylle méthode1, adhésif huile de palmiste et **d** : chlorophylle méthode1, adhésif poudre de maïs.

Annexe 5. Dispositif expérimental en champ et analyses de laboratoires



Figure G. Dispositif expérimental en champ



a



b

Figure H. Analyses de laboratoire

a : ensemencement sur boîte de pétri et **b** : ensemencement sur milieu liquide