

INSTITUT DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DU RWANDA

I. S. A. R.

NOTE TECHNIQUE

RECHERCHE D'UN SUBSTRAT SOLIDE SERVANT  
DE SUPPORT A UNE SOUCHE DE RHIZOBIUM ET  
DESTINE A LA DIFFUSION EN MILIEU RURAL

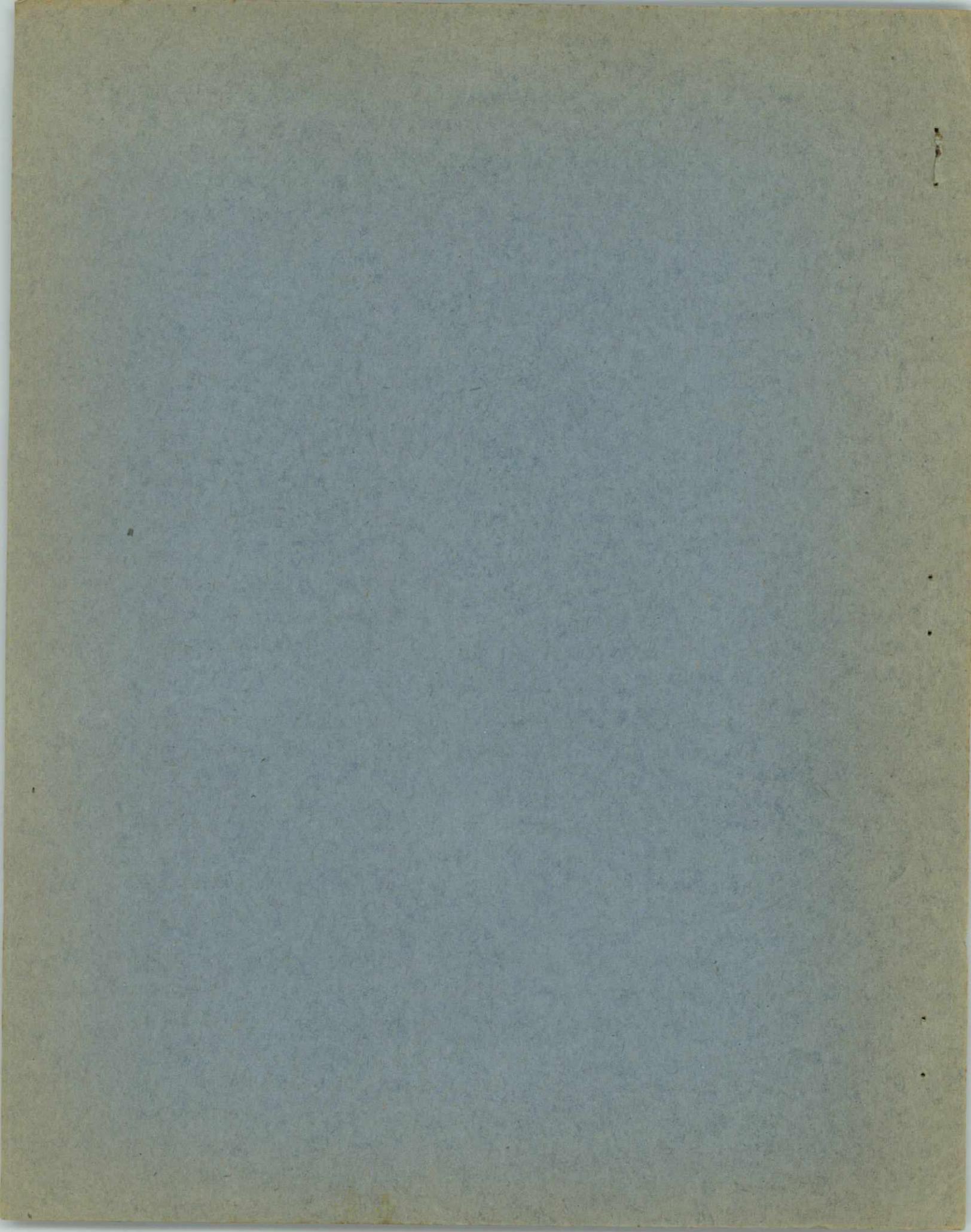
par

A. CAMERMAN,  
Chef du groupe des plantes vivrières à Rubona

N° 3

1975

861  
198



RECHERCHE D'UN SUBSTRAT SOLIDE SERVANT DE SUPPORT  
A UNE SOUCHE DE RHIZOBIUM ET DESTINE A LA DIFFUSION  
EN MILIEU RURAL.

---

1. INTRODUCTION.

La valeur de diffusion d'un inoculum est liée à sa richesse en bactéries et à son prix de revient.

De très nombreux substrats de toutes natures ont été étudiés et mis au point par les chercheurs s'intéressant à la rhizobioculture. En Europe, en Australie et aux U.S.A., un substrat à base de tourbe est le plus largement diffusé.

Nous avons essayé dans cette série d'essais de trouver le support solide le plus avantageux pour la diffusion du Rhizobium au Rwanda.

Les milieux étudiés ne sont pas des milieux neufs; ils ont déjà été étudiés ailleurs ( 1 ), mais ils ont retenu votre attention car il était possible de les fabriquer sur place.

Quelques modifications ont été apportés aux formules originelles et ce, en fonction des matériaux disponibles au Rwanda.

Les différents substrats ont été testés avec un Rhizobium japonicum, le "3.15" originaire du laboratoire de Microbiologie du Sol de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat à Gembloux.

Cette souche a été choisie pour les raisons suivantes: depuis quelques années, la culture du soja est en extension continue dans le pays; de strictement vivrier, le soja peut devenir d'ici quelques temps, une culture à caractère industriel (huilerie, engraissement porcs), l'inoculation de cette plante par la souche "3.15" donne des résultats souvent spectaculaires en milieu rural (4 et 5).

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Dans un premier stade, huit milieux (n<sup>os</sup> I à VIII) sont expérimentés (§ 5). Très rapidement, pour des raisons d'ordre pratique, les milieux VII et VIII sont abandonnés.

A la fin de la première série d'essais, le milieu IV est étudié à part, en modifiant un de ses composants (§ 6).

Les milieux II et III sont également repris, légèrement modifiés et testés à nouveau (§ 7).

Toute l'expérimentation se fait avec la souche "3.15" (*Rhizobium japonicum*).

Chaque milieu confectionné est réparti à poids égal dans des Erlenmeyers. Ceux-ci bouchés à l'ouate, puis stérilisés à l'autoclave à 120° C. trois fois une heure, à 24 heures d'intervalle. Chaque substrat est ensuite ensemencé avec 5 ml. d'une culture liquide du *Rhizobium* choisi et est mis à incubation à 28°C. dans une étuve. (Il convient de préciser que cette température de 28°C. ne reste pas constante 24 heures sur 24. En effet, tous les jours de midi à treize heures trente et de 23 h. à 7 h., l'électricité est coupée. De ce fait, la température redescend à 23-24° C. Cette variation n'a d'ailleurs pas l'air d'influencer le développement de la souche bactérienne).

Les Erlenmeyers sont laissés pendant toute la période de l'essai dans l'étuve.

Des comptages sont ensuite effectués après 8, 15, 30, 45 et 60 jours suivant la méthode décrite par Bonnier et Brackel (3).

Chaque objet a été répété plusieurs fois.

3. MILIEUX TESTES.

Ingrédients	Milieu testés							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Son de froment	40 gr.	120 gr.	120 gr.	48 gr.	24 gr.			
Paille de froment	70 gr.	120 gr.	120 gr.	78 gr.	78 gr.		56 gr.	56 gr.
Farine de Desmodium	25 gr.				24 gr.			
Ca CO <sub>3</sub>	10 gr.	2 gr.	2 gr.	12 gr.	12 gr.	3 gr.	2 gr.	2 gr.
H <sub>2</sub> O	300 ml.		200 ml.	300 ml.	300 ml.			
Argile	100 gr.			100 gr.	100 gr.			
R <sub>1</sub>		200 ml.				110 ml.	140 ml.	140 ml.
Balles de Riz						50 gr.		
Son de maïs							96 gr.	
Farine de maïs								96 gr.

Commentaires.

a. R<sub>I</sub> = milieu R<sub>I</sub> de WRIGHT.

Composition :	Mannite	10 gr
	Na Cl	0,2 gr
	K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	0,5 gr
	Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,2 gr
	Ca SO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,1 gr
	Ca CO <sub>3</sub>	0,1 gr
	Eau de levure	100 ml
	Eau distillée	900 ml.

b. Le son et la paille de froment, le son de maïs et les balles de riz sont passés au moulin à marteau au travers d'un tamis de 2 mm.

c. La farine de Desmodium remplace la farine de Luzerne quand elle est nécessaire.

d. La craie est utilisée sous forme de  $\text{Ca CO}_3$  pur et finement moulu pour laboratoire.

e. Les milieux I à V et VII sont ceux testés par Ouattara (8) avec le remplacement de la farine de Luzerne par la farine de Desmodium. Le milieu VI est celui préconisé par Bonnier (1 et 2) et utilisé jusqu'en 1974 pour les essais d'inoculation à l'ISAR. Le milieu VIII est une variante de VII essayé à Rubona.

f. Remarque:

Aucun milieu à base de tourbe n'a été utilisé et ce pour des raisons d'ordre pratique.

Il existe, en effet, des tourbières au Rwanda et celles-ci pourraient être exploitées pour obtenir un substrat pour le Rhizobium.

Toutefois certaines raisons ont fait que, pour l'instant, ce substrat a été abandonné: - Si l'extraction, le séchage et le broyage ne posent en fait aucun problème matériel, le conditionnement de la tourbe n'est pas réalisable au Rwanda. Il convient en effet d'obtenir des particules de  $\pm 2$  mm de grandeur; or les quelques essais de broyage effectués à Rubona n'ont jamais donné qu'une poudre assez fine qui lors de l'humidification formait un bloc sans aération. Le pourcentage de bactéries par gramme était très faible.

- En deuxième lieu, il a été constaté à la Chaire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques que certaines tourbes libéraient des toxines au moment de la stérilisation à l'autoclave.

4. COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS.

Constituants	Mat.sèche %	teneur en prot. brutes %	teneur en lip. bruts %	E.N.A. %	Cellulose %	Ca %	Mg %	P %	K %	Na %	Si %
Son de froment (1)	87,8	14,3	4,2	52,2	10,2	0,11	0,54	1,17	1,27	0,02	
froment *	90,0	25,6	3,6	-	8,4	0,14	0,42	1,15	1,38	0,05	
Paille de froment (2)	85,7	3,0	1,2	36,0	40,9	0,16	0,04	0,21	0,52	0,06	
froment *	94,1	7,1	1,3	-	33,3	0,23	0,08	0,24	1,58	0,06	
Son de maïs (4)	86,0	10,7	8,5	56,1	5,9	0,06		0,72			
Farine de maïs (3)	a)87,0 b)86,22	a) 9,9 b) 9,75	a) 4,4 b) 1,87	a)69,2 b)68,63	a)2,2 b)4,1						
Farine de Desmodium *	87,0	16,4	2,1	-	18,7	1,52	0,32	0,39	1,89	0,14	
Balles de riz *	92,0 96,7	3,0 5,6	0,8 0,8	28,4 -	40,7 41,2	0,08		0,08			

1-2 : chiffres sans astérisque: Tableaux de composition moyenne de divers aliments pour le bétail (feuilles photocopiées - Chaire de Zootechnie - Fac. Sc. Agr. Gembloux)

3 : a) E.T. HALNAN and F.H. GARDNER: The principles and practice of feeding farm animals. Ed. Longmans, Green and Co (London).

b) VAN DEN ABEELE M. et VANDEPUT R.: Les principales cultures du Congo Belge, Publication de la Direction de l'Agriculture, des forêts et de l'élevage.- Bruxelles - 1956.

4 : Mémento de l'Agronome - Secrétariat d'Etat aux Affaires Etrangères. Rép. Française.

: Analyses faites au laboratoire de chimie de l'ISAR à Rubona par H. DE PRINS.

5. RESULTATS DE LA PREMIERE SERIE.5.1. Tableau des résultats.

Résultats des comptages microbiens après:

Milieux	8 jours	15 jours	30 jours	45 jours	60 jours
I	145,50	219,50	429,75	393,75	346,75
II	539,50	INFECTION	-	-	-
III	179,00	INFECTION	-	-	-
IV	331,50	409,00	338,00	384,25	527,00
V	229,25	363,25	421,00	415,50	312,50
VI	177,75	142,00	173,00	100,50	137,50
VII	280	337	443	180	INFECTION
VIII	419	317	600	744	407

N.B. Les résultats des comptages de colonies sont à multiplier par  $10^8$ .

Ces chiffres correspondent au nombre de Rhizobium par gramme de substrat humide.

5.2. Commentaires des résultats.

Il convient en premier lieu de noter l'élimination rapide des deux milieux à base de son de maïs (n°VII et n°VIII). Malgré leur intérêt indéniable ces milieux sont trop difficilement réalisables au Rwanda et ne présentent donc qu'un intérêt théorique. Le maïs est surtout consommé à l'état laiteux et il est très difficile de se procurer du son de maïs. Quant à la farine son prix de revient est trop élevé. Le milieu à base de son de maïs pourra être étudié à nouveau, lorsque une minoterie fera de la farine de maïs et que par la même occasion, on trouvera facilement du son sur le marché. Nous nous sommes donc penchés sur les six milieux restants.

Les résultats sont présentés sous forme d'une moyenne de quatre répétitions.

Nous laissons pour l'instant les milieux II et III de côté, car l'infection rapide, répétée au cours de toutes les répétitions nous a amené à modifier la teneur en eau de ces milieux. Ces deux milieux font l'objet d'un autre essai décrit au § 7.

Les milieux I et V ont une augmentation rapide de la population bactérienne durant les trente premiers jours; par la suite, on observe une diminution lente de la population.

Le milieu IV a une croissance en dent de scie, Constatons que le nombre de colonies est très élevé après 8 jours; et il ne semble pas y avoir de diminution après deux mois. Le nombre de bactéries reste relativement stable.

Le milieu VI est en quelque sorte, le milieu témoin. En effet, celui-ci a été utilisé de 1969 à 1974 pour les essais d'inoculation à l'ISAR. Il montre également une croissance en dent de scie, mais, le chiffre donné après 45 jours est anormalement bas. Cela est dû à une infection tardive qui sans tuer tous les rhizobium, a provoqué une chute du nombre de colonies lors d'une des répétitions.

Notons que ce milieu est celui où le développement des bactéries est le moins abondant par rapport à tous les milieux testés.

### 5.3. Conclusions.

Le milieu VI à base de balles de riz a été utilisé pendant 5 ans pour la plupart des essais d'inoculation. Il a d'ailleurs toujours donné satisfaction. Toutefois, parmi tous les substrats testés ce milieu VI donne un nombre moyen de bactéries le moins élevé au gramme de matière humide. Il a été pendant un an remplacé par le milieu n°IV. Ce dernier s'avérait intéressant par son nombre élevé de Rhizobium par gramme de matière humide et aussi par sa composition simple et peu coûteuse. Le seul produit importé est le Ca CO<sub>3</sub> de laboratoire.

Ce constituant reste cependant assez cher; nous l'avons remplacé successivement par de la chaux du pays et par de la craie alimentaire. Les résultats de cet essai sont donnés au § 6.

Les milieux II et III ont retenu également notre attention, d'une part à cause du nombre très élevé de bactéries, d'autre part à cause des "facilités" anormales de ces milieux à s'infecter. Leurs formules ont été légèrement modifiées et ils ont été retetés à part. Les résultats de cet essai font l'objet du § 7.

## 6. INFLUENCE DE DIFFERENTS MILIEUX CALCAIRES INCLUS DANS LE SUBSTRAT IV SUR LE DEVELOPPEMENT DU RHIZOBIUM.

### 6.1. Tableau des résultats.

Milieux calcaires	Résultats des comptages bactériens après			
	15 jours	30 jours	45 jours	60 jours
Ca CO <sub>3</sub> (laboratoire)	871	+ de 1000	644	638
Chaux locale	634	+ de 1000	295	Infection
Craie alimentaire	1.780	+ de 1000	669	Infection

Chiffres à multiplier par 10<sup>8</sup>.

### Composition des milieux calcaires.

Ca CO<sub>3</sub> : carbonate de calcium pur de laboratoire

Chaux locale: Ca CO<sub>3</sub> 29,2 %

Ca O 35,4 %

Mg O 10,7 %

Craie alimentaire: Ca CO<sub>3</sub> 42,0 %

### 6.2. Commentaires des résultats.

Cet essai n'a fait l'objet que d'une répétition dans le temps. On peut constater: après 15 jours, le milieu à base de craie alimentaire à un nombre de Rhizobium plus important que les deux autres milieux; après 30 jours, les trois milieux sont équivalents; après 45 jours, le milieu à base de chaux locale voit son nombre de bactéries diminuer fortement par rapport aux deux autres substrats.

### 6.3. Conclusions.

Les conclusions tirées sont provisoires; en effet, il aurait fallu effectuer plusieurs répétitions dans le temps. Ce ne fut malheureusement guère possible.

De cet essai, on tire une conclusion importante: le  $\text{Ca CO}_3$ , si coûteux n'est pas indispensable. Il peut avantageusement être remplacé par de la craie alimentaire (beaucoup moins chère), à la rigueur par de la chaux locale plus intéressante encore au point de vue prix.

(N.B. Une expérimentation dans ce sens sera reprise avec le substrat n° III qui nous paraît intéressant à fabriquer dans les conditions locales - voir § 7).

### 7. ESSAIS SUR LES MILIEUX II et III.

Lors de la première série d'essais comparant les 8 milieux testés, nous avons constaté à l'infection très rapide et d'une façon régulière au cours des répétitions des milieux II et III.

Pour écarter au maximum les infections causées par les manipulations, une série de 10 flacons contenant pour moitié les milieux II et III sont stérilisés suivant le processus habituel (3 fois une heure à 24 heures d'intervalle).

Après stérilisation, les goulots de ces récipients, bouchés dès le départ à l'ouate sont encapuchonnés par du papier d'aluminium. Jamais après stérilisation les bourres d'ouate ne sont enlevées. Les flacons sont placés sur une étagère du laboratoire pour un temps indéterminé.

Après deux mois, un seul des dix flacons reste indemne de toute infection visible. Les neuf autres sont éliminés au fur et à mesure.

Ce genre d'infection n'est jamais constaté avec les milieux I, IV, V, et VI.

Les erreurs de manipulations doivent donc être écartées.

Nous nous sommes donc demandés si la teneur en eau de ces milieux n'était pas trop faible. ( $\pm 45\%$  du poids total). De ce fait le milieu relativement "sec" ne serait pas stérilisé complètement malgré les trois autoclavages.

C'est pourquoi, un nouvel essai d'incubation est effectué avec les teneurs en eau de 200, 300, 400 et 500 ml.; les autres constituants gardant les mêmes proportions.

### 7.1. Tableau des résultats.

Résultats des comptages microbiens après:

Milieux	8 jours	15 jours	30 jours	45 jours	60 jours	75 jours
<b>II</b>						
+ 200 ml $R_I$	0,052	infection	-	-	-	-
+ 300 ml $R_I$	0,055	20	469	infection	-	-
+ 400 ml $R_I$	121	374	445	618	824	463
+ 500 ml $R_I$	199	1098	686	882	403	343
<b>III</b>						
+ 200 ml $H_2O$	0,087	infection	-	-	-	-
+ 300 ml $H_2O$	0,381	472	infection	-	-	-
+ 400 ml $H_2O$	35	311	492	976	887	230
+ 500 ml $H_2O$	238	1159	1027	1417	435	537

Chiffres à multiplier par  $10^8$ .

### 7.2. Commentaires des résultats.

Les milieux II et III avec 200 ml de  $R_I$  et d' $H_2O$  sont infectés après 15 jours (infection visible). Après 8 jours, devant le nombre peu élevé de colonies de *Rhizobium*, on peut se demander si les germes de l'infection ne commençaient pas déjà à se développer et à inhiber le *Rhizobium*.

Les milieux avec 300 ml semblent un peu plus intéressants mais sont encore vite infectés.

Pour les deux dernières formules, la dose de 500 ml de liquide semble être la plus intéressante.

Observons également que l'humidification par  $H_2O$  donne un meilleur résultat pour le développement maximum des bactéries.

C'est une constatation très intéressante car le prix de revient du substrat en est diminué.

#### 8. CONCLUSIONS FINALES.

Cette étude avait pour unique but de trouver un support solide répondant aux critères suivants:

- 1) être bon marché
- 2) être de fabrication aisée
- 3) permettre la croissance d'un maximum de *Rhizobium* par gramme de substrat humide.
- 4) conserver un nombre élevé de bactéries pendant deux mois au moins.

Après les différents tests décrits ci-dessus, le milieu III légèrement modifié correspond à ces critères.

La formule proposée (et déjà utilisée depuis février 1975 en station ISAR) sera dans un premier stade la suivante:

Son de froment	: 120 gr.
Paille de froment	: 120 gr.
Ca CO <sub>3</sub>	: 2 gr.
H <sub>2</sub> O	: 500 ml.

Nous espérons ultérieurement pouvoir remplacer le Ca CO<sub>3</sub> par de la chaux locale ou à la rigueur par de la craie alimentaire.

A ce moment là, les quatres points seront respectés:

- 1) Bon marché: le son et la paille de froment ne coûtent actuellement que le prix du transport. Seule la craie alimentaire est importée mais à un prix raisonnable.
- 2) Fabrication aisée: à cause du nombre restreint de constituants et leur transformation limitée au hachage par moulin à marteau, nous préférons ce milieu aux n<sup>o</sup>s IV et V. Ceux-ci demandent en plus une extraction d'argile (IV et V) ou une récolte, un séchage et un broyage de feuilles de Desmodium (V). Ces manipulations demandent une main d'oeuvre et des frais supplémentaires pour une qualité équivalente à celle de la formule III.
- 3-4) Nombre élevé de Rhizobium pendant deux mois au moins: cette exigence est largement respectée.

M.B. LAGACHERIE (7) estime qu'il faut au moins un million de bactéries par graine pour que l'inoculation soit efficace.

Prenons le cas du soja var. Palmetto; nous constatons un nombre de bactéries fournies lors de l'inoculation largement suffisant. En effet il faut 30 kg. de semences/ha soit  $\pm$  240.000 graines.

Si nous considérons une teneur de  $30 \times 10^8$  Rhizobium par gramme humide (moyenne des contrôles du substrat n<sup>o</sup> IV lors de l'inoculation de plusieurs ha de soja), mois de 100 grammes de substrat sont nécessaires pour satisfaire les exigences de un million de bactéries par graine.

Or, nous préconisons 500 gr. de substrat par ha. Les besoins sont donc largement couverts.

N.B. Ces 500 gr. paraissent être du gaspillage, mais cette quantité est nécessaire pour que chaque graine reçoive, lors de l'inoculation plusieurs particules du substrat. Celles-ci sont en effet relativement grossières et il faut une quantité minimum de substrat pour que chaque semence eait plusieurs brins adhérent à sa surface.

Cette quantité minimum ne correspond pas nécessairement avec la quantité théorique. Ceci est d'autant plus important que ces particules sont collées à la graine suivant une méthode proche du pralinage préconisé par ISWARAN (6).

BIBLIOGRAPHIE.

- 1- BONNIER, C. - Symbiose Rhizobium - Légumineuses en région équatoriale. Public. I.N.E.A.C., Sér. Scient., 72, 1957.
- 2- BONNIER, C. et SEEGER, J. -Symbiose Rhizobium - Légumineuses en région équatoriale. Deuxième communication. Publi. I.N.E.A.C., Sér. Scient., 76, 1958.
- 3- BONNIER, C. et BRAKEL, J. -"Lutte biologique contre la faim"- Légumineuses-Rhizobium, Gembloux, Ed. Duculot, 1969.
- 4- CAMERMAN, A. - La culture du Soja au Rwanda. Note technique I.S.A.R. n°10, 1974.
- 5- I.S.A.R. - Rapports annuels du Groupe des Plantes Vivrières, 1973 et 1974.
- 6- ISWARAN, V. - Pellet inoculation of legumes seeds. In. Agri. Digest Review nr. 12, 1967.
- 7- LAGACHERIE, M.B. - L'inoculation du Soja - Bulletin CETIOM n°53. 4<sup>e</sup> trimestre 1973.
- 8- OUATTARA, B.P. - Mise au point de techniques d'inoculation des légumineuses en régions tropicales - Mémoire de fin d'études - Fac. des Sc. Agr. Gembloux - 1969.

A. CAMERMAN  
 A. HAKIZIMANA  
 Plantes Vivrières  
 ISAR Rubona  
 juin 1975.

