

Dénombrement Des Populations Naturelles De Rhizobium Du Pois Chiche (*Cicer Arietinum*) Dans Différents Sols Du Maroc

Machehouri Abdelkader
Dr. Ben Messaoud Btissam
Pr. Nassiri Laila
Pr. Ibijbijen Jamal

Moulay Ismail University, Faculty of Sciences, Soil and Environment
Microbiology Unit, Meknes, Morocco

doi: 10.19044/esj.2017.v13n6p273

[URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n6p273](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n6p273)

Abstract

For the legumes cultivation, the presence of specific Rhizobium in the soil is very necessary in fact a minimum number of bacteria is essential to obtain a good nodulation. The formula used for the count of Rhizobia in soil is the most probable number (MPN) method. For this purpose, four cultivation systems were used: d1, d2, d3 and d4. The soils of the all studied regions have a natural population of Rhizobium sp cicer. The size of this population is determined by the MPN method. This has been attributed to the use of plant growth systems. The result have shown that just the cultivation system d1 will be considered to realize such studies even that this system have shown some failure. Moreover, the MPN method failed on the evaluation of the rhizobia population hence the need to find a new specialized method.

Keywords: Chickpea, Rhizobium, Most Probable Number Method, population

Résumé

Pour la culture des légumineuses, la présence de Rhizobium spécifique dans le sol s'avère très nécessaire. En effet, un nombre minimal de bactéries est indispensable pour obtenir une bonne nodulation. La méthode utilisée pour le dénombrement de Rhizobiums dans le sol est la méthode du nombre le plus probable (NPP) ou Most Probable Number. Pour cela quatre systèmes de culture de plante ont été utilisés : d1, d2, d3 et d4. Les sols des régions étudiées sont tous pourvus d'une population naturelle de Rhizobium sp cicer. La taille de cette dernière n'a pas pu être déterminée par la méthode MPN. Ceci a été

attribué à l'utilisation des systèmes de croissance des plantes. Les résultats ont montré que le seul système qui a permis de déceler des résultats logiques et le système de culture d1. Cependant ce système a présenté aussi des défaillances. En plus la méthode du Nombre le Plus Probable n'a pas permis de faire une estimation de la population rhizobienne dans les sols étudiés d'où la nécessité de trouver une nouvelle méthode plus pointue.

Mots clés : Pois chiche, Rhizobium, Méthode du Nombre le Plus Probable, population

Introduction

Les légumineuses sont des cultures à importance considérable dans toutes les régions agricoles du globe. Elles ont un intérêt aussi bien nutritionnel qu'agronomique. En effet, elles rentrent dans l'alimentation humaine et animale en tant que source importante de protéine à l'échelle mondiale, elles fournissent pour l'alimentation humaine 22 % de protéine, 32% de matières grasses et 7% des glucides (Wery et Grignac, 1983). Elles permettent de maintenir et d'accroître le stock d'azote du sol grâce à la symbiose fixatrice d'azote qu'elles réalisent avec les bactéries du genre *Rhizobium*. La fixation symbiotique d'azote qui leur est attribuée est estimée à 175 millions de Tonnes d'Azote par an, soit environ 70% de la quantité d'azote fixée sur terre par année (Drevon 1983, Sariolu 1993). L'exploitation de cette propriété dans le domaine agronomique permettrait une économie des engrais azotés dont la demande mondiale annuelle qui se situe aux alentours de 50 millions de tonnes par an ne cesse d'augmenter.

A l'échelle nationale, les besoins en engrais azotés sont très importants, elles sont passés de 4680 T en 1956 à 492000 T en 2012 (Rapport annuel de la dffp 2012). Pour pallier à cette demande accrue en engrais azotés et aussi à leur coût élevé, il serait souhaitable d'augmenter la superficie cultivée en légumineuse et exploiter au maximum la symbiose fixatrice d'azote qu'elle engendre.

Au Maroc, la culture de pois-chiche vient en 2^{ème} rang après la fève avec une superficie de 77 000 ha en 1989-90 et 43600 ha en 2011-2012 et 59000 ha durant la campagne agricole 2014-2015 soit une régression de 23% (Bilan annuel de MAPM 2016). Le secteur de pois-chiche au Maroc demeure traditionnel et se confronte à plusieurs contraintes d'ordre, agronomiques et climatiques qui ne fait que diminuer la superficie emblavée et la production.

Le rendement moyen national qui est de 6.8 qx/ha reste faible et inférieur au rendement moyen mondial de 7qx/ha et le rendement moyen de certains pays tel que celui de l'Italie 12qx/ha (Sing, 1990).

Plusieurs facteurs sont à l'origine du faible rendement et de la diminution de la superficie de la culture de pois-chiche au Maroc dont on peut citer :

- ✓ La qualité du matériel végétal utilisé qui est l'une des variétés locales à faible productivité.
- ✓ La sensibilité du pois-chiche aux maladies en particulier l'anthracnose.
- ✓ Les conditions climatiques défavorables pendant un certain nombre d'années. La mauvaise conduite de la culture ;
- ✓ L'apparition de nouvelles cultures, rentables et concurrentielles tel que le tournesol ;
- ✓ Le problème lié à la commercialisation (concurrence internationale pour l'exploitation et prix national faible)
- ✓ et Les problèmes liés au mauvais fonctionnement de symbiose rhizobium pois-chiche dans certaines régions telles que Sidi battache et Maaziz.

Compte tenu de ses considérations, le ministère de l'agriculture et des pêches maritimes en collaboration avec des organismes de recherche, ont mené un programme de recherche dont certains résultats sont très encourageants notamment l'introduction de nouvelles variétés de pois chiche d'hiver à haut rendement potentiel et à résistance élevée aux maladies y compris la plus redoutable, l'anthracnose.

Les informations concernant le fonctionnement de la symbiose chez le pois –chiche qu'il soit cultivé en hiver (introduction récente) ou au printemps (culture classique) sont rares ou inexistantes. Dans le but d'exploiter au maximum la symbiose fixatrice d'azote qu'engendre le pois-chiche pour une meilleure productivité de ce dernier, il est nécessaire de mener des études sur le potentiel de fixation symbiotique des sols dans les régions où cette plante est cultivée. Une telle étude permettrait d'identifier les sols ou les régions où les populations naturelles rhizobium de pois- chiche sont peu nombreuses et non suffisamment efficaces et où l'inoculation du pois –chiche serait nécessaire.

Pour valoriser ces espèces intervenant dans l'économie de l'Azote d'une manière générale et le développement de la culture de pois-chiche en particulier il est nécessaire de s'intéresser particulièrement à l'évaluation de l'abondance des populations naturelles de Rhizobium du pois-chiche (*Cicer arietinum*) dans différents sols du Maroc.

Matériel et Méthodes

Critères du choix des sites

Le choix des sites a été réalisé en se basant sur les trois critères suivants: des zones potentielles où le pois chiche serait introduit, des zones

traditionnelles de cultures de pois- chiche et finalement des zones présentant des problèmes pour la culture de pois chiche.

Présentation des régions étudiées et choix des sols

La collecte des échantillons du sol a été réalisée à partir de six régions du Maroc :

1- Sais : Fès et Meknès, 2- Chaouia : Settat ; 3- Pré-Rif : Tissa ; 4- Plateau Central : Maaziz, Merchouche et Sidi Bettache ; 5- Moyen Atlas : Khénifra et 6- la Plaine du Gharb : Gharb.

Dénombrement des Rhizobiums du pois chiche dans le sol

La taille des populations Rhizobiennes d'un sol donné est une donnée de base à connaître dans les études de réponse des légumineuses à l'inoculation. Il n'existe pas de milieu de culture sélectif pour le Rhizobium lorsque ce dernier se trouve en présence d'autres microorganismes.

Si ce milieu existait, il permettrait la croissance uniquement de Rhizobium et empêcherait la croissance d'autres microorganismes présents dans le sol. Ceci se manifesterait par l'apparition uniquement de colonies spécifiques de Rhizobium après incubation du milieu inoculé par les dilutions de la solution du sol.

Pour cette raison, l'unique méthode utilisée pour le dénombrement de Rhizobium dans le sol est la méthode du nombre le plus probable (NPP) Désigné en Anglais par « Most Probable Number (MPN) » ou « Plant Infection Count ».

Le principe de cette technique est fondé sur le fait qu'une cellule unique permettrait la nodulation d'une plante hôte. La technique MPN appliquée au dénombrement de Rhizobium dans le sol consiste en un certain nombre d'étapes décrites ci-après:

Echantillonnage du sol

Dix prélèvements du sol ont été effectués d'une manière aléatoire à partir d'une parcelle choisie et cela pour chaque site étudié. Les prélèvements ont été réalisés à une profondeur de 20 cm à l'aide d'une tarière de 25 cm de long et 5 cm de diamètre.

Les prélèvements ont été mélangés pour avoir un échantillon composite qui servira pour le dénombrement. Entre les prélèvements effectués dans deux sites différents, la tarière a été stérilisée par trempage à l'alcool et flambage.

Stérilisation des graines

Les graines du pois chiche (variété ILC 195), ont été stérilisées en surface par trempage dans une solution de chlorure de mercure ($HgCl_2$) à 1‰

pendant deux à trois minutes. Les graines stérilisées sont ensuite rincées six fois à l'eau distillée stérile, puis laissées imbiber pendant 1 heure dans l'eau du sixième rinçage avant d'être mises à germer (Wei et al., 2002)

Germination des graines

Après cette stérilisation de surface, les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri stériles contenant une solution d'agar à (1%) à raison de 20 ml environ par boîte. Les boîtes sont incubées pendant 3 à 4 jours à 30°C jusqu'à ce que la radicule atteigne la longueur de 1 à 2 cm.

Système de culture des plantes

Pour vérifier la validité de la technique du MPN est plus précisément vérifier la validité du système de culture de plantes à utiliser dans cette technique pour dénombrer *Rhizobium* sp. (Cicer) dans le sol, nous l'avons essayé sur une culture pure de *Rhizobium* sp. (Cicer) avec utilisation de plusieurs systèmes de culture. La culture pure utilisée consistait en une suspension bactérienne. Le nombre le plus probable par ml de la culture pure obtenu par la technique MPN en utilisant 4 différents systèmes de culture de plante a été comparé à celui obtenu par le dénombrement des cellules viables de *Rhizobium* en utilisant le milieu YEM gélosé en boîte de pétri.

Dans cette technique de dénombrement de cellules viables en milieu gélosé en boîte, des aliquots de volume donné prise à partir des suspensions-dilutions de la culture pure sont ensemencés sur milieu YEM gélosé et les colonies qui apparaissent après incubation sont comptées.

Cette technique de dénombrement en boîte et basée sur l'hypothèse que chaque cellule viable de *Rhizobium* dans la suspension va donner naissance à une colonie après incubation. Le nombre de cellules viables dans la culture pure est déduit à partir du volume d'aliquot ensemencé et du nombre de colonies apparus à une dilution donnée.

Les quatre systèmes de culture de plante utilisés pour le dénombrement de la culture par la méthode de MPN sont des systèmes d1, d2, d3 et d4 décrits dans ce qui suit:

d1: Système de culture en tube contenant le mélange sable + vermiculite à un volume de 1/1, plantules avec cotylédons repiquées aseptiquement et arrosées par une solution nutritive des plantes à raison de 10 ml par tube deux fois par semaines.

Tableau N° 1 : Composition de la solution nutritive (Broughton et al., 1971)

Element	Dose (g/l)	Forme
P	136.09	KH ₂ PO ₄
K	87.0	K ₂ SO ₄
Mg	123.3	MgSO ₄ ,7H ₂ O
Zn	0.288	ZnSO ₄ ,7H ₂ O
Mo	0.048	Na ₂ MoO ₄ ,2 H ₂ O
Mn	0.338	MnSO ₄ ,H ₂ O

Fe	20.0	Fe Chelate
Cu	0.1	CuSO ₄ , 7 H ₂ O
Co	0.056	CoSO ₄ , 7H ₂ O
B	0.247	H ₃ BO ₃

Les tubes sont transférés aussitôt dans une chambre de croissance des plantes, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, à température ambiante.

d2: Système de culture en tube contenant le mélange sable + vermiculite et plantules sans cotylédons. Ce système est analogue à celui décrit en d1, la seule différence est que les plantes ont été dicotylédonées avant d'être mises dans des tubes. Les cotylédons ont été enlevés aseptiquement.

d3: Système de culture en tube avec solution nutritive (20ml) solidifiée (par l'agar à 1,5%) inclinée et plantules sans cotylédons placées d'une manière aseptique sur la surface.

Les tubes sont ensuite transférés dans la chambre de croissance des plantes, et les plantes sont ainsi laissées croître pendant une semaine avant d'être inoculées.

d4: Système de culture en sac de plastique avec solution de culture nutritive liquide et des plantes avec cotylédons.

Les sacs sont transférés dans les chambres de culture des plantes, ces dernières sont laissées croître pendant une semaine avant d'être inoculées.

L'inoculation

Après une semaine de la mise en place des systèmes, les plantes sont inoculées aseptiquement avec des dilutions appropriées de la culture pure du sol. Un ml de chaque dilution sert à inoculer un compartiment (dans le cas de système de culture en sac de plastique) ou un tube (dans le cas de système de culture en tube). Quatre répétitions par dilution ont été réalisées.

Pour chaque série de répétitions par dilution un sac de plastique ou un tube non inoculé ont servi de témoin. Dans le cas de la culture pure les dilutions 10^{-6} à 10^{-11} ont servi pour inoculer les plantes dans les tubes et dans les compartiments de sacs en plastique.

Expression des résultats

Le nombre le plus probable MPN (Most probable number) de Rhizobium par gramme du sol sec ou par ml de la suspension de la culture pure a été calculé à partir du nombre caractéristique (M) donné respectivement par des tables 3.4a et 3.5a présentées par Vincent (1970).

Le nombre caractéristique (M) est fonction du type de dilution (10 en 10, ou 4 en 4 ou, ...) du nombre de répétitions (n) par dilution, du nombre (S) de dilutions utilisées pour inoculer les plantes et du nombre total d'unités

nodulées. Ce nombre caractéristique est multiplié par l'inverse de la dilution la plus faible pour déterminer le NPP.

Résultats et Discussion

Présentation des régions étudiées et choix des sols

La présentation des régions étudiées avec leurs caractéristiques édapho-climatiques est résumée dans le tableau n° 2.

Tableau N° 2-Présentations des régions étudiées

Domaine Naturel	Géologie	Sols dominants	Climatologie
Plateau de SAIS	<p>Se caractérise par la complexité des sédiments calcaires. Talasse (1953) a montré la présence de :</p> <ul style="list-style-type: none"> *calcaire dur *calcaire crayeux peu solides « tuf » <p>Les informations lacustres reposent sur le Miocène supérieur, les tertiaires n'apparaissent que localement</p>	<p>3 grands groupes :</p> <ul style="list-style-type: none"> Sols à caractères steppiques (isohumiques) Sols calcimagnésiques Sols à sesquioxydes représentés par les sols rouges méditerranéens d'après Bruand A 1984 	<p>D'après Emberger et sauvage le climat est considéré comme semi-aride à hiver tempéré. L'aridité et la continentalité sont plus accentuées à Fès qu'à Meknès.</p> <p>Quotient pluviothermique d'Emberger Meknes. 66, Fes : 59 °</p> <p>Moisture index de thornthwaite : Meknès -12.7 ; Fès - 18.32</p> <p>Moyenne des températures du mois le plus froid Meknès 4.4 ; Fès 4.3</p> <p>Moyenne des précipitations annuelles 530 mm</p>
CHAOUIA	<p>Elle appartient au domaine atlasique. Le socle hercynien constitue le substratum commun pour toute la région et affleure à plusieurs endroits et disparaît sous des formations secondaires et tertiaires. La totalité des formations géologiques sont calcaires.</p>	<p>Calcimagnésiques</p> <p>Vertisols</p> <p>fersiallitiques</p>	<p>Climat aride à semi – aride à hiver tempéré.</p> <p>Les précipitations moyennes annuelles sont de 408 mm.</p> <p>Température max moy 30-36°C</p> <p>Température moy mini 4°C</p>

<p>PLATEAU CENTRAL</p>	<p>On trouve les mêmes schistes grés quartzite à la base desquels se superposent d'importants dépôts permio-triasiques et une couverture transgressive miocène et pliocène.</p>	<p>Sols hydromorphes Vertisols Fersiallitiques (Ghanem 1987)</p>	<p>Semi- aride, caractérisé par un hiver froid et un été chaud. Les précipitations sont comprises entre 450 et 600 mm /an. Les températures moyennes annuelles se situent entre 17-18°C</p>
<p>Couloir pré-rifain</p>	<p>Domaine d'un relief collinaire à pente variable suivant les régions, diverses plates formes</p>	<p>Vertisols ou sols Calcimagnésiques. Sols peu évolués d'érosion.</p>	<p>La pluviométrie varie entre 500mm vers l'ouest et 700mm vers l'est</p>
<p>PLATEAU DE GHARB</p>	<p>Les sols de la plaine du Gharb se forment dans des conditions de relief peu accusées, sur des alluvions en général fines, la plaine a connu un remplissage argileux du quaternaire.</p>	<p>Vertisols Sols peu évolués Sols isohumiques subtropicales</p>	<p>Semi-aride à l'intérieur et subhumide sur la cote Précipitations dépassent 500mm/an La saison fraîche et humide dure 7 mois d'Octobre à Avril. Le régime thermique est caractérisé par des températures moyennes mensuelles qui fluctuent entre 18,4 et 31°C pour les Max</p>
<p>MOYEN ATLAS</p>	<p>Le causse moyen atlas repose sur des terrains anti-jurassique constituant le substratum du causse. Le permio trias recouvre ses terrains primaires en discordance et se rencontre sur toute la bordure et sur le plateau grâce à des accidents tectoniques ou à l'érosion qui a décapé le lias sus-jacent.</p>	<p>Minéraux bruts Peu évolués Vertisols Isohumique Calcimagnésiques A sesquioxyde</p>	<p>Le climat est dissymétrique, on passe des zones subhumides à hiver froid (domaines des causses) à des zones à climat semi-aride à hiver frais (basse de khénifra). Le régime pluviométrique est saisonnier de type méditerranéen, on enregistre une moyenne annuelle de 1158 mm dans les bordures occidentales et seulement 706 mm à Ouiouane et à El Hammam. Les températures</p>

			<p>moyennes minimales sont situées entre -1 et 3°.</p>
--	--	--	--

Caractéristiques physico-chimiques des sols des régions étudiées

L'étude physico-chimique des différents échantillons des sols a permis leur caractérisation qui est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : caractéristiques physico-chimiques des sols des régions étudiées.

SIT ES	GRANULOMETRIE										pH				
	SG %	% SF	% S	% L	% A	M O %	% C	% N	C/ N	E A U	K cl	N(P PM)	P(p pm)	K(p pm)	
MA Z	8.2 5	39. 93	48. 18	8.9 4	42. 87	1.4 0	0. 82	0. 14	5. 85	6. 85	5. 79	12.0 4	9.43	105. 6	
ME R	15. 44	22. 14	37. 56	25. 29	37. 12	1.3 9	0. 8	0. 18	4. 44	6. 42	5. 53	18.2 4	35.6 1	247. 5	
S.B ET	21. 59	19. 45	41. 04	38. 01	20. 95	0.4 4	0. 26	0. 11	2. 36	6. 07	5. 18	14.0 6	-	55.5 5	
KH E	29. 01	9.2 6	38. 27	41. 5	20. 22	1.1 8	0. 69	0. 13	5. 30	6. 48	5. 57	20.6	13.3 5	70.2	
MK 2	15. 58	18. 11	33. 69	46	20. 32	2.3 3	1. 35	0. 25	5. 4	7. 38	7. 39	59.5 8	21.4 2	70.2	
MK 1	19. 83	27. 42	47. 25	19. 77	32. 97	1.7 4	1. 01	0. 16	6. 31	8. 08	7. 21	25.3 1	10.6 6	252. 5	
FE S	4	18. 37	22. 37	53. 51	24. 17	1.4 3	0. 82	0. 36	2. 27	8. 17	7. 28	32.0 0	32.0 6	394. 4	
GH B	2.3 9	2.9 9	5.3 8	53. 27	41. 35	1.0 1	0. 59	0. 24	2. 45	8. 56	7. 25	22.9 4	3.32	201. 9	
TIS	4.8 7	9.6 2	14. 49	34. 81	50. 70	1.5 1	1. 27	0. 13	9. 76	7. 74	7. 28	20.6	8.19 5	480. 5	
SE T	1.2 0	10	11. 2	36. 21	52. 62	2.7 2	1. 58	0. 3	5. 26	8. 38	7. 08	36.7 6	16.2 9	95.5	

MAZ : MAAZIZ	SG% : Sable Grossier
MER : Merchouche	SF% : Sable Fin
S.BET : Sidi Battache	S% : Sable
Khe : Khénifra	L% : Limon
MK2 : Meknès2	A% : Argile
MK1 : Meknès1	MO% : Matière Organique
FES : Fès	C% : Carbone
GHB : Gharb	N% : Azote
TIS : Tissa	NT% : Azote Total
SET : Settat	

Dénombrement de la population de *Rhizobium* sp (Cicer) dans le sol Comparaison de la technique sur NPP et de la méthode de dénombrement sur boîte

Avant de procéder au dénombrement de population de *Rhizobium* sp (Cicer) dans le sol par la méthode du NPP, la validité de cette technique a été testée en la comparant à la technique classique de dénombrement de cellules en boîtes de pétri contenant un milieu YEM gélosé et ceci pour une culture pure de *Rhizobium* sp (Cicer) (souche IBM) prise à la phase exponentielle de croissance. Les résultats de nodulations obtenus dans les quatre systèmes de culture utilisés sont représentés dans les tableaux 4-7. Le dénombrement de cellules viables de *Rhizobium* sp (Cicer) de la culture pure par la méthode de dénombrement en boîte a révélé que la culture est pure et contient $5,06 \cdot 10^9$ cellules de *Rhizobium* /ml.

Selon les résultats de la nodulation obtenus dans le système d1 le nombre le plus probable de *Rhizobium* /ml de suspension est de 10^7 .

Tableau 4: Comparaison des dénombrements de *Rhizobium* sp (Cicer) par la méthode MPN et le comptage de cellules viables en boîte. Cas du système du culture d1

(+ : Présence d'au moins une nodosité. - : Absence de nodosités).

Dilutions	Techniques du nombre le plus probable (MPN)					Dénombrement en boîte	
	Nodulation 4 répétitions par dilution(1)				Nombre d'Unités nodulées	Cellules viables de <i>Rhizobium</i> /ml	
10^{-1}	+	+	+	+	4	10^7 Rh/ml	
10^{-2}	+	+	+	+	4		
10^{-3}	+	+	+	+	4		
10^{-4}	+	+	+	+	4		
10^{-5}	+	+	+	+	4		
10^{-6}	+	+	+	-	3		
10^{-7}	+	+	+	-	3		
10^{-8}	-	-	-	-	0		
10^{-9}	+	-	-	-	1		
10^{-10}	-	-	-	-	0		
10^{-11}	-	-	-	-	0		
Total						27	
Témoins						0(+)/11	

Les résultats de nodulation dans le système de culture de plante d2 ont permis d'estimer le nombre le plus probable (NPP) qui de 10^8 de UFC de *Rhizobium* par ml (Tableau 5).

Tableau 5: Comparaison des dénombrements de *Rhizobium* sp (Cicer) par la méthode MPN et le comptage de cellules viables en boîte. Cas du système du culture d2. (+ : Présence d'au moins une nodosité. - : Absence de nodosités).

Dilutions	Techniques du nombre le plus probable (MPN)	Dénombrement en boîte
-----------	---	-----------------------

	Nodulation 4 répétitions par dilution(1)				Nombre d'Unités nodulées	MPN Rhizobium/ml	Cellules viables de Rhizobium/ml
10 ⁻¹	+	+	+	+	4	10 ⁸	5.06×10 ⁹
10 ⁻²	+	+	+	+	4		
10 ⁻³	+	+	+	+	4		
10 ⁻⁴	+	+	+	+	4		
10 ⁻⁵	+	+	+	+	4		
10 ⁻⁶	+	+	+	+	4		
10 ⁻⁷	+	+	+	-	3		
10 ⁻⁸	+	+	+	-	3		
10 ⁻⁹	+	-	-	-	0		
10 ⁻¹⁰	-	-	-	+	1		
10 ⁻¹¹	-	-	-	-	0		
Total					31		
Témoins					11(+)/11		

Les résultats de nodulation obtenus dans le système d3 sont négatifs pour toutes les nodulations (Tableau 6) d'où le rejet de ce système pour le dénombrement ultérieur du Rhizobium sp (Cicer) dans le sol.

Tableau 6 : Comparaison des dénombrements de Rhizobium sp (Cicer) par la méthode MPN et le comptage de cellules viables en boîte. Cas du système de culture d3 (+ : Présence d'au moins une nodosité ; - : Absence de nodosités).

Dilutions	Techniques du nombre le plus probable (MPN)					Dénombrement en boîte	
	Nodulation 4 répétitions par dilution(1)				Nombre d'Unités nodulées		MPN Rhizobium/ml
10 ⁻¹	-	-	-	-		0	
10 ⁻²	-	-	-	-	0		
10 ⁻³	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁴	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁵	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁶	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁷	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁸	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁹	-	-	-	-	0		
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	0		
10 ⁻¹¹	-	-	-	-	0		
Total					0		
Témoins					0(+)/11		

Les résultats du système d4 sont très variables (Tableau 7) par conséquent le système a été rejeté. Une telle variabilité de nodulation dans le système de culture en sacs de plastique a été aussi rapportée par Toomsan et al (1984).

Tableau 7- Comparaison des dénombrements de *Rhizobium* sp (Cicer) par la méthode MPN et le comptage de cellules viables en boîte. Cas du système de culture d4 (+ : Présence d'au moins une nodosité ; - : Absence de nodosités).

Dilutions	Techniques du nombre le plus probable (MPN)					Dénombrement en boîte	
	Nodulation 4 répétitions par dilution(1)				Nombre d'Unités nodulées	MPN <i>Rhizobium</i> /ml	Cellules viables de <i>Rhizobium</i> /ml
10 ⁻¹	+	-	-	-	1	Non calculé du fait d'absence de nodulation	5.06×10 ⁹
10 ⁻²	-	-	-	-	0		
10 ⁻³	+	-	-	-	1		
10 ⁻⁴	+	-	-	-	1		
10 ⁻⁵	+	-	-	-	1		
10 ⁻⁶	+	-	-	-	1		
10 ⁻⁷	+	-	-	-	1		
10 ⁻⁸	-	-	-	-	0		
10 ⁻⁹	+	-	-	-	1		
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	0		
10 ⁻¹¹	-	-	-	-	0		
Total					7		
Témoins					2(+)/11		

Dans le cas du système d2, tous les témoins non inoculés ont présenté des nodosités, d'où la non fiabilité des observations sur la nodulation et par conséquent le rejet de ce système pour son utilisation pour le dénombrement de *Rhizobium* dans le sol. Le dernier système d1 qui consiste à utiliser les plantules de pois-chiche naines, avec cotylédons a été développé par Toomsan et al (1984) dans le but d'utilisation des tubes à essai comme système de culture des plantes.

En plus, des problèmes de contamination des tubes témoins dans ce système (d2), la valeur du MPN obtenu (10⁸ cellule/ml) est loin de la valeur obtenue par la méthode classique est fiable de comptage en boîte qui était de 5,06.10⁹ cellules de *Rhizobium*/ml (D'après le tableau 5).

Bien que les résultats de la méthode MPN obtenus par le système d1 10⁷ cellules de *Rhizobium*/ml est 500 fois plus inférieur que celui du nombre obtenu en boîte, nous avons jugé que c'est le seul système de culture de plante parmi les 4 systèmes étudiés à utiliser dans le dénombrement des populations de *Rhizobium* sp (Cicer) dans le sol, du fait qu'il a présenté le moins de problèmes de contamination.

Dénombrement de *Rhizobium* sp Cicer dans le sol

La taille d'une population rhizobienne dans le sol est un critère important à savoir dans toute étude de réponse de légumineuses à l'inoculation et d'évaluation du potentiel de fixation symbiotique d'azote d'un sol donné.

Lorsque le système d1 a été utilisé pour dénombrer les populations de *Rhizobium* sp (Cicer) dans différents sites étudiés, les résultats de nodulation dans un premier essai de dénombrement étant très contradictoires et dans la plupart des cas négatifs. Cet essai a fait l'objet d'une 2^{ème} répétition et a révélé les mêmes défaillances que celles observées dans le 1^{er} essai.

Il a été rapporté que l'utilisation du sable est de la vermiculite comme support pour la croissance des plantes sous-estime le nombre de *Rhizobium* (Vincent 1970 et Brockwell 1982). Vincent (1970) a évalué cette sous-estimation de 10 à 100 fois. Brockwell (1982) a rapporté une sous-estimation de 39 % dans le cas de *Rhizobium trifolii*, il a expliqué cette sous-estimation par l'effet réduit de la Rhizosphère, et par le fait que quelques *Rhizobiums* introduits n'arrivent pas à la Rhizosphère du fait de la discontinuité entre le point d'application de *Rhizobium* et la partie des racines à infecter.

Au terme de cette expérience la taille des populations de *Rhizobium* sp (Cicer) dans les différents sites étudiés n'a pas pu être estimée par la méthode MPN. De ce fait, il serait souhaitable que d'autres systèmes de culture des plantes soient essayés. Sachant que la distribution des populations rhizobiennes est corrélée aux caractéristiques physicochimiques des sols (Bakhoum et al., 2017), il est souhaitable de trouver une nouvelle méthode qui consiste à enrichir les dilutions de sols avant de les inoculer.

References:

1. Bakhoum, N., Le Roux, C., Diouf, D., Kane, A., Ndoeye, F., Fall, D., Duponnois, R., Noba, K., Sylla, S.N., Galiana, A. 2017. Distribution and Diversity of Rhizobial Populations Associated with *Acacia senegal* (L.) Willd. Provenances in Senegalese Arid and Semiarid Regions. *Open Journal of Forestry* 2014. Vol.4, No.2, 136-143
2. Bilan annuel du Ministère d'Agriculture et de la Pêche Maritime 2016.
3. Brockwell, J. 1982. Plant infection count of *Rhizobia* in soils. In : Nitrogen fixation in legumes. Academic Press Australia. 41-58
4. Broughton, W. J. and DILWORTH, M. J. 1971. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochem. J.* 125, 1075-1080
5. Bruand, A. 1984 : Les sols de sables : Essai synthétiques bulletin de l'ENA de Meknes n° 1 p17-35
6. Drevon, J.J. 1983. Les différents organismes fixateurs d'azote 1 biol 2. FAO/Gret. in fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote. FAO Rome.
7. Ghanem, H. 1978. Contribution à l'étude des sols du Maroc : Génèse, classification et répartition des sols des régions des zaers et de ses bordures. Thèse de docteur es-science université d'Etat de Gand.

8. Keeny,D.R1982.Nitrogen availability indice. In methods of soil analysis,part II2 end edition,711_730,American society of agronomy,Madison,Wisconsin.
9. Rapport annuel du MAPM,direction des filières 2012
10. Talasse,P.1953.Recherche géologique et hydrologique dans le bassin lacustre de Fes-Meknes.Notes et mécanismes du service géologique du Maroc n°115-300p.
11. Sing,R.P.1990.Status of chickpea in the world.Research reports.Crisat.International chickpea,newsletter
12. Toomsan,B,Rupella,OP.,Mittals.,DartP.J.and KlarkK.w.,1984,counting biology and biochemistry 16,503-507
13. Vincent,J.M.1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBM Handbook no 15. Brackwell OXFORD 1-64
14. Wei, G.H., Wang, E.T., Tan, Z.Y., Zhu, M.E., Chen, W.X. 2002. Rhizobium
15. indigoferae sp. nov. and Sinorhizobium kummerowiae sp. nov.respectively isolated from Indigofera spp. and Kummerowias tipulacea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52: 2231-2239
16. Wery,J.GrignacP.1983.Les utilisations des légumineuses et leur importances économique.II syst.4 in fiche technique de la fixation symbiotique de l'azote FAO.