

## Evaluation des capacités de matières organiques comme support d'inoculum des bactéries solubilisatrices du phosphore en zone tropicale semi- aride

NADIELINE Christian Valentin<sup>1,4</sup>., KRASOVA-WADE Tatiana<sup>1</sup>., NDIAYE Mame Farma<sup>2</sup>., DIOUF Diegane<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 040, Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD (LCM), Centre de Recherche de Bel-Air, BP 1386, CP 18524 Dakar, Sénégal.

<sup>2</sup>Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Laboratoire National de de Recherche sur les Productions Végétales (LNRPV), Centre de Recherche de Bel-Air, BP 3120 Dakar, Sénégal.

<sup>3</sup>Université du Sine Saloum El Hâdji Ibrahima Niass (USSEIN), UFR Sciences Sociales et Environnementales, département Environnement, Biodiversité et Développement Durable, BP 55 Kaolack, Sénégal.

<sup>4</sup>Université Amadou Mathar Mbow (UAM), Ecole Supérieure des Sciences agricoles et de l'Alimentation (ES2A), Pôle Urbain de Diamniadio, BP 45927 Dakar NAFA VDN, Sénégal.

\*Auteur correspondant, e-mail : [chrismadie1@yahoo.fr](mailto:chrismadie1@yahoo.fr); Tel : (+221) 777273001

Submission 29<sup>th</sup> September 2023. Published online at <https://www.m.elewa.org/Journals/> on 31<sup>st</sup> December 2023. <https://doi.org/10.35759/JABs.192.2>

### RÉSUMÉ

**Objectifs** : L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la matière organique locale d'origine végétale comme support d'inoculum pour trouver une alternative biologique aux engrais chimiques.

**Méthodologie et résultats** : Pour cela, trois isolats ont été sélectionnés à partir une collection de 14 isolats de bactéries solubilisatrices du P obtenues à partir du sol rhizosphérique de *Guiera senegalensis* (*Microbacterium* sp. strain GS17) et du sol non rhizosphérique (*Staphylococcus* sp. strain SN1 et *Bacillus endophyticus* strain VFS2) provenant de trois zones agro écologiques du Sénégal (Bassin arachidier, Vallée du fleuve et Casamance). Un inoculum a été préparé avec ces souches en utilisant différents types de matières organiques comme support d'inoculum (balle de riz, tourbe et coque d'arachide) et évaluer la capacité des supports à conserver les souches à différentes dates de stockage (0, 7, 30, 90 et 180 jours) par la technique d'Unité Formant une Colonie. Les résultats ont montré (i) une bonne conservation des souches dans les différents supports jusqu'à 180 jours de stockage, (ii) une meilleure conservation et survie des souches dans le support balle de riz et coque d'arachide après 180 jours de stockage.

**Conclusion et application des résultats** : une bonne conservation et la survie des souches après 180 jours de stockage à la température ambiante ont été notées dans les supports Balle de Riz (BdR) et Coque d'Arachide (CdA). Les supports (BdR et CdA) peuvent ainsi être utilisés comme support d'inoculum avec ou en alternative à la tourbe.

**Mots clé** : Biofertilisant, Bactéries Solubilisatrices du Phosphore, Support d'inoculum et PGPR

## Evaluation of the capacity of organic matter as an inoculum carrier for phosphorus-solubilizing bacteria in semi-arid tropical zones.

### ABSTRACT

*Objectives:* The aim of this study is to evaluate local organic matter as an inoculum carrier to find an organic alternative to chemical fertilizers.

*Methodology and results:* For this, three (3) isolates were selected from a collection of fourteen (14) isolates of P-solubilizing bacteria obtained from *Guiera senegalensis* rhizosphere soil (*Microbacterium* sp. strain GS17) and non-rhizosphere soil (*Staphylococcus* sp. strain SN1 and *Bacillus endophyticus* strain VFS2) and from three (3) agro-ecological zones in Senegal (groundnut basin, River Valley and Casamance. An inocula was prepared with these strains using different types of organic matter as inoculum carriers (rice husk, peat and peanut shell) and evaluated the carriers' ability to retain the strains at different storage dates (0, 7, 30, 90 and 180 days) using the Colony Forming Unit technique. The results showed (i) a good conservation of strains in the different supports up to 180 days of storage, (ii) a better conservation and survival of strains in the rice husk and peanut shell support after 180 days of storage.

*Conclusion and application of results:* good conservation and survival of strains after 180 days' storage at room temperature were noted in the Rice Husk (RH) and peanut shell (PS) supports. The supports (BdR and CdA) can therefore be used as inoculum supports with or as an alternative to peat.

**Key words:** Biofertilizer, Phosphate solubilizing bacteria (PSB), Inoculum Carrier (RH, PS) and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

## INTRODUCTION

Les biofertilisants sont des préparations contenant des micro-organismes vivants ou latents, bénéfiques à la plante utilisés pour stimuler sa croissance (Gupta, 2017). Vessey (2003) définit un biofertilisant comme étant une substance contenant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués sur les semences, les végétales ou le sol, colonisent la rhizosphère ou la plante et favorisent sa croissance en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs. L'utilisation des biofertilisants pour remplacer ou diminuer l'utilisation des engrais chimiques reste un défi majeur pour l'agriculture et le développement durable (recherche d'un biofertilisant performant, adaptation des biofertilisants en milieu naturel sur une large gamme de cultures...). Ils ont été commercialisés pour la première fois en 1895 aux USA et en Angleterre pour inoculer les légumineuses (Brockwell et Bottomley, 1995). Au Sénégal, l'utilisation des biofertilisants a commencé dans les années 70 avec les travaux de Wey (1974) sur l'inoculation bactérienne des légumineuses. Les premiers biofertilisants ont été préparés avec des rhizobia et des champignons mycorhiziens (Wey, 1974). Avant l'utilisation du terme PGPR (*Plant growth-promoting rhizobacteria*) pour la première fois par Joseph W. Kloepper à la fin des années 1970 (Kloepper et Schroth 1978), les biofertilisants étaient préparés à partir de souches de rhizobium et de champignons mycorhiziens. Cependant, l'utilisation des champignons mycorhiziens est contraignante car elle nécessite la présence d'une plante hôte spécifique (relations de symbiose), alors que les PGPR n'ont pas cette contrainte. En effet, étant des bactéries libres de la rhizosphère, elles sont actives sur un large spectre de plantes. Ces micro-organismes renferment un groupe de microorganismes capables de solubiliser le phosphore (P) appelés Bactéries Solubilisatrices du Phosphore (BSP), qui ont la

capacité de rendre disponibles les formes de phosphore stable (non accessibles aux plantes). Le P est un macronutriment très important mais peu disponible dans les solutions du sol pour la plante car il s'associe avec d'autres éléments comme le fer, l'aluminium et le calcium (Kkan *et al.*, 2009). Pour développer un biofertilisant capable de solubiliser le phosphore, les deux éléments les plus importants à prendre en compte lors de la préparation de l'inoculum sont le support et la souche. Un support d'inoculum est une substance physique sur laquelle l'inoculum est fourni à la plante ou au sol (Gupta, 2017). Le support d'inoculum reste l'un des éléments majeurs de la qualité d'un biofertilisant. Plusieurs substrats (liquide et solide) ont été utilisés comme support (Dayamani, 2010; Deaker *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2009). Les plus utilisés sont les inocula en poudres ou à base de capsules, de granules ou encore liquides. L'un des paramètres essentiels pour le choix du support est la disponibilité du matériel utilisé comme support d'inoculum. Les inocula à base de capsule et de granules ont un coût très élevé et sont moins courants (Herrmann et Lesueur, 2013). Les inocula liquides permettent d'avoir un nombre très élevé de cellules (milieu de culture adéquate pour les bactéries) et sont faciles à appliquer (Schulz et Thelen, 2008). Par contre, d'après Bashan et de-Bashan (2015), la population bactérienne subit un déclin spectaculaire peu de temps après l'inoculation d'une suspension bactérienne dans le sol, à la surface des semences ou à la surface des racines. De plus les inocula liquides sont confrontés à des problèmes liés au transport et au stockage. D'après Herrmann et Lesueur (2013), les inocula liquides ont une faible viabilité pendant le stockage ; les températures basses de stockage limitent leur fraîcheur et elles sont plus sensibles aux conditions stressantes. Dans la plupart des régions du monde, les

biofertilisants sont souvent préparés en utilisant la tourbe (notation pour ces inocula en poudre) (Bashan et de-Bashan, 2015 ; Smith, 1992). Le Sénégal possède un bon nombre de produits organiques disponibles tels que les produits résiduels de la récolte (coque d'arachide, balle de riz, bagasse de canne à sucre...). Jusqu'ici très peu d'études ont été menées sur leur valorisation comme support d'inoculum. Ils sont le plus souvent utilisés pour l'alimentation de bétail, la fertilisation du sol (sous forme de compost) et l'énergie. Il reste encore un potentiel à exploiter pour la production d'inoculum et ainsi trouver des

alternatives à la tourbe. Le but de cette étude est d'évaluer les performances de divers substrats organiques localement disponibles comme support d'inoculum des bactéries solubilisatrices du phosphore isolées de sols collectés dans trois zones agro-écologiques du Sénégal. Plus spécifiquement il s'agira : (1) de préparer des inocula avec 3 souches, sélectionnées dans une collection de 14 souches, et de la matière organique locale (balle de riz, coque d'arachide et tourbe) comme support d'inoculum ; (2) de tester la viabilité des souches et la capacité de conservation des supports utilisés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Supports d'inoculum Origine :** Les différents supports utilisés dans cette étude (balle de riz, coque d'arachide et tourbe) ont été collectés entre Mboro (tourbe) et Sangalkam (balle de riz et coque d'arachide issus de la production agricole). Ils ont d'abord été séchés puis broyés (0,75 mm de diamètre) pour obtenir une poudre fine. Ils ont par la suite subi différents traitements (stérilisation, humidité, neutralisation) et analyses physico-chimiques avant leur utilisation.

**Caractérisation chimique des substrats :** Les analyses chimiques (azote total, carbone total, phosphore total, calcium, sodium, potassium) ont été réalisées au LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) de l'IRD/Bel-Air certifié ISO 9001-2015 selon les protocoles du laboratoire. Le C et N total ont été déterminés par combustion sèche au moyen d'un auto-analyseur élémentaire. Le phosphore total a été dosé par colorimétrie automatique avec formation d'un complexe jaune de phosphomolybdate qui prend une couleur bleue. La réaction s'est déroulée à froid (méthode de Murphy et Riley). Le dosage des cations a été fait par absorption atomique.

**Caractérisation physique des substrats :** Les analyses physiques (humidité, capacité rétention, matière sèche et pH) ont été faites par l'utilisation de protocoles standards. Le pH

du substrat a été mesuré par la méthode standard (10 g dans 90 ml d'eau) du laboratoire à l'aide d'une électrode combinée à pH-mètre. L'humidité des supports a été déterminée par des techniques standards du laboratoire par pesée après 72h à l'étuve à 105°C. Cette opération a été répétée 3 fois. La capacité de rétention en eau des différents supports a été déterminée par la méthode modifiée de Somasegaran (1985). Cette méthode consiste à ajouter 50 ml d'eau distillée dans 20 g de support puis à agiter pendant 2 heures. Le mélange est filtré dans un entonnoir contenant du papier filtre au-dessus d'une fiole graduée pendant une nuit. Le volume d'eau absorbé est calculé par la différence entre le volume initial et le volume recueilli. Cette quantité absorbée correspond à la capacité de rétention en eau ou par analogie en du liquide.

**Préparation des substrats :** Les supports présentant un pH acide comme la tourbe et la coque d'arachide ont été neutralisés avec la chaux (CaCO<sub>3</sub>). La neutralisation s'était faite en mélangeant 10 g du support avec 50 ml d'eau distillée suivi d'une agitation de 15 min. Des quantités de 0,25 g de chaux ont été ajoutées dans le mélange à des intervalles de temps de 5 min. La sonde du pH-mètre a été plongée dans le mélange pour une mesure en continue du pH au fur et à mesure de l'addition

de la chaux. L'opération a été arrêtée à pH 7,00 +/- 0,20. Dans notre étude la tourbe a été neutralisée en raison de 120 g.kg<sup>-1</sup> et la coque d'arachide de 60 g.kg<sup>-1</sup>. Et enfin, les trois supports ont été stérilisés à l'autoclave par trois autoclavages successifs espacés de 24 h (121 °C pendant 20 min avec une pression de 1 bar).

**Souches BSP et préparation des solutions bactériennes :** Les trois souches utilisées pour cette étude sont des bactéries solubilisatrices du phosphore (BSP) sélectionnées dans une collection de quatorze souches (Nadiéline *et al.*, 2019). Les souches sélectionnées pour cette étude ont été isolées à partir du sol rhizosphérique de *Guiera senegalensis* (*Microbacterium* sp. GS17), du sol non rhizosphérique (*Staphylococcus* sp. SN1 et *Bacillus endophyticus* VFS2) (Nadiéline *et al.*, 2019). La densité optique (DO = 540 nm) a été d'abord mesurée pendant 48 h pour déterminer la courbe de croissance des souches sélectionnées et surtout la phase exponentielle de la croissance. Pour cela, les souches ont été cultivées dans des erlenmeyers de 150 ml (contenant 125 ml du milieu TSB). Des mesures ont été effectuées par intervalle de 4 h jusqu'à atteindre la phase stationnaire. La phase exponentielle étant déterminée pour toutes les souches, la préparation de la solution bactérienne a été par la suite lancée. Pour cela, une colonie pure de la souche a été introduite dans un milieu Tryptic Soy Broth (TSB) (30 g dans 1 l d'eau purifiée) stérile et mise en agitation à 150 tours.min<sup>-1</sup> et à 28 °C dans des conditions d'obscurité. La culture a été arrêtée à la phase exponentielle de la croissance préalablement déterminée par la mesure de la DO. La détermination du nombre de cellules en fonction de la densité optique a été faite par la méthode du dénombrement des cellules viables ou d'unité formant colonie (UFC). Cette phase correspond à une densité optique comprise entre 1 et 1,5 (en fonction des souches) et qui correspondent à 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> pour la souche *Microbacterium* sp. GS17 et à 10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> pour les souches *Staphylococcus*

sp. SN1 et *Bacillus endophyticus* VFS2. La détermination du nombre de cellules a été déterminée dans les solutions bactériennes à la DO choisie comme suit : une série de dilution au 10<sup>ème</sup> été d'abord faite jusqu'à 10<sup>-9</sup>. Ensuite 0,1 ml des trois dernières dilutions ont été étalés dans les boîtes de Pétri contenant du milieu TSA et mises en culture dans une étuve à 28 °C. Enfin le comptage des colonies a été fait après 24 h de culture sur les boîtes. La formule suivante a été utilisée pour calculer le nombre de cellules dans chaque ml de solution :

$$N = n \times 1/V \times 1/d$$

N : nombre des Unités Formant Colonies (UFC)

n : nombre de colonies dénombrées

1/V : volume d'inoculum utilisé

1/d : dilution

**Inoculation des supports :** Tenant compte de la capacité de rétention des supports, la suspension bactérienne pure et fraîche a été inoculée dans des sachets plastiques (dimension 20 cm X 25 cm) contenant 200 g de support stérilisés à raison de 60 % de leur capacité de rétention en eau respectivement (Somasegaran et Hoben, 1994). Les supports stérilisés ont été inoculés avec une solution bactérienne d'une concentration de : *Staphylococcus* sp. SN1 (MK209014) : 7,20.10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, *Bacillus endophyticus* VFS2 (MK209016) : 6,80.10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> et *Microbacterium* sp. GS17 (MK209027) : 8,17.10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. Chaque support reçoit chacune des souches individuellement ainsi les traitements suivants ont été obtenus sur la base de combinaisons de support et d'isolat :

- Balle de riz (BdR)/ *Staphylococcus* sp. SN1 : **BdR\*SN1**,
- Balle de riz (BdR)/ *Bacillus endophyticus* VFS2 : **BdR\*VFS2**,
- Balle de riz (BdR)/ *Microbacterium* sp. GS17 : **BdR\*GS17**,
- Coque d'arachide (CdA)/ *Staphylococcus* sp. SN1: **CdA\*SN1**,
- Coque d'arachide (CdA)/ *Bacillus endophyticus* VFS2: **CdA\*VFS2**,

- Coque d'arachide (CdA)/ *Microbacterium* sp. GS17 : CdA\*GS17,
- Tourbe (To)/ *Staphylococcus* sp. SN1: To\*SN1,
- Tourbe (To)/ *Bacillus endophyticus* VFS2 : To\*VFS2 et
- Tourbe (To)/ *Microbacterium* sp. GS17: To\*GS17.

Chaque traitement a été répété quinze (15) fois compte tenu des cinq (5) dates de stockage des inocula et des trois (3) répétitions par date.

Après l'inoculation des supports (sachets fermés avec de petits trous d'aération), les biofertilisants ont été stockés à la température ambiante (environ 28 °C) (Figure 1). La capacité de survie des souches dans le support a été périodiquement suivie. Le nombre de cellules viables dans chaque support a été déterminé à intervalle de temps bien défini : 0, 7, 30, 90 et 180 jours de stockage de l'inoculum à la température ambiante. Pour

cela, 1 g du support a été prélevé et mélangé avec 9 ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai (solution mère). Ensuite une dilution en série au 10<sup>ème</sup> a été fait de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> jusqu'à 10<sup>-8</sup>. En fin, 100 µl des quatre dernières dilutions (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, et 10<sup>-8</sup>) ont été étalés (avec la pipette pasteur) dans des boîtes de Petri contenant le milieu TSA et incubées à l'étuve 28 °C. Le comptage des colonies formées a été fait après 48 h d'incubation.

**Analyses statistiques :** Les données ont été analysées avec les logiciels R version 4.1.3 et XLSTAT version 2016. L'analyse de variance à trois facteurs (test de Fisher) nous a permis de comparer les différentes moyennes calculées du nombre de bactéries viables dans les supports aux différentes dates selon les traitements. L'analyse des composantes principales nous a permis de voir les dispersions des inocula en fonction de l'évolution des teneurs en éléments chimiques.

## RÉSULTATS

**Caractéristiques physico-chimiques des différents supports :** Les caractéristiques physico-chimiques des différents supports sont répertoriées dans le tableau 1. La tourbe (To) contient des teneurs en C total et en Ca supérieures à celle de la coque d'arachide (CdA) et de la balle de riz (BdR). De plus, elle a la capacité de rétention en eau la plus élevée (62,5 %) contre 57,5 % et 52,5 % pour la BdR et la CdA respectivement. Cependant, la coque d'arachide a montré des teneurs en N, P et K

supérieure aux deux autres supports. La balle de riz est quant à elle riche en Na avec un rapport C/N très élevé. Elle présente un pourcentage très élevé de matière sèche par rapport aux autres supports (BdR : 90 %, CdA : 65,33 % et To : 33,16 %). Les différents supports ont des compositions en cations majeurs plus ou moins similaires avec quelques différences d'un support à un autre (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Caractéristiques physico-chimiques des supports

Supp orts	N.Tot al .kg <sup>-1</sup>	C. Total g.kg <sup>-1</sup>	C/N	P. Total g.kg <sup>-1</sup>	Ca mmol.l <sup>-1</sup>	Na mm ol.l <sup>-1</sup>	K Mm ol.l <sup>-1</sup>	H Mm ol.l <sup>-1</sup>	CR Mmo l.l <sup>-1</sup>	MS %	pH initi al	pH Rect ifié
To	12,4	430,2	40,4	0,3	0,36	0,03	0,02	5	62,5	33,16	3,05	6,96
CdA	20,5	355,3	20,3	1,7	0,22	0,02	1,07	5,01	52,5	65,33	5,71	6,92
BdR	03,2	349,4	125,8	0,5	0,2	0,03	0,22	5	57,5	90	6,86	6,86

N: Azote total, C: Carbone total, C/N : rapport Carbone/Azote, P: Phosphore Total, Ca: Calcium, Na: Sodium, K: Potassium, Hr : Humidité résiduelle, CR : Capacité Rétention en eau, MS : Matière sèche, To : Tourbe, CdA : Coque d'Arachide et BdR : Balle de Riz.

**Contrôle de la qualité des inocula**  
**Conservation et survie des souches de BSP dans les supports :** La capacité de croissance et de survie des trois souches *Staphylococcus* sp. SN1, *Bacillus endophyticus* VFS2 et *Microbacterium* sp. GS17, dans les trois supports (balle de riz, coque d'arachide et tourbe) a été évaluée dans le temps pendant 180 jours (6 mois). L'évaluation du nombre de

cellules viables a été faite pendant la période de stockage de 180 jours dans des conditions de stockage (température ambiante). Les analyses statistiques ont montré la présence d'une interaction entre les trois facteurs (souches-supports-temps) et que c'est le facteur temps qui était le plus influent (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Analyse des sommes de carrés de Type III (Nombre Cellules)

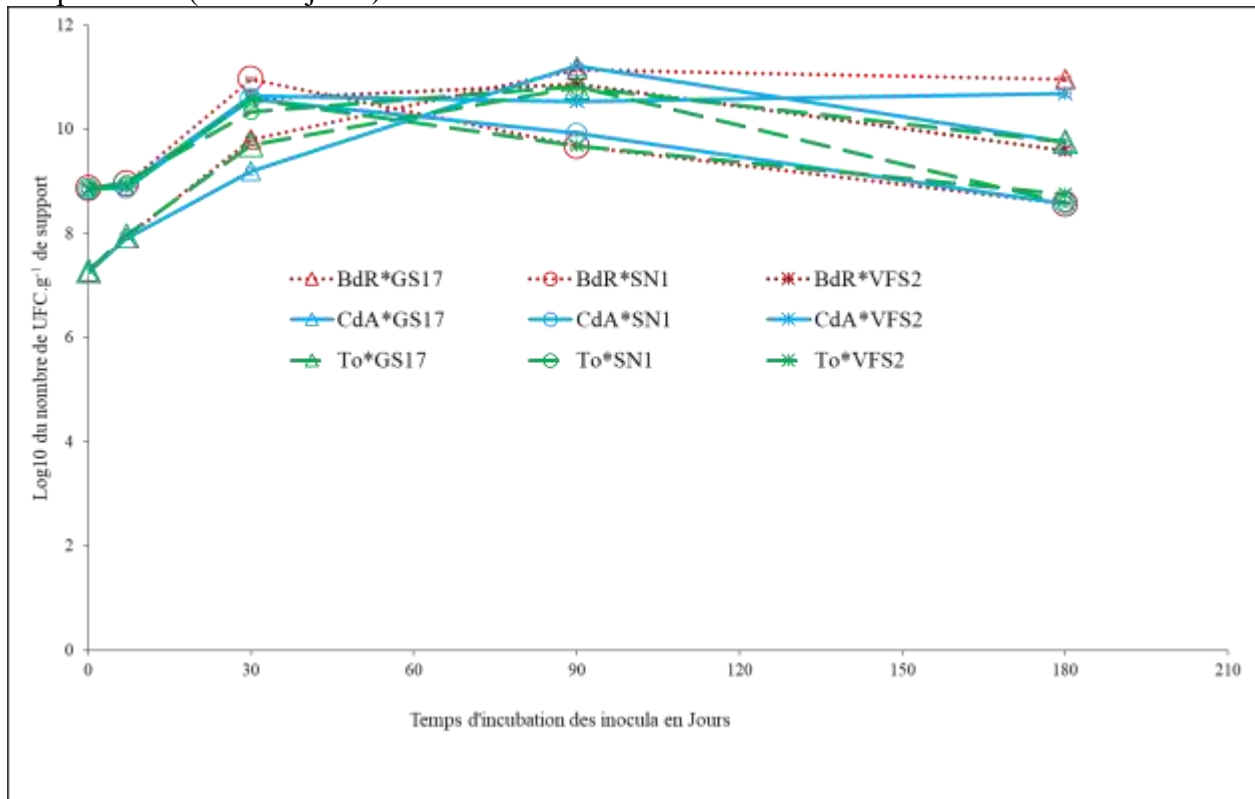
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Supports	2	6,07.10 <sup>21</sup>	3,04.10 <sup>21</sup>	29,02	<b>1,88.10<sup>-10</sup></b>
Souches	2	6,82.10 <sup>21</sup>	3,41.10 <sup>21</sup>	32,58	<b>2,27.10<sup>-11</sup></b>
Temps	4	72,3.10 <sup>21</sup>	18,1.10 <sup>21</sup>	172,68	<b>2,45.10<sup>-41</sup></b>
Supports*Souches	4	54,3.10 <sup>21</sup>	1,36.10 <sup>21</sup>	12,98	<b>2,19.10<sup>-8</sup></b>
Supports*Temps	8	4,86.10 <sup>21</sup>	6,08.10 <sup>21</sup>	5,81	<b>5,72.10<sup>-6</sup></b>
Souches*Temps	8	59,3.10 <sup>21</sup>	7,41.10 <sup>21</sup>	70,81	<b>1,64.10<sup>-35</sup></b>
Supports*Souches*Temps	16	41,7.10 <sup>21</sup>	2,60.10 <sup>21</sup>	24,87	<b>3,05.10<sup>-26</sup></b>

Le nombre de cellules de chaque souche (*Staphylococcus* sp.SN1, *Bacillus endophyticus* VFS2 et *Microbacterium* sp.GS17) a été évalué dans chaque support (balle de riz, coque d'arachide et tourbe) pendant 180 jours (en cinq (5) dates de conservation). Les supports testés ont pu conserver les différentes souches jusqu'à 180 jours à la température ambiante. Cependant, l'évolution du nombre de cellules dans les supports varie en fonction du support, de la souche mais aussi en fonction du temps (Figure 2 – Tableau 3). -Durant les 7 premiers jours qui ont suivi l'inoculation des supports (préparation des inocula), l'évolution du nombre des cellules des différentes souches dans les supports est modérée avec de petites différences en fonction de la souche et du support utilisé. Cette période correspond souvent à ce qu'on appelle la phase d'incubation des souches dans les supports. - Durant les 30 premiers jours qui ont suivi l'inoculation bactérienne des supports, la croissance a été rapide et très hétérogène. Une augmentation rapide du nombre de cellules des trois souches dans les inocula a été enregistrée après 30 jours de stockage à la température

ambiante. Elle est passée de 10<sup>8</sup> à 10<sup>10</sup> bactéries par gramme de support pour les inocula préparés avec les souches SN1 et VFS2 et de 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> bactéries par gramme de support pour ceux préparés avec la souche GS17. - L'évolution du nombre de cellules du 30<sup>ème</sup> au 90<sup>ème</sup> jour a été très différente en fonction de la souche mais aussi en fonction du support utilisé. Les inocula CdA\*GS17 et BdR\*GS17 (avec respectivement 1,64.10<sup>11</sup> et 1,41.10<sup>11</sup> bactéries par gramme de support) ont enregistré une nette augmentation du nombre de cellules entre le 30<sup>ème</sup> et le 90<sup>ème</sup> jour de stockage. Le reste des inocula a par contre subi soit une légère augmentation soit une chute modérée du nombre de cellules entre le 30<sup>ème</sup> et le 90<sup>ème</sup> jour. Les inocula BdR\*VFS2, To\*GS17 et To\*SN1 ont subi une légère augmentation du nombre de cellules (du 30<sup>ème</sup> au 90<sup>ème</sup> jour) par contre les inocula BdR\*SN1, CdA\*SN1, CdA\*VFS2 et To\*VFS2 ont vu leur nombre de cellules par gramme de support chuter modérément. Les résultats ont aussi montré que le nombre de cellules par gramme de support de tous les inocula préparés avec la souche *Microbacterium* sp. GS17 a augmenté quel que soit le support entre le 30<sup>ème</sup> et le 90<sup>ème</sup> jour. -A

la fin de l'expérience (180<sup>ème</sup> de stockage à la température ambiante), les résultats ont montré une variation très hétérogène du nombre de cellules enregistrés dans les différents supports. Une chute significative de cellules dans la quasi-totalité des inocula (sauf l'inoculum CdA\*VFS2 qui a légèrement augmenté) a été enregistrée entre le 90<sup>ème</sup> jour et le 180<sup>ème</sup> jour de stockage. De manière générale, une forte variabilité du nombre de cellules a été enregistrée dans les différents inocula à différentes dates de stockage. Bien qu'une chute du nombre de cellules ait été généralement observée, les différents supports ont su bien conserver les souches pendant toute la période de l'expérience (180 jours) à la température ambiante avec des concentrations comprises entre 10<sup>7</sup> et 10<sup>10</sup> bactéries par gramme de support. La comparaison du nombre de cellules entre T=0 jour et la fin de l'expérience (T=180 jours) a montré une

conservation constante ou positive dans les différents inocula. Les résultats ont montré que les différents supports ont su maintenir voire augmenter le nombre de cellules entre 0 jour et 180 jours de stockage. Bien qu'on ait utilisé les concentrations les plus basses de la souche GS17 comparées aux autres souches (SN1 et VFS2) pour l'inoculation à T=0 jour, elle a enregistré le plus grand nombre de cellules bactériennes dans la BdR et la CdA après 90 jours de stockage (10<sup>11</sup> bactéries par gramme de support). Après 180 jours de stockage, c'est dans le support BdR qu'on a trouvé les densités cellulaires les plus élevées (10<sup>10</sup> bactéries par gramme de support). De façon générale, le nombre de cellules des trois souches dans les différents supports est supérieur à 10<sup>7</sup> bactéries par gramme de support pour l'ensemble des inocula préparés après 180 jours de stockage à la température ambiante.



**Figure 2 : Viabilité** des souches BSP (*Staphylococcus* sp.SN1, *Bacillus endophyticus* VFS2 et *Microbacterium* sp.GS17) dans les supports (balle de riz (BdR), coque d'arachide (CdA) et tourbe (To)). Chaque point correspond à une moyenne de trois valeurs et les moyennes avec des mêmes lettres sur les points alignés d'une date précise ne sont pas significativement différentes à  $P = 0,05$  selon le test de Fisher. Les écarts-types sont représentés par les petites barres horizontales



**Tableau 3 :** Viabilité des souches BSP (Staphylococcus sp.SN1, Bacillus endophyticus VFS2 et Microbacterium sp.GS17) dans les supports (balle de riz, coque d'arachide et Tourbe).

Temps(Souche) (CFU)	Balle de riz			Coque d'arachide			Tourbe		
	GS17	SN1	VFS2	GS17	SN1	VFS2	GS17	SN1	VFS2
<b>0</b>	<b>7,28<sup>i</sup></b> (±0,03)	<b>8,88<sup>i</sup></b> (±0,08)	<b>8,87<sup>i</sup></b> (±0,04)	<b>7,26<sup>i</sup></b> (±0,02)	<b>8,86<sup>i</sup></b> (±0,12)	<b>8,83<sup>i</sup></b> (±0,06)	<b>7,29<sup>i</sup></b> (±0,02)	<b>8,87<sup>i</sup></b> (±0,07)	<b>8,85<sup>i</sup></b> (±0,13)
<b>7</b>	7,92 <sup>i</sup> (±0,03)	8,96 <sup>i</sup> (±0,04)	8,91 <sup>i</sup> (±0,07)	7,91 <sup>i</sup> (±0,03)	8,87 <sup>i</sup> (±0,03)	8,92 <sup>i</sup> (±0,05)	7,96 <sup>i</sup> (±0,03)	8,98 <sup>i</sup> (±0,03)	8,92 <sup>i</sup> (±0,02)
<b>30</b>	9,81 <sup>hi</sup> (±0,04)	10,97 <sup>c</sup> (±0,04)	10,58 <sup>fg</sup> (±0,04)	9,21 <sup>i</sup> (±0,08)	10,58 <sup>fg</sup> (±0,05)	10,65 <sup>f</sup> (±0,06)	9,71 <sup>i</sup> (±0,02)	10,34 <sup>gh</sup> (±0,02)	10,58 <sup>fg</sup> (±0,04)
<b>90</b>	11,15 <sup>b</sup> (±0,02)	9,68 <sup>i</sup> (±0,03)	10,87 <sup>d</sup> (±0,05)	11,21 <sup>a</sup> (±0,02)	9,92 <sup>hi</sup> (±0,05)	10,54 <sup>fg</sup> (±0,08)	10,81 <sup>de</sup> (±0,07)	10,82 <sup>d</sup> (±0,03)	9,69 <sup>i</sup> (±0,06)
<b>180</b>	<b>10,96<sup>c</sup></b> (±0,05)	<b>8,57<sup>i</sup></b> (±0,05)	<b>9,59<sup>hi</sup></b> (±0,08)	<b>9,77<sup>hi</sup></b> (±0,05)	<b>8,58<sup>i</sup></b> (±0,03)	<b>10,69<sup>ef</sup></b> (±0,08)	<b>9,77<sup>hi</sup></b> (±0,05)	<b>8,58<sup>i</sup></b> (±0,03)	<b>8,76<sup>i</sup></b> (±0,05)

Chaque point correspond à une moyenne de trois valeurs et les moyennes avec des mêmes lettres sur les points alignés d'une date précise ne sont pas significativement différentes à P = 0,05 selon le test de Fisher. Les écarts-types sont représentés par des moyennes dans les parenthèses. Données sont transformées en log10.

### Evolution de la composition chimique des inocula (avec *Microbacterium* sp. GS17) :

Compte tenu des résultats obtenus avec la souche *Microbacterium* sp. GS17, l'évolution des éléments chimiques dans les supports a été suivie dans les biofertilisants préparés avec cette souche uniquement. Les analyses ont ainsi montré que les teneurs en éléments chimiques des différents biofertilisants préparés avec la souche *Microbacterium* sp. GS17 étaient variables en fonction des supports mais aussi en fonction du temps de conservation (Tableau 4). Les résultats ont montré une augmentation des teneurs en N, P

et K dans tous les inocula (GS17/BdR, GS17/CdA et GS17/To) jusqu'à 90<sup>ème</sup> jour de conservation. Après cette période, les teneurs en K et P ont commencé à diminuer dans les différents inocula sauf pour le N. Les teneurs de ces éléments chimiques sont donc plus faibles dans les inocula de 180 jours que dans les inocula de 30 et 90 jours de stockage à la température ambiante. Cependant, concernant les teneurs en MS et en C, les résultats ont montré une diminution au fil du temps dans l'ensemble des inocula jusqu'à la fin de la conservation (180 jours).

**Tableau 4 :** Evolution des éléments chimiques dans les inocula préparés avec la souche *Microbacterium* sp. GS17 au fil du temps.

Supports	Eléments chimiques	Temps d'incubation (Jours)			
		0	30	90	180
Balle de riz	K (meq/100g)	0,22	0,25	0,24	0,21
	P (g.kg <sup>-1</sup> )	0,5	1,2	1,5	1,3
	N total (g.kg <sup>-1</sup> )	3	3,3	3,7	3,8
	C total (g.kg <sup>-1</sup> )	549	517	442	403
	MS (%)	90	89	76	69,30
Coque d'arachide	K (meq/100g)	1,07	2,34	2,30	2,33
	P (g.kg <sup>-1</sup> )	1,7	2,7	2,2	2,4
	N total (g.kg <sup>-1</sup> )	21	8,6	6,4	7,6
	C total (g.kg <sup>-1</sup> )	355	348	267	246
	MS (%)	65,33	63,25	46	42,30
Tourbe	K (meq/100g)	0,02	0,24	0,22	0,24
	P (g.kg <sup>-1</sup> )	0,3	0,5	0,5	0,5
	N total (g.kg <sup>-1</sup> )	12	9,8	6,3	6,8

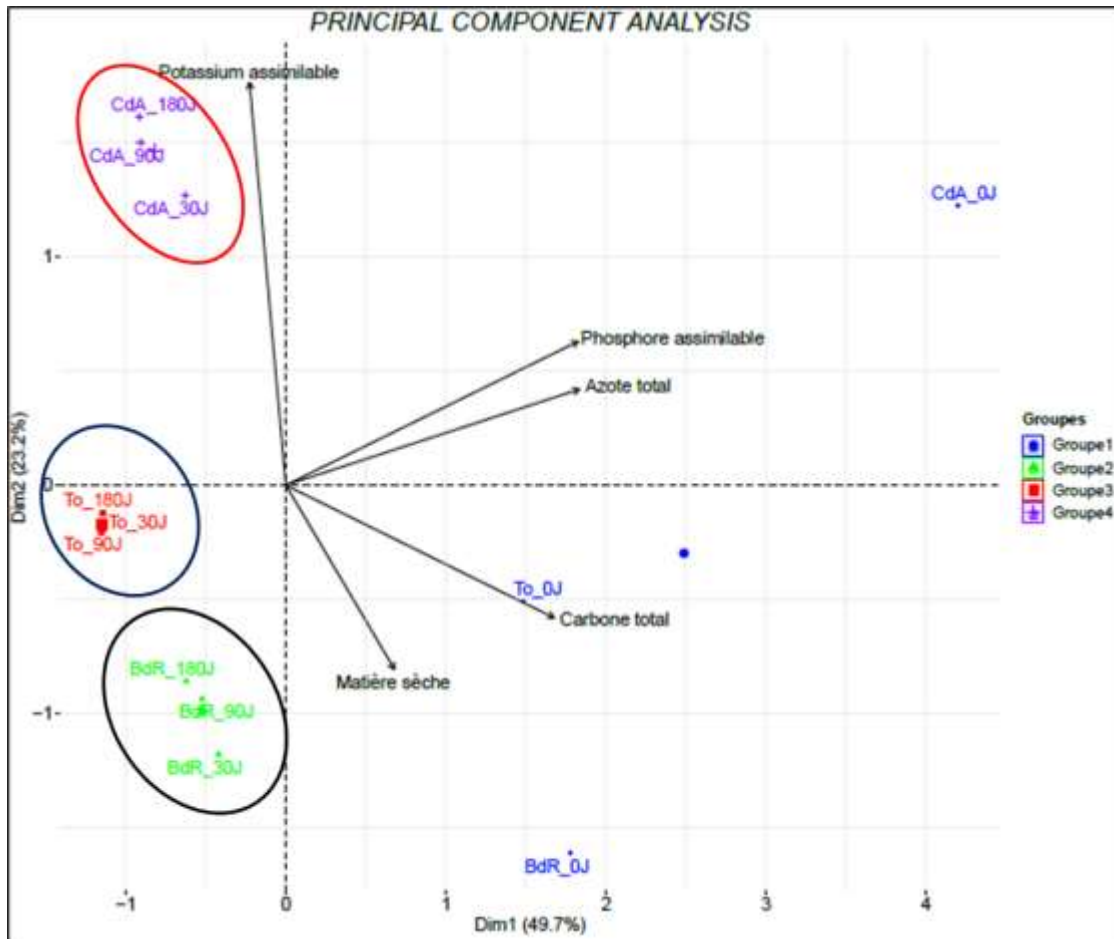
C total (g.kg <sup>-1</sup> )	430	178	176	158
MS (%)	33,16	30,60	30,20	27,20

N: azote total, C: carbone total, P: phosphore Total, K: potassium et MO: matière organique, MS : matière sèche.

**Classification des inocula préparés avec la souche *Microbacterium sp. GS17* en fonction de la composition chimique :**

L'analyse en composantes principales a permis de classer les inocula de la souches *Microbacterium sp. GS17* en quatres (4) groupes. Un groupe composé des inocula fraîchement préparés non stockés (sans distinction de support) ; un groupe composé d'inocula qui ont comme support Coque d'arachide, un groupe composé des inocula avec comme support la Tourbe et un dernier

groupe composé des inocula avec comme support la Balle de riz. Les trois groupes restants sont discriminés en fonction du support (groupe BdR, groupe To et le groupe CdA) (figure 2). Les resultats ont montré que l'évolution des teneurs en éléments chimiques dependent du support utilisé avec des meilleurs teneurs en K dans les inocula préparés avec la coque d'arachide. Les inocula préparés avec la balle de riz ont une meilleure teneur en matière sèche et en carbone.



**Figure 3.** ACP des données chimiques des différents inocula préparés avec la souche *Microbacterium sp. GS17* au fil du temps. To\_0J : Inoculum Tourbe\_Souche GS17 non stocké, To\_30J : Inoculum Tourbe\_Souche GS17 de 30 jours de stockage; To\_90J : Inoculum Tourbe\_Souche GS17 de 90 jours de stockage, To\_180J : Inoculum Tourbe\_Souche GS17 de 180 jours de stockage, CdA\_0J : inoculum Coque d'Arachide\_souche GS17 non stocké ;

CdA\_30J : inoculum Coque d'Arachide\_souche GS17 de 30 Jours de stockage CdA\_90J : inoculum Coque d'Arachide\_souche GS17 de 90 Jours de stockage CdA\_180J : inoculum Coque d'Arachide\_souche GS17 de 180 Jours de stockage, BdR\_0J : inoculum Balle de Riz\_Souche GS17 non stocké, BdR\_30J : inoculum Balle de Riz\_Souche GS17 de 30 Jours de stockage, BdR\_90J : inoculum Balle de Riz\_Souche GS17 de 90 Jours de stockage et BdR\_180J : inoculum Balle de Riz\_Souche GS17 de 180 Jours de stockage

## DISCUSSION

L'une des problématiques majeures liée à l'utilisation des biofertilisants par les populations est son efficacité sur les cultures comparées aux fertilisants chimiques. Un bon biofertilisant devrait répondre aux critères d'efficacité, de disponibilité des substrats (localement), de viabilité (dans les conditions basiques de stockage). Plusieurs ajustements sont nécessaires pour avoir une bonne formulation de biofertilisant. Les résultats de notre étude ont montré une bonne conservation des souches de microorganismes dans les trois supports après 180 jours de stockage à la température ambiante. Le dénombrement des cellules vivantes dans les différents supports a montré des quantités comprises entre  $10^8$  et  $10^{11}$  bactéries/gramme de support, semblables à celles trouvées par d'autres études. Robles-Martinez *et al.* (1999) ont observé des résultats similaires après 6 mois de conservation sur les supports suivants : tourbe espagnole, boues Fermex et mélange de coquille de cabosse et tourbe mexicaine. Albareda *et al.* (2008) ont aussi trouvé des résultats similaires ( $10^8$  -  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>) après un stockage à 25 °C. Pour la souche la mieux conservée dans les trois supports (*Microbacterium* sp. GS17), une augmentation constante du nombre de cellules a été notée jusqu'à 30<sup>ème</sup> voire 90<sup>ème</sup> jour. Cette augmentation est plus marquée au niveau du support BdR jusqu'à  $10^{11}$  bactéries par gramme de support. Cela peut être justifié par les teneurs importants en matière sèche, en C au niveau du support BdR par rapport aux autres supports utilisés. La forte utilisation de la tourbe comme support d'inoculum est surtout motivée par sa grande richesse en matière sèche mais aussi par sa grande capacité de rétention en eau (Iswaran *et al.*, 1969). Ces éléments (matière sèche et C) sont également plus importants dans la BdR comparativement

à la To et à la CdA. La bonne viabilité des souches dans ce support (comparé aux autres) est probablement liée au C. La balle de riz est le seul support à avoir un pH naturellement neutre. Les supports CdA et To ont été neutralisés avec du CaCO<sub>3</sub>. Même s'ils ont pu être neutralisés, l'idéal aurait été d'avoir un support qui ne nécessite pas une neutralisation (support naturellement neutre). La meilleure conservation et survie dans le support BdR pourrait être dû aussi en partie à ce paramètre (pH) qui, d'après (Bashan, 1998) est très important pour la survie des souches. Notre étude a montré aussi une légère diminution du nombre de cellules dans les supports à 180 jours (sauf pour la souche *Microbacterium* sp. GS17 dans la balle de riz). Cette diminution a été notée à partir du 30<sup>ème</sup> jour pour certains inocula et 90<sup>ème</sup> jour pour d'autres. D'après Bashan et de-Bashan, (2015) quelques temps après inoculation dans le sol, sur les graines ou dans la rhizosphère, la population de bactéries diminue considérablement. Elle entre en compétition avec la population bactérienne endogène pour les nutriments. Pour Herridge *et al.* (2002), 95 % des rhizobia sont morts entre l'inoculation et le semis et, parmi ceux qui survivent, 83 % sont morts après 23 heures dans le sol. Les études de Bashan, (1999) ont aussi révélé que les souches disparaissent 15 jours après leur inoculation dans un sol sans plante. Le nombre de cellules recommandé dans un support varie considérablement en fonction des pays (Herrmann et Lesueur, 2013). Cependant, Herridge *et al.* (2002) ont démontré qu'en deçà d'un certain nombre de cellule ( $10^3$ ), il n'y avait pas de différence entre plantes inoculées et non inoculées sur le rendement. Singleton et Rice (2000) ont indiqué que pour les rhizobia, les normes minimales devraient être comprises entre  $10^7$  et  $10^9$  bactéries

par gramme de support. Dans notre étude, les résultats ont montré des concentrations comprises entre  $10^8$  et  $10^{10}$  bactéries par gramme de support après 180 jours de stockage. Les concentrations de cellules trouvées dans notre étude sont donc en accord avec les normes minimales requises pour un bon inoculum. Le temps de conservation est l'un des facteurs les plus importants dans l'évaluation de la qualité d'un bon inoculum (Herridge *et al.*, 2002 ; Bashan, 2016). Ce temps peut impacter négativement sur la concentration des cellules dans les inocula et altère à cet effet la qualité de l'inoculum. Après 6 mois de conservation à la température ambiante, les analyses ont montré des densités de  $10^8$  à  $10^{10}$  bactéries par gramme de support. Les densités trouvées sont supérieures ou égales aux normes minimales requises par Singleton et Rice (2000.) après 6 mois de conservation. Les différents supports utilisés ont pu conserver les différentes souches à la température ambiante pendant 6 mois. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de García-Fraile *et al.* (2015) qui montrent que la durée normale de conservation dans un support solide est de 6 mois. Albareda *et al.* (2008) ont aussi trouvé des nombres très intéressants de cellules après plus de 6 mois de conservation à  $25^\circ\text{C}$  dans plusieurs supports (tourbe, compost de bagasse au raisin, liege compost, attapulgite, sepiolite, perlite et silice amorphe). La composition physico-chimique est aussi l'un des caractéristiques importantes pour le choix d'un support d'inoculum. Les supports doivent donc avoir des caractéristiques physico-chimiques stables : un pH adéquat, une bonne capacité de rétention en eau, une bonne teneur en éléments chimiques (N, P, K, Ca...) (Smith, 1992; Bashan *et al.*, 2012). Bien qu'aucun support ne puisse satisfaire à toutes les conditions requises, il faut optimiser les paramètres de qualité préalablement décrits. Dans cette étude, la détermination des paramètres

physico-chimiques des différents supports utilisés a montré de meilleurs résultats comparés à ceux de la tourbe (support déjà utilisé et accepté comme un bon support d'inoculum). D'après Bashan (1998), le support d'inoculum est la principale partie étroitement liée au poids et au volume d'un inoculum. Les analyses physico-chimiques préalablement faites sur les différents supports ont montré des résultats similaires avec ceux de Keyser *et al.* (1993) sur la tourbe (support standard). Les caractéristiques d'un bon support ont été listées par plusieurs auteurs (Bashan, 1998; Keyser *et al.*, 1993; Stephens et Rask, 2000) dont les plus importantes sont par ordre : une bonne capacité de rétention en eau, une bonne teneur en matière sèche, en C, un pH facilement ajustable, une facilité à être stérilisé par autoclavage ou irradiation gamma, une non toxicité et une bonne disponibilité. Les différents supports utilisés dans cette étude ont une capacité de rétention en eau comprise entre 52,50 et 62,50 %, un pH facilement ajustable (pour les supports acides), un pourcentage en matière sèche de 33,16 ; 65,33 et 90 % (respectivement To, CdA et BdR) et disponibles. Les résultats similaires sur les capacités de rétentions ont été trouvés par Somasegaran et Hoben (1994). De plus d'après Smith (1992), une relation étroite existe entre la richesse des supports en éléments minéraux et la survie des souches. De même Saranya *et al.* (2011) ont aussi noté une corrélation entre la richesse des supports en azote et la survie des bactéries. La BdR a un pH proche de la neutralité, cependant la CdA et la To ont eu un pH acide et ont été neutralisées avec de la chaux. Le pH est un paramètre important qui peut limiter la croissance des bactéries. Bien que ne disposant pas de toutes les qualités d'un bon support, la BdR et la CdA peuvent être cependant utilisées comme supports d'inoculum au même titre que la To.

## CONCLUSION ET APPLICATION DES RESULTATS

Les différents supports utilisés ont permis de conserver les souches dans le temps jusqu'à 180 jours à la température ambiante. Les différentes souches ont eu une conservation et une survie homogène dans la tourbe. Par contre dans la BdR et la CdA, la conservation a été très hétérogène dans le temps. La meilleure densité de cellules dans les inocula a été enregistrée dans la balle de riz à 90 jours de conservation avec la souche *Microbacterium* sp. GS17. De plus aussi, la meilleure conservation et la survie des souches après 180 jours de stockage à la température ambiante ont été notées dans la BdR avec la même souche (*Microbacterium* sp. GS17). Les supports (BdR

et CdA) peuvent ainsi être utilisés comme support d'inoculum avec ou en alternative à la tourbe. Cependant, une validation des résultats sur la mise au point de l'inoculum avec les trois supports organiques par une répétition de l'expérience (préparation et test sur des cultures) sur une période plus longue (3 ans au minimum) est recommandé. Nous pouvons suivre de façon bien précise l'évolution des caractères chimiques dans les différents inocula. Ce qui nous permettra de valider avec précision la capacité de conservation et de survie notée lors de la première expérience en confirmant aussi les densités trouvées.

## RÉFÉRENCES 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 Biol. Biochem.* 40, 2771–2779.
- Bashan, Y., 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16, 729–770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Bashan, Y., 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 246–256.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E., 2012. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils* 49, 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2015a. Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp., in: Handbook for *Azospirillum*. Springer, Cham, pp. 469–485. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_26)
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2015b. Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp., in: Handbook for *Azospirillum*. Springer, pp. 469–485.
- Bashan, N., 2016. Inoculant formulations are essential for successful inoculation with plant growth-promoting bacteria and business opportunities. *Indian Phytopathol.* 69, 739–743.
- Brockwell, J., Bottomley, P., 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27, 683–697.
- Deaker, R., Roughley, R.J., Kennedy, I.R., 2004. Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1275–1288.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R., 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Bioeng.* 2015 Vol 2 Pages 183-205. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.183>

- Gupta, A., 2017. Azospirillum: Bioformulations, Product Quality and Survivability. Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol., 467–470. <https://doi.org/10.22214/ijraset.2017.8064>
- Herridge, D., Gemell, G., Hartley, E., 2002. Legume inoculants and quality control. Aust. Cent. Int. Agric. Res. Proc. 109c 105–115.
- Herrmann, L., Lesueur, D., 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Iswaran, V., Rao, W.S., Magu, S.P., Jauhri, K.S., 1969. Indian peat as a carrier of *Rhizobium*. Curr. Sci. 38, 468–469.
- Keyser, H.H., Somasegaran, P., Bohlool, B.B., 1993. Rhizobial ecology and technology. Soil Microb. Ecol. Appl. Agric. Environ. Manag. 205–226.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, in: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. pp. 879–882. Angers, France
- Nadiéline, C. V., Ndiaye, M. F., Fall, S., Krasova, T., Le Quéré, A., & Diouf, D. (2019). Isolation and characterization of potential phosphate solubilizing bacteria in two regions of Senegal. African Journal of Microbiology Research, 13(28), 609–618. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2019.9179> (Annexe 4.1).
- Robles-Martinez, F., Pina-Guzman, A.B., Leyva-Ruelas, G., 1999. Valorisation de la coquille du cabosse (*Theobroma cacao* L.) et des boues agro-industrielles comme support dans la fabrication des inocula pour légumineuses. Déchets Sci. Tech. 15–18.
- Saranya, K., Santhana, P., Kumutha, K., French, J., 2011. Potential for biochar as an alternate carrier to lignite for the preparation of biofertilizers in India. Int. J. Agric. Environ. Biotechnol. 4, 167–172.
- Schulz, T.J., Thelen, K.D., 2008. Soybean seed inoculant and fungicidal seed treatment effects on soybean. Crop Sci. 48, 1975–1983.
- Smith, R.S., 1992. Legume inoculant formulation and application. Can. J. Microbiol. 38, 485–492. <https://doi.org/10.1139/m92-080>
- Somasegaran, P., 1985. Inoculant production with diluted liquid Cultures of *Rhizobium* spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, *Rhizobium* spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. Appl. Environ. Microbiol. 50, 398–405.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. Counting *Rhizobia* by a plant infection method, in: Handbook for *Rhizobia*. Springer, New York, NY, pp. 58–64. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8_6)
- Stephens, J.H.G., Rask, H.M., 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Res. 65, 249–258.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Warren, G.P., Robinson, J.S., Someus, E., 2009. Dissolution of phosphorus from animal bone char in 12 soils. Nutr. Cycl. Agroecosystems 84, 167–178.
- Wey, J., 1974. Inoculation bactérienne des légumineuses au Sénégal. URL <http://agritrop.cirad.fr/340141/>.