

## Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique

ROCK CHABOT, HANI ANTOUN ET MICHEL P. CESCAS

Département des sols, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Québec, QC G1K 7P4, Canada

CHABOT, R., ANTOUN, H., et CESCAS, M.P. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* **39** : 941-947.

Les microorganismes dissolvant le P représentent de 26 à 46% de la microflore totale des quatre sols du Québec étudiés. Parmi les microorganismes isolés, nous avons retenu 10 bactéries et 3 champignons ayant un pouvoir dissolvant élevé, tel qu'indiqué par la formation de halos importants sur des milieux de culture ne contenant que du P insoluble. Après 3 semaines de croissance en serre, aucun des 13 organismes testés n'a eu d'effet significatif ( $P < 0,05$ ) sur la croissance et le contenu en P du maïs. Au champ, après 60 jours de croissance, les isolats 22a et 22c d'*Enterobacter* sp. et l'isolat 24 de *Pseudomonas* sp. ont causé des augmentations significatives (7-9%) de l'élongation des plants de maïs. Une augmentation significative de la matière fraîche foliaire (23%) a été observée avec l'isolat 22c uniquement, après 108 jours de croissance. Chez la laitue romaine cultivée au champ, la masse de la matière fraîche a significativement augmenté de 14 et 18% lorsque les graines étaient inoculées avec les isolats bactériens 22a et 24, respectivement, et de 11% avec l'isolat 68 de *Rhizopus* sp. L'inoculation avec les organismes dissolvant le P semble influencer la nutrition minérale du maïs et de la laitue. Cependant, la stimulation de la croissance végétale observée n'est vraisemblablement pas le résultat unique de l'augmentation de la disponibilité du P dans le sol. En effet, les quatre organismes utilisés au champ produisent des sidérophores et des auxines. Ces phénomènes peuvent expliquer en partie les stimulations observées.

**Mots clés :** solubilisation microbienne, phosphore, maïs, laitue.

CHABOT, R., ANTOUN, H., and CESCAS, M.P. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* **39**: 941-947.

Phosphorus solubilizing microorganisms constituted 26 to 46% of the microbial population of the four Quebec soils studied. Among the microorganisms isolated 10 bacteria and 3 fungi were selected for their ability to form a large clarification zone on solid media containing different insoluble P salts. In a glasshouse assay, the inoculation of maize seeds with the 13 organisms selected did not significantly influence maize growth or P content, after 3 weeks of growth. In field trials, the *Enterobacter* sp. isolates 22a and 22c and the *Pseudomonas* sp. isolate 24 significantly increased (7-9%) plant height after 60 days of growth. After 108 days of growth, only isolate 22c caused a significant increase (23%) of shoots fresh mass. Field trials with Paris Island Cos lettuce seeds inoculated with the bacterial isolates 22a and 24 resulted in 14 and 18% increase in shoots fresh mass yields, respectively. Isolate 68 of *Rhizopus* sp. also increased lettuce yield by 11% over the control. The growth improvement observed in maize and lettuce probably did not result only from P solubilization activity but also, in part, from the ability of the four organisms inoculated to produce siderophores and auxins.

**Key words:** microbial solubilization, phosphorus, corn, lettuce.

### Introduction

Le P est un élément nutritif majeur pour les plantes, mais sa disponibilité dans les sols est généralement faible (Arora et Gaur 1978). C'est pour cette raison que l'ajout d'engrais phosphatés est devenu une pratique courante en agriculture moderne. Cependant, il est bien connu qu'une forte proportion des phosphates solubles ajoutés aux sols sont insolubilisés par le fer et l'aluminium en sols acides, et par le calcium en sols calcaires (Chang et Chu 1961; Gachon 1973). On estime que, dans certains cas, cette précipitation minérale peut priver les plantes de plus de 75% du P soluble ajouté (Goldstein 1986).

Certaines bactéries du sol sont capables d'assimiler le phosphore à partir de minéraux très peu solubles de phosphates naturels (Tardieux-Roche 1966a) et d'immobiliser ainsi une partie sous forme de phosphates condensés (Tardieux-Roche 1966b). Ces cellules microbiennes peuvent ainsi transférer le phosphore du minerai à la plante (Tardieux-Roche et Tardieux 1970). Les microorganismes telluriques pouvant solubiliser les formes organiques et minérales des phosphates du sol (ex., Arora et Gaur 1978; Berthelin et al. 1991; Domey et Lippmann 1989; Goldstein 1986; Kucey et al. 1989; Salih et al. 1989) ont été utilisés

comme inoculants dans le but d'améliorer la nutrition phosphatée des plantes et de minimiser les coûts élevés de la fertilisation, liés à la fabrication des engrais phosphatés (Kucey et al. 1989). Plusieurs chercheurs ont déjà obtenu des augmentations significatives de rendement et d'assimilation du P par l'inoculation à l'aide de microorganismes dissolvant le P. Par exemple, chez le blé cultivé en serre durant 37 jours, l'inoculation avec des bactéries qui solubilisent le P a augmenté de 8% le rendement de la partie aérienne et de 17 à 57% l'assimilation du P (Domey et Lippmann 1989). Au champ, l'inoculation du blé à l'aide du *Penicillium bilaji* a aussi augmenté de façon significative le rendement et l'absorption du P, en présence ou en l'absence de phosphate naturel (Kucey 1988). D'autres études en serre montrent aussi que certaines rhizobactéries dissolvant le P peuvent stimuler la croissance du maïs (Berthelin et al. 1991; Pietr et al. 1991). D'autre part, l'effet, sur la croissance de la laitue, de l'inoculation à l'aide de microorganismes qui solubilisent le P ne semble pas avoir été étudié auparavant (Kucey et al. 1989). Le but de ce travail était donc d'isoler et de sélectionner, à partir de sols du Québec, des microorganismes qui solubilisent efficacement le P, et de déterminer au champ l'effet de l'inocula-

TABLEAU 1. Quelques caractéristiques des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des microorganismes dissolvant le P

Échantillon n°	Endroit	Texture	pH	Matière organique (%)	Éléments assimilables (kg·ha <sup>-1</sup> )			
					P	K	Ca	Mg
1	Île d'Orléans	Loam limono-argileux	6,0	4,6	198	663	5 273	311
2	Île d'Orléans	Loam sableux	4,9	6,2	18	424	1 861	172
3	Saint-Hyacinthe	Argile limoneuse	8,1	2,6	205	1070	18 565	1053
4	Saint-Hyacinthe	Loam argileux	7,7	2,6	376	806	7 551	663

tion à l'aide de ces organismes sur la croissance du maïs (*Zea mays*) et de la laitue romaine (*Lactuca sativa* cv. Romana).

### Matériel et méthodes

#### Isolément des microorganismes qui solubilisent le P

Le tableau 1 décrit quelques propriétés des quatre sols utilisés pour l'isolement des microorganismes. Ces sols ont été prélevés dans la couche de labour (0-15 cm). Les échantillons de sol n° 1 et 2 ont été traités à l'état frais alors que les échantillons n° 3 et 4 ont été séchés à l'air et tamisés à 2 mm avant d'être utilisés. Les sols (1 g) ont été mis en suspension dans 9 mL d'une solution saline stérile (NaCl à 0,85%) et agités vigoureusement pendant 30 s sur un agitateur Vortex. Les microorganismes ont ensuite été isolés par dilution et étalement sur des milieux solides dont la base, décrite par Goldstein (1986), contient, par litre d'eau distillée : glucose, 10 g; NH<sub>4</sub>Cl, 5 g; NaCl, 1 g; MgSO<sub>4</sub>, 1 g; gélose, 20 g; pH ajusté à 7,2 avec du KOH 1 M. Comme seule source de P, nous avons ajouté, à la base, 4 g·L<sup>-1</sup> d'un des composés suivants : Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, milieu TCP; AlPO<sub>4</sub>, milieu AIP; ou FePO<sub>4</sub>, milieu FeP. Un milieu contenant du CaHPO<sub>4</sub> (DCP) comme seule source de P a aussi été préparé en précipitant 50 mL d'une solution de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 10% avec 100 mL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 10% dans 1 L de base.

Le dénombrement des microorganismes dissolvant le P a été effectué sur le milieu TCP. La microflore totale a été estimée sur le milieu TSA 0,1X (Tryptic soy broth de Difco : TSB, 3 g·L<sup>-1</sup> avec 2% de gélose) pour les bactéries et le milieu Rose Bengale de Martin (RBM, Martin 1950) pour les champignons. Les microorganismes retenus sont ceux qui forment un halo de dissolution bien distinct après 48 h sur le milieu DCP et qui présentent une très bonne croissance sur les autres milieux (TCP, AIP et FeP).

#### Préparation des inoculums

Les bactéries et les champignons ont été cultivés durant 3 jours dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu TSB 0,1X, sur un agitateur rotatif à 25°C. Les cellules bactériennes ont ensuite été lavées par centrifugation et resuspendues dans une solution saline stérile. Pour les champignons, une suspension homogène d'hyphes et de spores a été préparée en broyant les cultures à l'aide d'un mélangeur culinaire avant le lavage et la suspension dans la solution saline. Le nombre d'unités formant des colonies (ufc) présent dans l'inoculum a été déterminé par étalement et dénombrement sur le milieu TSA 0,1X.

#### Essai en serre avec le maïs

Suite à la première étape de ce travail, 10 bactéries et 3 champignons capables de dissoudre le P inorganique ont été retenus et utilisés dans un essai d'inoculation du maïs en serre. Le sol utilisé, du même type que le sol d'isolement n° 1, est issu d'un pâturage de l'île d'Orléans dont l'analyse indique un pH de 6,22, un contenu en matière organique de 4,83% et des niveaux respectifs de P et de K assimilables de 77 et 606 kg·ha<sup>-1</sup>. Les graines de l'hybride Funk's 4066 de maïs ont été désinfectées en surface par un lavage de 2 min dans l'éthanol à 70%, suivi d'un trempage de 15 min dans l'hypochlorite de sodium à 6% et de plusieurs rinçages dans de l'eau distillée. Nous avons semé six graines dans chaque pot de

10 cm de diamètre contenant environ 400 g de sol sec. Tous les pots ont reçu une fertilisation équivalente à 180 kg·ha<sup>-1</sup> de N sous forme de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> et 50 kg·ha<sup>-1</sup> de K sous forme de KCl. L'inoculation des pots a été faite 24 h après le semis par l'addition de 5 mL d'inoculum par pot. Les témoins non inoculés ont reçus 5 mL de solution saline. Dix jours après le semis, quatre plantes d'apparence uniforme ont été sélectionnées par pot. Dans la serre, nous avons utilisé un dispositif expérimental en tiroir avec 14 traitements (10 bactéries, 3 champignons et 1 témoin non inoculé) avec 3 catégories de P (31 kg·ha<sup>-1</sup> de P sous forme d'engrais soluble Superphosphate; 31 kg·ha<sup>-1</sup> de P sous forme de phosphate naturel finement moulu Hyperphosphate Reno<sup>MD</sup>; aucun ajout de P) et 5 répétitions. Les pots ont été arrosés à l'eau du robinet selon les besoins journaliers. La croissance des plantes s'est effectuée sous 16 h de lumière à 25°C et 8 h d'obscurité à 20°C. La récolte des parties aériennes des plantes a été faite après 3 semaines de croissance. Les plants ont ensuite été séchés à 80°C pendant 48 h, pesés et broyés pour l'analyse du P.

#### Essai d'inoculation au champ

Suite à l'essai en serre, les isolats 22a, 22c et 24 de bactéries ainsi que l'isolat 68 du champignon ont donné les rendements en matière sèche ou bien les contenus en P total les plus élevés. Ces isolats ont été utilisés dans des essais d'inoculation au champ avec le maïs et la laitue romaine.

#### Maïs

Le dispositif expérimental au champ en blocs aléatoires et à échantillonnage à deux degrés (Snedecor et Cochran 1989) comprenait cinq traitements (trois bactéries, un champignon et un témoin non inoculé) et quatre répétitions. Le sol du champ utilisé pour les essais avec le maïs était du même type que le sol utilisé pour l'essai en serre. Il avait un pH de 5,47, un contenu en matière organique de 4,99% et des niveaux de P et de K échangeables respectifs de 222 et 347 kg·ha<sup>-1</sup>. Deux semaines avant le semis, nous avons ajouté l'équivalent de 6 t·ha<sup>-1</sup> de Ca(OH)<sub>2</sub> pour remonter le pH du sol au niveau optimal de 6,5 unités. Au semis, nous avons ajouté en bande l'équivalent de 150 kg·ha<sup>-1</sup> de N sous forme d'urée et 58 kg·ha<sup>-1</sup> de K sous forme de KCl. Les graines de l'hybride Funk's 4066 de maïs ont été désinfectées en surface, tel que décrit dans l'essai en serre, et enrobées d'une solution de 1% de méthyle cellulose contenant les cellules lavées de l'inoculum. Chaque parcelle de 3,0 m de largeur et 1,8 m de longueur contenait quatre rangs espacés de 75 cm. Sur chaque rang, deux graines de maïs ont été semées tous les 15 cm. Les deux rangs du centre ont reçu des graines enrobées de microorganismes alors que les deux rangs extérieurs ont été semés avec du maïs non inoculé. Le maïs a été semé le 16 mai 1992. Les plants de maïs ont été démarrés 18 jours après le semis pour garder sur chaque rang un plant tous les 15 cm. Après 60 jours de croissance, nous avons noté la hauteur de huit plants sélectionnés de façon aléatoire sur les deux rangs du centre de chaque parcelle. Le maïs a été récolté le 1<sup>er</sup> septembre 1992 (108 jours de croissance), au stade où les épis sont bien formés. Sur les deux rangs du centre, nous avons prélevé quatre plants par rang choisis de façon aléatoire. La masse en matière fraîche de chaque plant a été notée et, par la suite, les

huit plants de chaque parcelle ont été hachés et mélangés. Un échantillon représentatif a été prélevé et séché à 80°C durant 48 h pour la détermination du pourcentage d'humidité et pour l'analyse chimique des plantes.

#### Laitue romaine

Le type de sol ainsi que le protocole expérimental utilisés pour l'essai d'inoculation avec la laitue romaine étaient semblables à ceux utilisés avec le maïs au champ. Le sol du champ utilisé avait un pH de 5,76, un contenu en matière organique de 5,22% et des niveaux de P et de K échangeables respectifs de 195 et 437 kg·ha<sup>-1</sup>. Un mois avant la plantation, nous avons appliqué l'équivalent de 6 t·ha<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> pour remonter le pH au niveau optimal de 6,5 unités. À la plantation, nous avons fertilisé la laitue en bande avec l'équivalent de 80 kg·ha<sup>-1</sup> de N sous forme d'urée et 25 kg·ha<sup>-1</sup> de K sous forme de KCl. Les graines de laitue (Paris Island COS, Asgrow Seed Co., Ontario) sont fournies enrobées d'argile afin d'en faciliter la manipulation mécanique, ce qui a aussi permis, dans cette étude, une bonne imprégnation de l'inoculum. Les graines ont été inoculées par l'addition de 10 mL d'inoculum à environ 300 graines. Le semis a été effectué dans des plateaux à multicellules (200 cellules par plateau) pour le développement de transplants. Les plateaux ont été gardés en serre sous 16 h de lumière à 25°C et 8 h d'obscurité à 20°C pendant 3 semaines. Les plants ont été irrigués tous les jours avec une solution nutritive préparée à partir d'un engrais soluble complet (20 : 10 : 20) pour fournir des doses croissantes d'azote comme suit : 125 µg·mL<sup>-1</sup> la première semaine, 150 µg·mL<sup>-1</sup> la deuxième semaine et 190 µg·mL<sup>-1</sup> la troisième semaine. Une journée par semaine, les plants ont été irrigués à l'eau du robinet. Les plants de laitue ont été transplantés au champ le 23 juillet 1992, sur les quatre rangs (espacés de 75 cm) de chaque parcelle, à 20 cm d'intervalle. Les deux rangs du centre ont été plantés avec des laitues inoculées, alors que les deux rangs extérieurs ont reçu des plants non inoculés. Le 9 septembre 1992 (48 jours après la plantation), nous avons récolté de façon aléatoire, quatre plants de laitue sur chacun des deux rangs du centre de chaque parcelle. À ce stade, la masse fraîche moyenne des plants était de 750 g. Après avoir noté la masse fraîche pour chacun des plants, nous les avons hachés, mélangés et séchés, tel que décrit pour le maïs.

#### Analyses des sols et des plantes

Le pH des sols séchés à l'air et tamisés à 2 mm a été mesuré dans l'eau (1 : 1), et les éléments assimilables ont été extraits et dosés selon la méthode Mehlich 3 (Mehlich 1984). La matière organique des sols a été évaluée par la méthode modifiée de Walkley et Black (McKeague 1978). Les tissus végétaux ont été séchés, moulus et digérés avec 15 mL de HClO<sub>4</sub> et 5 mL de HNO<sub>3</sub>. Le P a été dosé par colorimétrie selon la méthode du vanado-molybdate (Tandon et al. 1968). Les éléments minéraux ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Gaines et Mitchell 1979).

#### Analyses statistiques

L'analyse de la variance a été effectuée par la procédure GLM (general linear models) du progiciel SAS (Statistical Analysis System Institute, Inc. 1985). Les moyennes ont été comparées à l'aide du test de la plus petite différence significative (LSD) pour l'essai en serre ou du LSD protégé de Fisher pour les expériences au champ.

#### Identification des microorganismes

Les isolats de bactéries choisis ont été identifiés par J.W. Kloepper (Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Auburn University, Alabama) selon la méthode de caractérisation des méthyl ester d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse. L'isolat 68 de champignon a été identifié par l'étude de la morphologie des colonies et par des observations faites au microscope photonique et au microscope électronique à balayage selon les critères d'identification décrits précédemment (Fassatiouva 1986; Inui et al. 1965; Malloch 1981). Pour la microscopie électronique à balayage, des prélèvements de fines tranches de gélose ont été effectués à la surface d'une boîte de pétri contenant le champignon

TABLEAU 2. Importance des microorganismes dissolvant le P (MDP) dans les échantillons de sol à l'étude

Échantillon n°	Microflore totale (ufc·g <sup>-1</sup> × 10 <sup>6</sup> )*	MDP (ufc·g <sup>-1</sup> × 10 <sup>6</sup> )	% du total
1	11,50	2,99	26,0
2	6,61	2,46	37,2
3	6,08	2,80	46,1
4	9,40	2,80	29,8

NOTA : La microflore totale est la somme des ufc comptées sur les milieux TSA 0,1 × (bactéries) et RBM (champignons). Les MDP ont été dénombrés sur le milieu TCP. Moyennes de trois répétitions pour lesquelles les valeurs du coefficient de variation étaient inférieures à 15%.

\*ufc·g<sup>-1</sup>, unités formant des colonies par gramme de sol sec.

cultivé de 3 à 4 jours à 25°C. Les morceaux de gélose ont été déposés sur des lamelles adaptées aux supports à échantillon du microscope et ils ont été fixés aux vapeurs d'OsO<sub>4</sub> pendant 24 h. La métallisation a été effectuée à l'aide d'un appareil de marque Nanotech à cible d'or et les observations ont été faites avec un microscope électronique à balayage Cambridge, modèle S-150.

#### Production de HCN, de sidérophores ou d'auxines

Nous avons déterminé, par des tests en boîte de pétri, la production de HCN (Bakker et Schippers 1987), de sidérophores (Alexander et Zuberer 1991) et d'auxines (Bric et al. 1991) chez les trois bactéries et le champignon sélectionnés.

### Résultats et discussion

#### Importance des microorganismes dissolvant le P dans les sols

Les quatre sols à l'étude avaient un nombre comparable de microorganismes dissolvant le P, qui variait de 2,4 à 2,9 × 10<sup>6</sup> ufc·g<sup>-1</sup> de sol sec (tableau 2). Cependant, comme la microflore totale (bactéries + champignons) du sol varie parfois sensiblement d'un sol à l'autre, l'importance des microorganismes qui solubilisent le P varie aussi. Ainsi, dans l'échantillon de sol n° 1, les microorganismes dissolvant le P représentaient 26% de la microflore totale retrouvée dans ce loam limono-argileux, alors que dans l'échantillon n° 3 d'argile limoneuse, 46% de la microflore totale solubilisait le P (tableau 2). Ces résultats confirment que le sol est une source importante de microorganismes capables de dissoudre le P (Kucey et al. 1989).

À partir des milieux d'isolement, 69 bactéries et 23 champignons ont été retenus dans un premier temps. Suite à plusieurs repiquages en vue d'éliminer les microorganismes qui perdent leur pouvoir de dissoudre le P (Kucey et al. 1989) et à des repiquages sur les milieux autres que celui d'origine, le nombre de microorganismes qui solubilisait le P a été réduit à 31 bactéries et 14 champignons. Parmi ces organismes, 10 bactéries et 3 champignons formant des halos importants sur tous les milieux testés ont été choisis pour l'essai en serre avec le maïs. Les isolats bactériens 22a, 22b, 22c et 24 et l'isolat 68 de champignon ont été les organismes solubilisant le plus de P en milieux solides.

#### Essai d'inoculation du maïs en serre

Après 3 semaines de croissance en serre, l'ajout de phosphate naturel ou de Superphosphate n'a pas eu d'effet significatif sur les rendements en matière sèche du maïs. Cependant, les plants fertilisés au Superphosphate avaient une concentration en P ainsi qu'un contenu total en P significativement plus élevés ( $P \geq 0,01$ ). L'inoculation du maïs à l'aide des 10 bactéries et des 3 champignons, choisis pour leur grande capacité à solubiliser le P, n'a pas eu d'effet

TABLEAU 3. Effets de l'inoculation à l'aide des isolats de bactéries et de champignons qui solubilisent le P sur l'absorption du P et la croissance du maïs cultivé en serre durant 3 semaines

Isolat	Taux d'inoculation (ufc·g <sup>-1</sup> )*	% par rapport au témoin non inoculé <sup>†</sup>		
		Matière sèche	[P]	P total
<b>Bactéries</b>				
22a	1,4 × 10 <sup>6</sup>	104	103	108c
22b	9,3 × 10 <sup>5</sup>	100	107	106
22c	1,1 × 10 <sup>6</sup>	105d	105	111a
24	6,0 × 10 <sup>5</sup>	106b	102	109a
56	4,3 × 10 <sup>5</sup>	97	105	102
58	6,3 × 10 <sup>5</sup>	102	102	104
63	3,8 × 10 <sup>3</sup>	99	104	104
74	1,8 × 10 <sup>5</sup>	98	104	100
90	3,8 × 10 <sup>4</sup>	97	97	94
92	1,1 × 10 <sup>4</sup>	98	101	99
<b>Champignons</b>				
31	1,3 × 10 <sup>2</sup>	103	100	101
44	1,3 × 10 <sup>2</sup>	102	102	104
68	1,3 × 10 <sup>3</sup>	104	101	104

NOTA : Les valeurs moyennes du témoin non inoculé (100%) sont pour la partie aérienne des plantes : matière sèche, 1,78 g par plant; [P], 2,61 mg·g<sup>-1</sup> de matière sèche; P total absorbé, 4,63 mg par plant.

\*ufc·g<sup>-1</sup>, unités formant des colonies par gramme de sol sec.

<sup>†</sup>a, b, c et d, valeurs significativement différentes de celles du témoin non inoculé aux niveaux de probabilité de 10, 11, 13 et 15%, respectivement.

significatif ( $P < 0,05$ ) sur le rendement en matière sèche, la concentration en P et le contenu total en P de la partie aérienne du maïs (tableau 3). Cependant, les isolats bactériens 22c et 24 semblaient avoir un certain potentiel pour stimuler le rendement en matière sèche du maïs. En effet, des augmentations de rendement de 5 et 6% par rapport au témoin non inoculé ont été observées avec les isolats 22c et 24, respectivement. La concentration en P dans les tissus végétaux n'a pas été significativement influencée par les traitements microbiens, mais le P total assimilé a augmenté de 8 à 11% chez le maïs inoculé avec les bactéries 22a, 22c et 24 (tableau 3). L'absence de stimulation de la croissance végétale du maïs, au cours de la présente étude, pourrait être attribuée en partie à la courte période de croissance (3 semaines) en serre et à un faible nombre de répétitions (5). En effet, en inoculant le maïs à l'aide d'isolats d'*Azospirillum lipoferum* et d'*Enterobacter cloacae*, Fages et Mullard (1988) ont obtenu, après 6 semaines de croissance avec 12 répétitions, un rendement en matière sèche foliaire de 16 à 24% plus élevé que celui du témoin. Dans un essai avec huit répétitions par traitement, Lalande et al. (1989) ont aussi obtenu des augmentations de rendement significatives après 8 semaines de croissance en serre, suite à l'inoculation du maïs avec des rhizobactéries bénéfiques (*Pseudomonas* sp. et *Serratia liquefaciens*). Dans le cas des champignons et de certains isolats bactériens, l'absence d'effet suite à l'inoculation du maïs peut aussi résulter du faible nombre d'ufc retrouvé dans l'inoculum (tableau 3).

#### Identification des microorganismes sélectionnés pour les études au champ

Suite au premier essai en serre, les isolats de bactéries 22a, 22c et 24 ainsi que l'isolat 68 de champignon ont été choisis pour les études au champ. L'identification des microorganismes a indiqué que les isolats 22a et 22c appartiennent au

genre *Enterobacter*, que l'isolat 24 est un *Pseudomonas* sp. et que l'isolat 68 de champignon est un *Rhizopus* sp. Les genres *Pseudomonas* et *Enterobacter* incluent des rhizobactéries bénéfiques à la croissance du maïs (Fages et Mulard 1988; Lalande et al. 1989) et de la laitue (Digat et al. 1990), et des bactéries qui solubilisent le P (Berthelin et al. 1991; Kucey et al. 1989). L'activité de solubilisation du P a aussi été observée chez le champignon *Rhizopus* sp. (Katznelson et al. 1962).

#### Effet des microorganismes sur la croissance du maïs au champ

Après 60 jours de croissance au champ, la présence des isolats 22a et 22c d'*Enterobacter* sp. et de l'isolat 24 de *Pseudomonas* sp. a significativement stimulé l'élongation du maïs. En effet, les plants de maïs inoculés à l'aide de bactéries étaient de 7 à 10% plus hauts que les plants du témoin non inoculé (tableau 4). L'isolat 68 de *Rhizopus* sp. n'a pas influencé l'élongation des plants. L'effet stimulateur des bactéries, observé après 60 jours, s'est traduit en stimulation du rendement de la matière fraîche foliaire après 108 jours de croissance uniquement en présence de l'isolat 22c d'*Enterobacter* sp. Comme l'analyse chimique des tissus végétaux n'a pas été effectuée sur chacun des huit plants récoltés par parcelle, mais plutôt sur un échantillon représentatif de ces plants, il n'a pas été possible d'effectuer une analyse statistique qui reflète avec exactitude le dispositif expérimental utilisé. On remarque que la présence des bactéries inoculées n'a pas d'effet sur la concentration en P retrouvée dans les tissus végétaux mais qu'elle tend à augmenter le contenu total des plants en P jusqu'à 20% par rapport au témoin non inoculé (tableau 4). Comme le sol utilisé pour la culture du maïs était riche en P assimilable (222 kg·ha<sup>-1</sup>), il est aussi probable que la stimulation de la croissance du maïs observée au cours de cette étude soit le résultat de la production d'auxines, tel que suggéré par Barea et al. (1976), de la production d'autres phytohormones (Berthelin et al. 1991) ou encore le résultat d'autres mécanismes favorables à la croissance de la plante. En effet, les trois bactéries et le champignon sélectionnés produisent des sidérophores sur le milieu solide chrome azuro S de Alexander et Zuberer (1991). De plus, les trois bactéries produisent des auxines sur le milieu Luria-Bertani additionné de tryptophane de Bric et al. (1991). Aucun isolat n'a produit de HCN. Pour bien estimer le rôle du pouvoir de solubilisation du P de ces microorganismes sur la croissance végétale, des essais devront être effectués sur un champ pauvre en P assimilable. On remarque aussi que l'inoculation à l'aide des isolats bactériens semble augmenter la concentration de la partie foliaire du maïs en K, Ca, Mg, Fe, Mn et Zn. Le champignon *Rhizopus* sp. par contre, semble diminuer les concentrations du maïs en K, Ca et Mg (fig. 1). Dans un essai au champ avec le blé, Kucey (1988) a observé que l'inoculation à l'aide du *Penicillium bilaji* double le contenu en Cu du blé cultivé au champ et augmente le contenu de cette plante en Fe et en Zn de 22 et 11%, respectivement, par rapport au témoin non inoculé. Au cours de cette étude, les traitements microbiens ont causé des augmentations respectives du contenu total du maïs en Fe et en Zn de 6 à 30% et de 17 à 61%. Le niveau de Cu dans les plantes était trop faible pour être détecté. De Freitas et Germida (1991) ont aussi montré que le blé inoculé à l'aide du *Pseudomonas cepacia* ou du *Pseudomonas putida* avait un contenu en Fe

TABLEAU 4. Effets de l'inoculation à l'aide de microorganismes dissolvant le P sur l'absorption du P et la croissance du maïs cultivé au champ

Isolat	Inoculation ufc par graine	Humidité (%)	% par rapport au témoin non inoculé*			
			60 <sup>e</sup> jour		108 <sup>e</sup> jour	
			Hauteur	Matière fraîche	[P]	P total
<b>Bactéries</b>						
22a	$8,0 \times 10^7$	84,1	107a	114	94	107
22c	$6,3 \times 10^7$	83,8	110a	123a	96	120
24	$9,3 \times 10^7$	83,7	109a	114	94	110
<b>Champignon</b>						
68	$2,2 \times 10^3$	84,1	94	100	100	98

NOTA : Les valeurs moyennes estimées du témoin non inoculé (100%) sont pour la partie aérienne des plantes : hauteur des plants à 60 jours, 1,37 m; masse de matière fraîche à 108 jours, 508,0 g par plant; [P] à 108 jours,  $2,54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière sèche; P total assimilé à 108 jours, 206,0 mg par plant. Le pourcentage d'humidité des parties aériennes des plants du témoins était de 84,1.

\*a, valeurs différentes de celles du témoin non inoculé au niveau de probabilité de 1%.

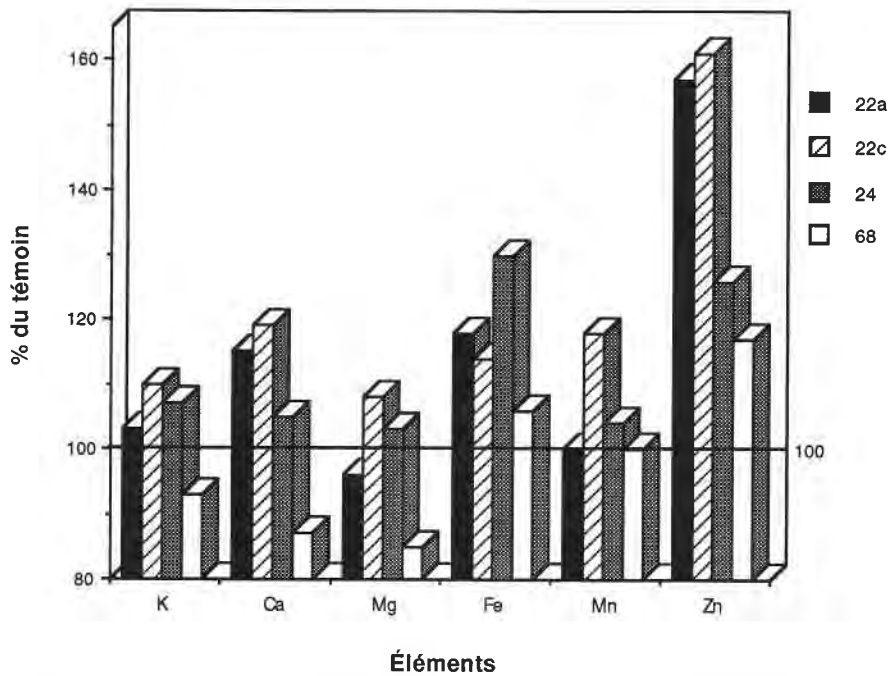


FIG. 1. Effet de l'inoculation du maïs cultivé au champ, avec les isolats 22a et 22c d'*Enterobacter* sp., 24 de *Pseudomonas* sp. et 68 de *Rhizopus* sp., sur l'assimilation totale du K, Ca, Mg, Fe, Mn et Zn. Les valeurs moyennes estimées, par plant, pour le témoin non inoculé (100%) sont : K, 1,73 g; Ca, 0,18 g; Mg, 0,13 g; Fe, 16,19 mg; Mn, 3,6 mg; Zn, 2,75 mg.

significativement plus élevé que les témoins non inoculés cultivés dans un sol infesté par un isolat du *Rhizoctonia solani*.

#### Effet des microorganismes sur la croissance de la laitue romaine au champ

L'inoculation des graines de laitue romaine à l'aide des bactéries *Enterobacter* sp. 22a, *Pseudomonas* sp. 24 et du champignon *Rhizopus* sp. 68 a significativement augmenté la masse de la matière fraîche des laitues de 11 à 18% par rapport au témoin non inoculé (tableau 5). Tel qu'observé chez le maïs, l'inoculation n'a pas influencé la concentration de la laitue en P, mais en présence de l'isolat 22a, le contenu total des plants en P a augmenté de 19%. Dans un essai effectué en serre, Digat et al. (1990) ont observé que chez certains cultivars de laitue, l'inoculation à l'aide de rhizobactéries appartenant au genre *Pseudomonas* cause des aug-

mentations de la matière fraîche de la laitue pouvant être de 36% supérieures par rapport aux témoins non inoculés. Dans cet essai, l'augmentation de la masse de matière fraîche de la laitue n'est pas associée à une augmentation de la concentration de P dans les tissus végétaux. Il est donc probable que la stimulation de la croissance n'est pas uniquement reliée à l'augmentation de la disponibilité du P suite à l'action de solubilisation microbienne (Kucey et al. 1989). La production de sidérophores inhibant les organismes phytopathogènes ou délétères, ou encore la production de phytohormones qui stimulent directement la croissance végétale peuvent aussi expliquer les effets bénéfiques observés. Ces observations, ainsi que celles effectuées sur le maïs, corroborent les résultats obtenus par Barea et al. (1976), Berthelin et al. (1991), Domey et Lippman (1989) et Pietr et al. (1991). En général, l'inoculation des graines de laitue

TABLEAU 5. Effets de l'inoculation à l'aide de microorganismes dissolvant le P sur l'absorption du P et la croissance de la laitue romaine cultivée au champ

Isolat	Inoculation (ufc par graine)	Humidité (%)	% par rapport au témoin non inoculé*		
			Matière fraîche	[P]	P total
<b>Bactéries</b>					
22a	$1,0 \times 10^6$	96,7	118a	102	119
22c	$1,2 \times 10^6$	96,5	108	97	107
24	$1,7 \times 10^6$	96,8	114a	96	105
<b>Champignon</b>					
68	$1,0 \times 10^2$	96,5	111b	101	107

NOTA : Les valeurs moyennes estimées du témoin non inoculé (100%) sont : matière fraîche, 684,0 g par plant; [P],  $4,96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière sèche; P total assimilé; 115,9 mg par plant. Le pourcentage d'humidité des plants du témoin non inoculé était de 96,6.

\*a, b valeurs différentes de celles du témoin non inoculé aux niveaux de probabilité de 1 et 3%, respectivement.

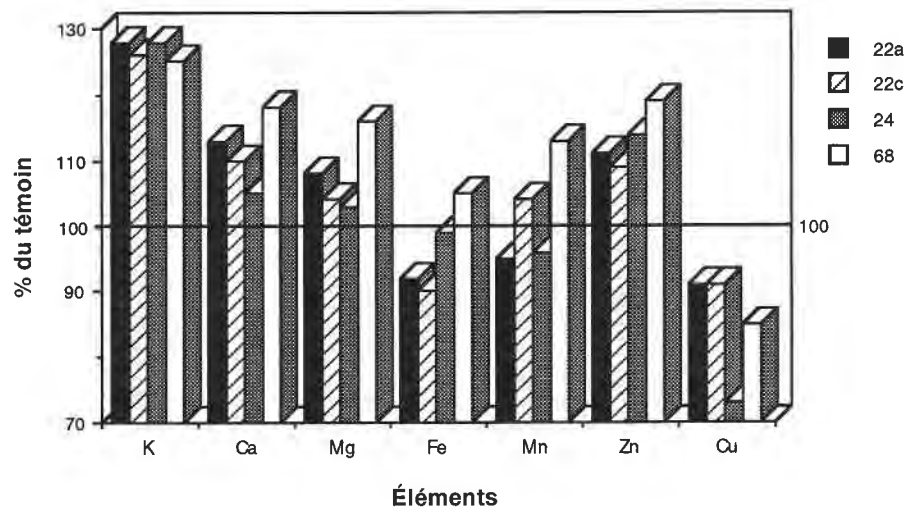


FIG. 2. Effet de l'inoculation de la laitue romaine cultivée au champ, à l'aide des isolats 22a et 22c d'*Enterobacter* sp., 24 de *Pseudomonas* sp. et 68 de *Rhizopus* sp., sur l'assimilation totale de K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu. Les valeurs moyennes estimées, par plant, pour le témoin non inoculé (100%) sont : K, 1,71 g; Ca, 0,21 g; Mg, 91,1 mg; Fe, 43,9 mg; Mn, 2,38 mg; Zn, 1,95 mg; Cu, 1,72 mg.

romaine à l'aide des microorganismes à l'essai a augmenté le contenu total des plantes en K, Ca, Mg et Zn dans des proportions variant de 3 à 28% (fig. 2). Tous les microorganismes introduits ont causé une augmentation du contenu total en K supérieure à 25%. L'effet stimulateur du *Rhizopus* sp. sur la croissance végétale et le contenu minéral de la plante a été plus marqué avec la laitue en comparaison au maïs (fig. 1 et 2). Ceci peut être expliqué en partie par les observations de Subba Rao (1982) selon lesquelles les légumes réagissent mieux que les céréales à l'inoculation à l'aide de microorganismes dissolvant le P.

### Conclusions

Ce travail indique que certains microorganismes telluriques dissolvant le P peuvent stimuler au champ la croissance du maïs et de la laitue romaine, et ainsi influencer l'absorption de certains éléments minéraux par ces deux plantes. La stimulation observée ne semble pas être reliée uniquement à l'augmentation de la disponibilité du P dans le sol, mais aussi à la production de sidérophores, de phytohormones ou bien à d'autres mécanismes d'action non encore identifiés au cours de cette étude. L'effet de synergie

exercée envers les mycorhizes bénéfiques présentes à l'état naturel dans le sol (Azcon et al. 1975; Kucey 1987) est un exemple des autres mécanismes possibles. Comme les différents cultivars des plantes peuvent influencer l'efficacité des microorganismes bénéfiques introduits dans la rhizosphère des plantes (Chanway et al. 1988; Digat et al. 1990), avant de faire des recommandations pratiques, il est essentiel d'étudier l'effet des microorganismes à l'étude sur le rendement et la nutrition minérale ainsi que sur la colonisation de la rhizosphère des différents cultivars de maïs et de laitue.

### Remerciements

Les auteurs remercient les professeurs C.J. Beauchamp et G.M. Olah pour leurs conseils judicieux, Madame O. Desbiens pour la microscopie électronique à balayage, le professeur J.W. Kloepper pour l'identification des isolats bactériens, et la COOP fédérée ainsi que la ferme J. Coulombe et fils pour les semences. R.C. est boursier du Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche. Ce travail a été financé en partie par William Houde Ltd. et par le Conseil des recherches et des services agricoles du Québec.

- Alexander, D.B., et Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, **12** : 39-45.
- Arora, D., et Gaur, A.C. 1978. Periodic microbial solubilization of  $^{32}\text{P}$  labelled hydroxyapatite. *Indian J. Microbiol.* **18** : 193-194.
- Azcon, R., Barea, J.M., et Hayman, D.S. 1975. Utilization of rock phosphate in alkaline soil by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **8** : 135-138.
- Bakker, A.W., et Schippers, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19** : 451-457.
- Barea, J.M., Navarro, E., et Montoya, E. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **40** : 129-134.
- Berthelin, J., Leyval, C., Laheurte, F., et De Giudici, P. 1991. Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization. *Dans Plant growth-promoting rhizobacteria—progress and prospects. Éditeurs : C. Keel, B. Koller et G. Défago. IOBC-WPRS Bulletin XIV(8) : 359-364.*
- Bric, J.M., Bostock, R.M., et Silverstone, S.E. 1991. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 535-538.
- Chang, S.C., et Chu, W.K. 1961. The fate of soluble phosphate applied to soils. *J. Soil Sci.* **12** : 286-293.
- Chanway, C.P., Holl, F.B., et Turkington, R. 1988. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymixa*. *Plant Soil*, **106** : 281-284.
- De Freitas, J.R., et Germida, J.J. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* **37** : 780-784.
- Digat, B., Gaudillat, M., et Labadie, J.M. 1990. Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis*, **9** : 295-303.
- Domey, S., et Lippmann, G. 1989. Stimulation of plant growth by phosphate solubilizing bacteria. *Dans Interrelationships between microorganisms and plants in soil. Éditeurs : V. Vancura et F. Kunc. Dev. Soil Sci.* **18** : 457-461.
- Fages, J., et Mulard, D. 1988. Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez *Zea mays*. *Agronomie (Paris)*, **8** : 309-314.
- Fassatiouva, O. 1986. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. *Prog. Ind. Microbiol.* **22**.
- Gachon, L. 1973. Vieillessement de divers engrais phosphatés en relation avec le type de sol, étudié par la méthode de Chang et de Jackson. *Ann. Agron. (Paris)*, **24** : 585-613.
- Gaines, P.T., et Mitchell, A.G. 1979. Chemical methods for soil and plant analysis. *Agronomy handbook No. 1. University of Georgia, Coastal Plain Station, Tifton.*
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1** : 51-57.
- Inui, T., Takeda, Y., et Iizuka, H. 1965. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11(suppl.)** : 1-121.
- Katznelson, H., Peterson, E.A., et Rouatt, J.W. 1962. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can. J. Bot.* **40** : 1181-1186.
- Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2699-2703.
- Kucey, R.M.N. 1988. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil. Sci.* **68** : 261-270.
- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H., et Leggett, M.E. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* **42** : 199-228.
- Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlée, D., et Antoun, H. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil*, **115** : 7-11.
- Malloch, D. 1981. Moulds: their isolation, cultivation and identification. *University of Toronto Press, Toronto.*
- Martin, J.P. 1950. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* **69** : 215-232.
- McKeague, J.A. (Éditeur). 1978. Manual of soil sampling and methods of analysis. *Canadian Soil Survey Committee, Canadian Society of Soil Science, Ottawa.*
- Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: a modification of Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **15** : 1409-1416.
- Pietr, S.J., Karon, B., et Stankiewicz, M. 1991. Influence of rock phosphate-dissolving rhizobacteria on the growth and P-uptake by cereals: preliminary results. *Dans Plant growth-promoting rhizobacteria—progress and prospects. Éditeurs : C. Keel, B. Koller et G. Défago. IOBC-WPRS Bulletin XIV(8) : 81-84.*
- Salih, H.M., Yahya, A.I., Abdul-Rahem, A.M., et Munan, B.H. 1989. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant Soil*, **120** : 181-185.
- Snedecor, G.W., et Cochran, W.C. 1989. *Statistical methods.* 8<sup>e</sup> éd. The Iowa State University Press, Ames. pp. 447-450.
- Statistical Analysis System Institute, Inc. 1985. *SAS user's guide: statistics. Version 5 edition. SAS Institute, Inc., Cary.*
- Subba Rao, N.S. (Éditeur.) 1982. Phosphate solubilization by soil microorganisms. *Dans Advances in agricultural microbiology. Butterworth Scientific, London.* pp. 295-303.
- Tandon, H.L.S., Cescas, M.P., et Tyner, E.H. 1968. An acid free vanadate molybdate reagent for determination of phosphorus in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **32** : 48-51.
- Tardieux-Roche, A. 1966a. Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron. (Paris)*, **17** : 403-471.
- Tardieux-Roche, A. 1966b. Transformations des phosphates naturels sous l'action de bactéries en culture pure. *Ann. Agron. (Paris)*, **17** : 481-528.
- Tardieux-Roche, A., et Tardieux, P. 1970. La biosynthèse des phosphates condensés par la microflore du sol et son rôle dans la nutrition des végétaux. *Ann. Agron. (Paris)*, **21** : 305-314.