

**REPROGRAPHIE DE LA REMISE FINALE  
DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE**

Lors de la remise finale de mon mémoire ou de ma thèse, les photocopies ont été effectuées par :

l'étudiant(e) :



*Les photocopies effectuées par l'étudiant(e)  
seront sous sa responsabilité.*

Fauzi Ben Rebah  
Nom

Fauzi  
Signature

Nom du directeur de recherche: R.D. Lyagi

Nom du co-directeur de recherche: Danielle Prevost

Boursier ou non-boursier: ~~Boursier~~ Non Boursier

Université du Québec  
INRS-Eau

**UTILISATION DES BOUES D'ÉPURATION COMME MILIEU DE  
CULTURE POUR LA PRODUCTION D'INOCULANTS À BASE  
DE RHIZOBIUM**

Par  
Ben Rebah Faouzi  
Maîtrise en Environnement

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae doctorat (Ph.D.)  
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

|  |   |
|--|---|
| Président du jury et examinateur interne         | Mme Darakhshan Ahmad , professeur<br>INRS-Santé                               |
| Examineur externe                                | M. Shiv O. Prasher, professeur<br>Université McGill                           |
| Examineur externe                                | M. Antoun Hani, professeur<br>Université Laval                                |
| Examineur interne et<br>Codirecteur de recherche | Mme Prévost Danielle, professeur<br>Agriculture et Agro-alimentaire<br>Canada |
| Directeur de recherche                           | M. Rajeshwar D. Tyagi, professeur<br>INRS-Eau                                 |

Thèse soutenue le 16 octobre 2001

## REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma sincère gratitude à mon directeur Dr R. D. Tyagi pour m'avoir bien guidé dans mon travail et pour ses conseils constructifs. En tant qu'expert dans le traitement des eaux usées et la valorisation des boues municipales et industrielles, ses intérêts particuliers dans les issues environnementales sont à l'origine de ce projet, auquel il a apporté une grande contribution.

J'aimerais remercier ma codirectrice Dr D. Prévost, pour sa disponibilité et l'encouragement qu'elle m'a apportée. Sans son expertise en microbiologie du sol pour me guider, sa coopération enthousiaste et ses innombrables heures passées sur ce projet, la thèse aurait pu être totalement différente. Travailler sous sa codirection est autant un plaisir qu'un travail.

Je suis grandement redevable au professeur J. R. Valero qui m'a encouragé et m'a supporté durant mon travail.

J'aimerais aussi remercier le personnel de la bibliothèque et les techniciens de l'INRS-Eau ainsi que ceux du centre de recherche d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada, mais particulièrement Carole, Gabriel, Pauline et Sébastien pour leur contribution aux analyses.

Mes sincères remerciements vont aussi à plusieurs de mes collègues et amis, mais particulièrement à Youssef et Simon pour leur soutien et leur aide et leur encouragement durant la réalisation de mon travail.

Finalement, je remercie également mes parents, mes frères, mes sœurs pour leur appui et leur encouragement.

Faouzi Ben Rebah

## RÉSUMÉ

L'utilisation des boues d'épuration pour la production d'un inoculum commercial de rhizobium a été démontré en tenant compte de leur composition en éléments nutritifs capable de supporter la croissance des rhizobia. La première étape du projet consistait à caractériser des boues de différentes origines et à tester la croissance de deux groupes de rhizobia (à croissance rapide : *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et à croissance lente: *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*). Les essais de croissance en erlenmeyer ont montré la possibilité d'utiliser les boues comme milieu de culture pour les rhizobia et que généralement le nombre de cellules de rhizobia dépasse  $1 \times 10^9$  ufc/ml après 72h de croissance. Ajoutons à cela que la variabilité de la composition des boues affecte le temps de génération, le rendement en cellules et l'indice de nodulation sur les légumineuses hôtes. Par ailleurs, une concentration élevée en solide totaux tend à donner un temps de génération élevé. En outre, les boues primaires peuvent inhiber la croissance des cellules et l'utilisation d'un prétraitement acide, alcalin et oxydatif augmentent la biodégradabilité des boues primaires et en conséquence le compte cellulaire (cas de *S. meliloti*).

L'effet de la concentration des solides en suspension et d'un prétraitement acide (pH 2.0 à pH 6.0 obtenu avec du  $H_2SO_4$ ) et alcalin (50 à 200 meq/L NaOH) des boues primaire (boue de Black Lake primaire) et secondaire (boue de Black Lake secondaire) a été étudié sur la croissance de *S. meliloti*. Dans les boues primaires ainsi que dans les boues secondaires, quelques traitements acides et alcalins ont causé une augmentation des comptes cellulaires et une réduction du temps de génération de *S. meliloti* et ceci est en fonction de la concentration en solides en suspension. Par exemple, dans les boues primaires non-traitées, le nombre le plus élevé de cellules ( $11.10 \times 10^9$  ufc/mL) a été obtenu avec 1.3% de solides en suspension. Cependant, un dénombrement maximum de  $13.00 \times 10^9$  ufc/mL a été atteint avec un traitement acide à pH 2.0 sous une concentration de 0.325% de solides en suspension, alors que le traitement alcalin avec 100 meq/L NaOH à 0.65% de solides a augmenté le rendement des cellules à  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL. Les résultats de cette partie expérimentale ont montré aussi que *S. meliloti* produit dans les boues traitées a maintenu sa capacité à noduler la luzerne.

L'effet de l'addition de sources de nutriments (extrait de levure et glycérol) à la boue secondaire de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) sur la souche *S. meliloti* a été étudié. Les résultats ont montré que le nombre de cellules ainsi que le temps de génération ont été affectés par l'addition de ces sources de nutriments et que le nombre maximal de cellules de  $8.85 \times 10^9$  ufc/ml a été observé au bout de 32 heures d'incubation après addition de 4 g/l d'extrait de levure. De même l'addition du glycérol, aux échantillons de boue contenant 4 g/l d'extrait de levure a amélioré encore la croissance rhizobiale et la valeur la plus élevée de  $16.5 \times 10^9$  ufc/ml a été obtenue avec 7.5 g/l de glycérol.

L'effet du contrôle du pH sur la souche *S. meliloti* dans les boues de CUQ a été étudié en fermenteur de 15 litres équipé d'un contrôleur de pH. Dans cette expérience en fermenteur, il a été observé que le pH n'était pas un facteur limitant et l'augmentation du pH à 8.85 dans le fermenteur non contrôlé semble n'avoir aucun effet sur la croissance de la souche en question.

Il a été aussi prouvé que la boue offre une meilleure protection pour la survie du rhizobia (*S. meliloti* cultivée dans la boue de CUQ) durant la congélation-décongélation à  $-20^\circ\text{C}$  que le milieu standard (milieu à l'extrait de levure et au mannitol : YMB). Les résultats ont montré également la possibilité d'utiliser la boue comme support (Cas de la boue de Jonquière) par ce qu'elle supporte, comme la tourbe, la survie de *S. meliloti* et que le nombre de cellules demeure acceptable comparativement au standard quelque soit l'origine de l'inoculant (préparé dans les boues ou dans YMB) et la température de conservation (4 ou  $25^\circ\text{C}$ ).

Finalement, l'efficacité des inoculants (cas de *S. meliloti*) à base de boue (inoculant solide ou liquide) a été étudiée et comparée à celle des inoculants à base du milieu de culture standard (YMB) pour le cas de la luzerne cultivée dans des pots contenant deux types de sol (Kamouraska : sol argileux et Saint-André : sol sableux) fertilisés (fertilisant commercial) et amendés à des doses de 60 et 120 KgN/ha (avec des boues secondaires de la CUQ). Les résultats des rendements de la luzerne en matière sèche et en azote ont montré que les inoculants à base de boue ont le même potentiel que ceux à base d'YMB et tous les inoculants (inoculant solide ou liquide) ont la même tendance. Ajoutons à cela, l'application des boues comme amendement a augmenté le nombre du rhizobia dans les sols et a amélioré significativement le poids sec et le

contenu en azote de la luzerne. Cette amélioration augmente avec l'augmentation de la dose des boues et avec la coupe. Cependant, l'application du fertilisant azoté a donné des faibles rendements de la plante. Les résultats ont montré aussi que le processus de nodulation a été toujours maintenu dans les sols amendés et fertilisés et que les macroéléments et les métaux lourds apportés par les boues sont à un niveau acceptable et ne sont pas considérés comme des facteurs négatifs dans cette étude. Cependant, les meilleurs rendements obtenus avec le sol de Kamouraska par rapport à celui de Saint-André semble être en relation avec leurs caractéristiques.

## TABLE DES MATIÈRES

|  |    |
|--|----|
| <b>Chapitre 1 : SYNTHÈSE</b> .....   | 1  |
| 1. INTRODUCTION.....   | 1  |
| 2. REVUE DE LITTÉRATURE.....   | 2  |
| 2.1. Généralité sur les rhizobia.....  | 2  |
| 2.1.1. Taxonomie des rhizobia.....   | 2  |
| 2.1.2. Le processus de nodulation.....   | 4  |
| 2.2. La culture des rhizobia.....  | 6  |
| 2.2.1. Les exigences nutritives du rhizobium.....  | 6  |
| 2.2.2. Production d'inoculum à l'échelle industrielle.....   | 7  |
| 2.2.3. Les conditions de production de rhizobium.....  | 8  |
| 2.3. Utilisation des rhizobia en agriculture.....  | 9  |
| 2.4. Généralité sur les boues des stations d'épuration.....  | 10 |
| 2.4.1. Stabilisation et prétraitement des boues.....   | 13 |
| 2.4.2. Élimination des boues.....  | 14 |
| 2.4.3. Les métaux lourds dans les boues d'épuration.....   | 16 |
| 2.5. Effet de métaux sur les populations de rhizobium.....   | 17 |
| 3. PROBLÉMATIQUES.....   | 20 |
| 3.1. Problématique de disposition des boues.....   | 20 |
| 3.1. Problématique de la production d'inoculants commerciaux.....  | 20 |
| 4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....  | 21 |
| 4.1. Hypothèses.....   | 21 |
| 4.2. Objectifs de la recherche.....  | 21 |
| 5. MÉTHODOLOGIE.....   | 22 |
| 6. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....  | 24 |
| 6.1. Caractérisation des boues des stations d'épuration.....   | 24 |
| 6.2. Utilisation des boues comme milieu de culture pour les rhizobia.....  | 25 |
| 6.3. Effet des solides en suspension et d'un prétraitement des boues sur la croissance du <i>S. meliloti</i> ..... | 27 |
| 6.3.1. Effet des solides en suspension.....  | 28 |
| 6.3.2. Effet d'un prétraitement acide.....   | 29 |
| 6.3.3. Effet d'un prétraitement alcalin.....   | 29 |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.3.4. Évaluation du potentiel de nodulation.....   | 30        |
| 6.4. Influence de l'addition de sources de nutriments sur la croissance du <i>S. meliloti</i> .....   | 30        |
| 6.5. Influence du contrôle du pH.....   | 32        |
| 6.6. Effet des conditions de conservation sur la survie de <i>S. meliloti</i> .....   | 32        |
| 6.7. Effet de l'inoculation par <i>S. meliloti</i> cultivé dans les boues ainsi que de l'amendement des sols par les boues sur la nodulation, le rendement en matière sèche et la teneur en azote de la luzerne ..... | 34        |
| 7. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....  | 36        |
| 7.1. Conclusions.....   | 36        |
| 7.2. Recommandations.....   | 38        |
| RÉFÉRENCES.....   | 40        |
| <b>Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH.....</b>  | <b>54</b> |
| RÉSUMÉ.....   | 54        |
| ABSTRACT.....   | 55        |
| 1. INTRODUCTION.....  | 56        |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....  | 56        |
| 2.1. Sludge sampling.....   | 56        |
| 2.2. Sludge pre-treatment.....  | 57        |
| 2.3. Micro-organisms.....   | 57        |
| 2.4. Inoculum preparation.....  | 57        |
| 2.5. Growth experiments.....  | 58        |
| 2.6. Verification of the nodulation potential.....  | 58        |
| 2.7. Sludge analysis.....   | 58        |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION.....  | 59        |
| 3.1. Sludge composition.....  | 59        |
| 3.2. Influence of sludge origin on growth of rhizobia.....  | 60        |
| 3.3. Variation of pH during growth of rhizobia.....   | 62        |
| 3.4. Influence of sludge-grown rhizobia on the nodulation.....  | 63        |
| 3.5. Influence of pre-treatments on the production of <i>S. meliloti</i> .....  | 63        |
| 4. CONCLUSIONS.....   | 65        |
| REFERENCES.....   | 66        |



**Chapitre 3: ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE.....81**

RÉSUMÉ.....81

ABSTRACT.....82

1. INTRODUCTION.....83

2. MATERIAL AND METHODS.....84

    2.1. Sludge sampling and characterisation.....84

    2.2. Alkaline pre-treatment.....85

    2.3. Acid pre-treatment.....85

    2.4. Rhizobial strain and inoculum preparation.....85

    2.5. Growth experiments.....85

    2.6. Evaluation of the nodulation.....86

3. RESULTS AND DISCUSSION.....86

    3.1. Characterisation of waste water sludge.....86

    3.2. Effect of total suspended solid concentration and acid hydrolysis on *S. meliloti* growth.....87

    3.3. Effect of total suspended solid and alkaline dose on *S. meliloti* growth...89

    3.4. Evaluation of the nodulation potential.....91

4. CONCLUSIONS.....91

REFERENCES.....92

**Chapitre 4 : PRODUCTION OF *S. MELILOTI* USING WASTEWATER SLUDGE AS A RAW MATERIAL: EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND pH CONTROL.....102**

RÉSUMÉ.....102

ABSTRACT.....103

1. INTRODUCTION.....104

2. MATERIAL AND METHODS.....104

    2.1. Rhizobial strain.....104

    2.2. Sludge sampling.....105

    2.3. Shake flask experiments.....105

    2.4. Fermentor experiments.....105

|  |            |
|--|------------|
| 3. RESULTS.....  | 106        |
| 3.1. Effect of yeast extract on rhizobial growth.....  | 106        |
| 3.2. Effect of yeast extract and glycerol on rhizobial growth.....   | 106        |
| 3.3. The effect of pH control on rhizobial growth.....   | 107        |
| 4. DISCUSSION.....   | 107        |
| 5. CONCLUSIONS.....  | 110        |
| REFERENCES.....  | 110        |
| <b>Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF SINORHIZOBIUM MELILOTI.....</b> | <b>120</b> |
| RÉSUMÉ.....  | 120        |
| ABSTRACT.....  | 121        |
| 1. INTRODUCTION.....   | 122        |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....   | 123        |
| 2.1 Rhizobial growth.....  | 123        |
| 2.2. Freezing and thawing of <i>S. meliloti</i> cultures.....  | 124        |
| 2.3. Preparation of carrier based inoculants.....  | 124        |
| 3. RESULTS.....  | 124        |
| 3.1. Characterisation of waste water sludges and peat.....   | 124        |
| 3.2. Effect of freezing on rhizobial survival.....   | 125        |
| 3.3. Survival of YMB grown-rhizobia in carriers.....   | 125        |
| 3.4. Survival of secondary sludge-grown rhizobia in carriers.....  | 126        |
| 4. DISCUSSION.....   | 127        |
| 5. CONCLUSIONS.....  | 130        |
| REFERENCES.....  | 130        |
| <b>Chapitre 6: NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE.....</b>                       | <b>140</b> |
| RÉSUMÉ.....  | 140        |
| ABSTRACT.....  | 141        |
| 1. INTRODUCTION.....   | 142        |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....   | 142        |
| 2.1. Soil and sludge origins.....  | 143        |
| 2.2. Chemical analysis.....  | 143        |

|      |  |            |
|------|--|------------|
| 2.3  | Estimation of population size of the indigenous rhizobia.....                              | 143        |
| 2.4  | Procedures and experimental design.....  | 143        |
| 2.5  | Plant growth and nodulation assessment.....  | 144        |
| 3.   | RESULTS.....   | 145        |
| 3.1. | Sludge and soil chemical characteristics.....  | 145        |
| 3.2. | Assessment of nodulation of alfalfa and the population size<br>of <i>S. meliloti</i> ..... | 146        |
| 3.3. | Shoot dry weight and nitrogen content.....   | 146        |
| 3.4. | Macronutrients and heavy metals uptake by alfalfa plants.....                              | 149        |
| 4.   | DISCUSSION.....  | 150        |
| 5.   | CONCLUSIONS.....   | 155        |
|      | REFERENCES.....  | 155        |
|      | <b>ANNEXES</b> .....   | <b>169</b> |

## LISTE DES FIGURES

### **Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

- Figure 1. Growth of fast-growing rhizobia on different sludges and on YMB media; means of two replicates.....78
- Figure 2. Growth of slow-growing rhizobia on different sludges and on YMB media; means of two replicates.....79
- Figure 3. Growth of *S. meliloti* on different pre-tread sludges and on YMB media; means of two replicates.....80

### **Chapitre 4 : GROWTH OF *S. MELILOTI* IN WASTEWATER SLUDGE : THE EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND THE pH CONTROL**

- Figure 1. Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with different concentrations of yeast extract (Y.E).....116
- Figure 2. Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with 4g/l of yeast extract (Y.E) and different concentrations of glycerol (Gly).....117
- Figure 3. Growth of *S. meliloti* and pH variation using secondary sludge in fermentor experiment.....118
- Figure 4. Initial and final concentrations of the soluble COD, N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> of the sludge supporting *S. meliloti* growth in controlled and uncontrolled fermentors.....119

### **Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

- Figure 1. Survival of YMB-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05).....137
- Figure 2. Survival of secondary sludge-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05).....138

Figure 3. Survival percentages of *S. meloliti* in different carriers after 130 days of storage. Calculation based on the maximum cell numbers obtained during storage.....139

**LISTES DES TABLEAUX****Chapitre 1 : SYNTHÈSE**

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1. Milieux utilisés dans la culture de rhizobium (Tiré de Burton, 1979).....                                | 8  |
| Tableau 2. Teneurs limites obligatoires et recommandées en métaux lourds dans les boues destinées à l'épandage..... | 17 |
| Tableau 3. Boues des usines d'épuration testées comme milieu de culture pour les souches de rhizobium.....          | 23 |

**Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Determination of the nodulation index.....                                       | 71 |
| Table 2. Physical and chemical characteristics of original sludges.....                   | 72 |
| Table 3. Metals content of sludges and recommended levels for agricultural practices..... | 73 |
| Table 4. Growth results of fast-growing strains using different sludges.....              | 74 |
| Table 5. Growth result of slow-growing rhizobium strains using different sludges.....     | 75 |
| Table 6. Nodulation capacity of rhizobia strains produced in different sludges.....       | 76 |
| Table 7. Growth results of <i>S. meliloti</i> after sludge pre-treatments.....            | 77 |

**Chapitre 3: ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE**

|   |     |
|---|-----|
| Table 1. Determination of the nodulation index.....   | 96  |
| Table 2. The characteristics of the original sludges.....   | 97  |
| Table 3. Effect of TSS concentration and acid hydrolysis on <i>S. meliloti</i> grown in primary sludge..... | 98  |
| Table 4. Effect of TSS and acid hydrolysis treatment on <i>S. meliloti</i> grown in secondary sludge.....   | 99  |
| Table 5. Effect of TSS and alkaline dose on <i>S. meliloti</i> grown in primary sludge.....                 | 100 |
| Table 6. Effect of TSS and alkaline dose on <i>S. meliloti</i> grown in secondary sludge.....               | 101 |

**Chapitre 4 : GROWTH OF *S. MELILOTI* IN WASTEWATER SLUDGE : THE EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND THE pH CONTROL**

|   |     |
|---|-----|
| Table 1. Characteristics of sludge used in the experiments..... | 113 |
|---|-----|

Table 2. Effect of yeast extract on rhizobial growth.....114  
Table 3. Effect of glycerol on rhizobial growth.....115

**Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

Table 1. The characteristics of the original sludges and peat.....135  
Table 2. pH and moisture at the end of storage.....136

**Chapitre 6: NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE**

Table 1 Determination of the nodulation index.....161  
Table 2. Soils characteristics.....162  
Table 3. Total composition of sludge, quantity added to soil and recommended levels of heavy metals for agricultural practices.....163  
Table 4. Nodulation index of alfalfa and rhizobial number in soils at the end of the experiment.....164  
Table 5. Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Kamouraska soil.....165  
Table 6. Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Saint André soil.....166  
Table 7. P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Kamouraska soil.....167  
Table 8. P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Saint André soil.....168

**PARTIE I**  
**Chapitre 1 : SYNTHÈSE**



## **Chapitre 1**

### **SYNTHÈSE**

#### **1. INTRODUCTION**

Afin de répondre aux demandes mondiales toujours grandissantes pour la production de protéines végétales, il faut pouvoir mettre à la disposition des végétaux les quantités d'azote indispensables. Généralement, l'agriculture utilise surtout des engrais azotés de synthèse nitriques et ammoniacaux. Cependant, la technologie propre à ces industries est très coûteuse, ce qui constitue un problème d'accessibilité surtout pour les pays en voie de développement. De plus, dans les pays plus développés, l'utilisation grandissante cause un problème environnemental. Les nitrates polluent les eaux souterraines et constituent un danger pour la santé humaine.

Ce problème peut être réduit en se basant sur le fait que certaines espèces végétales forment leurs protéines à partir de l'azote gazeux inerte. Il s'agit d'un phénomène biologique essentiel. Ce sont les légumineuses principalement qui peuvent, grâce à une symbiose avec des bactéries du sol (les rhizobia), fixer dans l'atmosphère des millions de tonnes d'azote.

En symbiose, au champ, les rhizobia peuvent fixer de 40 à 350 kg/ha d'azote par saison de croissance (Quispel, 1974). Cet avantage naturel se traduit chez l'agriculteur par une diminution de la consommation des engrais azotés et ainsi une réduction des coûts de production d'une importance appréciable dans le contexte économique actuel.

La nécessité d'inoculer avec des rhizobia certaines cultures de légumineuses dans le monde et en particulier dans les pays en voie de développement pose de façon cruciale le problème de l'approvisionnement en inoculum de qualité et à moindre coût. En effet, le prix et la disponibilité de la source de carbone influencent la production de l'inoculum de rhizobium (Bissonnette et al., 1986). Dans cette perspective, une grande variété de milieux a été testée pour la production à grande échelle de l'inoculum (Burton, 1979; Bergersen, 1961). Le milieu YMB (yeast extract mannitol) est généralement utilisé pour la production du rhizobium à l'échelle de laboratoire.

L'utilisation de ce milieu de culture en milieu industriel est limitée surtout par le coût élevé.

Des recherches ont été déclenchées, afin de mettre au point des milieux de cultures économiques et capables de soutenir la croissance des rhizobia. Ainsi, plusieurs chercheurs ont tenté de tester des déchets industriels, comme les sous-produits de l'industrie des boissons alcooliques (Burton, 1979), les débris des enveloppes de pois protéolysés (Gulati et al., 1979), l'extrait de germes de malt (Bioardi et Ertola., 1985), les sous-produits de l'industrie de levure (Meade et al., 1985) et les résidus de fabrication du fromage comme le lactosérum (Bissonnette et al, 1986). Ces sous-produits testés constituent un milieu riche en sources de carbone et d'azote et en facteurs de croissances indispensables pour la croissance des rhizobia.

La valorisation des déchets constitue une solution bénéfique pour assurer un environnement de qualité. Entre autres, des programmes d'intervention ont été créés dans le but de résoudre les problèmes de pollution tels que ceux des eaux usées qui nécessitent l'application de certains procédés d'assainissement (Crowley et al., 1986). Ces procédés d'assainissement génèrent des boues d'épuration. La richesse de ces boues en substances nutritives (carbone, azote, phosphore, sels minéraux...etc.) les rend des produits valorisables en agriculture. La présente étude vise donc à la valorisation des boues d'épuration municipales et industrielles en les utilisant comme milieu de culture pour la production d'inoculum commerciaux de rhizobium.

## **2. REVUE DE LITTÉRATURE**

### **2.1. Généralité sur les rhizobia**

#### **2.1.1. Taxonomie des rhizobia**

Les rhizobia sont des bactéries du sol gram-négatives, aérobies en forme de bâtonnets et non sporulantes pas qui appartiennent à la famille des Rhizobiaceae (Jordan, 1982). Selon la classification actuelle, cette famille comprend le genre *Rhizobium* (*R. galegae*, *R. leguminosarum*, *R. elti*), *Sinorhizobium* (*S. meliloti*, *S. fredii*, *S. teranga*, *S. saheli*), *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. ciceri*, *M. huakuii*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii*) et *Azorhizobium* (*Az. Caullnodans*) (Young et Haukka, 1996). Des nouvelles espèces s'ajoutent toujours, et un nouveau genre, *Allorhizobium* (*Al.*

*undicola*) vient d'être rapporté (Amarger, 2001)

Les différents rhizobia se distinguent par leurs vitesses de croissance, par la nutrition carbonée et par la différence enzymatique. Ainsi, on trouve ceux à croissance rapide (*Rhizobium* et *Sinorhizobium*) et ceux à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Dans ce qui suit, on parlera uniquement de ces deux sous-groupes (ceux à croissance rapide et ceux à croissance lente).

La comparaison entre ces deux sous-groupes montre que les espèces du genre *Bradyrhizobium* possèdent un flagelle polaire ou subpolaire, tandis que celles de l'autre groupe comportent deux à six flagelles péritriches. Les espèces du genre *Rhizobium* contiennent de grands plasmides très stables (pSym), variables en nombre et en taille (200 à 1 500 kilopaires de base). Les souches de *Bradyrhizobium* ne possèdent pas de grands plasmides (Martinez et al., 1990).

Les rhizobia qui se caractérisent par une croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 heures), comprend *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *M. loti* et *R. galegae*. Les souches poussant dans un bouillon à base de glucose et d'extrait de levure (YGB), ont un temps de génération de 3,4 à 8,3 heures (Martinez de Drets et Arias, 1972). Les souches les plus représentatives ont un temps de génération de 5,5 heures (Martinez de Drets et Arias 1972) ou moins (Kennedy et Greenwood, 1982). Elles forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre après 3 à 5 jours d'incubation sur gélose à base de mannitol et d'extrait de levure (YMA) (Jordan, 1982). Le genre *Bradyrhizobium*, à croissance plus lente (temps de génération supérieur à 6 heures), comprend une grande variété de souches formant des nodosités sur diverses légumineuses tropicales, la plupart appartenant à l'espèce *B. japonicum*, qui regroupe toutes les souches capables de noduler le soja. Les *Bradyrhizobium* poussant sur milieu YGB ont un temps de génération de 14,3 à 33,3 heures (Martinez de Drets et Arias, 1972). Les souches les plus représentatives ont un temps de génération de 8,5 heures ou plus (Kennedy et Greenwood, 1982). Lorsqu'ils poussent sur milieu YMA, ils forment des colonies qui ne dépassent pas 1 mm de diamètre après 5 à 7 jours d'incubation (Jordan, 1982).

Les rhizobia à croissance rapide utilisent une grande diversité de substrats carbonés, parmi les hexoses, les pentoses, les di et les trisaccharides et les acides organiques (Allen et Allen, 1950). Les *Bradyrhizobium*, par contre, n'utilisent pas une si grande

diversité de substrats carbonés, mais peuvent utiliser une variété de substrats aromatiques (Pake et Ornston, 1984). Ils n'utilisent pas les disaccharides ni les acides organiques. Ces différences dans la nutrition carbonée sont reliées à leur capacité de transport des substrats et à la présence d'enzymes pouvant les métaboliser.

L'enzyme clé de la voie des pentoses phosphate le NADP-6-phosphogluconate dehydrogénase n'a été observée que chez les espèces à croissance rapide. La présence de cette enzyme leur permet d'utiliser la voie des pentoses phosphate ce qui les différencie des *Bradyrhizobium* qui ne peuvent pas utiliser cette voie pour la dégradation des hexoses (Hernandez et Focht, 1984; Martinez de Drets et Arias, 1972).

D'autres différences enzymatiques se trouvent au niveau de la dégradation des disaccharides. Ainsi les rhizobia possèdent l'enzyme invertase qui leur permet de briser le saccharose. Cette enzyme est absente chez les *Bradyrhizobium* qui ne peuvent donc pas croître sur ce substrat (Martinez de Drets et al., 1974). Au niveau de la dégradation des pentoses, les *Bradyrhizobium* possèdent l'enzyme 2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase qui intervient dans une voie produisant du pyruvate et de l'acétaldéhyde à partir du L-arabinose. Cette enzyme est absente chez ceux à croissance rapide (Pedrosa et Zancan, 1974).

### **2.1.2. Le processus de nodulation**

La symbiose rhizobium - légumineuses joue un rôle important en agriculture à cause de sa capacité de fixer l'azote atmosphérique en n'utilisant que l'énergie fournie par la photosynthèse.

C'est au niveau des nodosités situées sur les racines de la plante hôte que les bactéroïdes (forme bactérienne du nodule) peuvent réduire l'azote atmosphérique grâce au complexe enzymatique de la nitrogénase.

L'établissement de la symbiose débute par la colonisation de la surface racinaire par les rhizobia et se termine par le fonctionnement efficace de la nitrogénase dans les nodosités. Les études sur l'adsorption racinaire ont démontré que cette étape est déterminante dans l'établissement de la symbiose et ont permis de distinguer deux phases. La première est la phase de faible adhésion, réversible, par contre la deuxième