



**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO  
FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES**

**MEMOIRE  
DE DIPLOME D' ETUDES APPROFONDIES (DEA)  
EN BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES  
Option : PHYSIOLOGIE VEGETALE**

**AMELIORATION DE LA NUTRITION AZOTEE DU RIZ PLUVIAL PAR LA  
FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE AVEC LES BACTERIES**

*Azospirillum sp*

**Présenté par :**

**VIAVY Elodie Judica**

**Maître ès Sciences**

**Soutenu publiquement le : 25 Septembre 2009**

**Devant la commission d'examen composé de :**

**Président : Professeur RAMAVOVOLOLONA** → ramavoperle@yahoo.fr

**Rapporteur : Docteur RATSIMALA RAMONTA Isabelle**

**Examineurs : Docteur RAVONIARISON Nivohanintsoa**

**Docteur DUSSERRE Julie**

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à tous ceux qui nous ont aidés à finaliser ce travail. Notre profonde reconnaissance s'adresse particulièrement à :

Madame Ramavovololona, Professeur et Enseignant chercheur, Responsable de la formation doctorale au Département de Biologie et Ecologie Végétales, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir présider le jury de ce mémoire. Nous vous sommes très reconnaissante.

Madame Isabelle Ratsimiala Ramonta, Maître de Conférences et Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences d'Antananarivo, qui a bien voulu nous diriger et accepter d'être le rapporteur de ce travail et n'a pas ménagé son temps malgré ses préoccupations. Nous vous exprimons notre gratitude.

Madame Nivohanintsoa Ravoniarison, Maître de Conférences et Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences d'Antananarivo, pour nous avoir donné des conseils pour l'amélioration de notre travail.

Madame Julie Dusserre, chercheur spécialiste en Physiologie Végétale à l'URP SCRID Antsirabe, vous vous êtes dévouées pour examiner ce mémoire. Soyez assuré de nos sincères reconnaissances.

Ce travail ne peut être mené à terme sans l'appui financier de l'URP SCRID. Nous sommes extrêmement reconnaissantes envers cette institution.

Nous sommes aussi redevables aux personnes suivantes :

Faly Rasoanaivo Harisoa, ma coéquipière, elle a vécu avec nous les pires et les meilleurs moments lors de la réalisation de ce mémoire. Merci de tout cœur.

Holy Razafindratsimandresy, elle a bien voulu nous prêter mains fortes pour les illustrations et les traitements d'image.

Les techniciens de laboratoire du Département de Biologie et Ecologie Végétales qui nous ont beaucoup aidé sur le terrain.

Nous tenons aussi à remercier tous les enseignants du Département de Biologie et Ecologie Végétales qui nous ont guidé sur les démarches scientifiques durant nos années universitaires.

Au terme de ces remerciements, nous tenons à exprimer notre profonde considération à ma famille pour leur soutien financier et moral durant nos années d'études.

Nous tenons aussi à adresser nos sincères remerciements à tous les collègues de la promotion RIANALA.

A tous ceux qui, près ou de loin, ont contribué à la finalisation de ce mémoire.

Merci infiniment

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| Remerciements.....   | i         |
| Liste des tableaux.....  | vi        |
| Liste des figures.....   | vi        |
| Liste des annexes.....   | vi        |
| Liste des abréviations.....  | vii       |
| Glossaire.....   | viii      |
| <br>   |           |
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Première partie : GENERALITES .....</b>                                 | <b>4</b>  |
| <b>A- GENERALITES SUR LE RIZ .....</b>                                     | <b>5</b>  |
| I- Aperçu général sur la culture du riz dans le monde .....                | 5         |
| II- Systématique du riz.....   | 5         |
| III- La physiologie du riz .....   | 6         |
| 1- Stade végétatif .....   | 6         |
| 1-1- La levée .....  | 6         |
| 1-2- Le stade plantulaire .....  | 6         |
| 1-3- Le tallage .....  | 7         |
| 2- Stade reproducteur .....  | 7         |
| <b>B- L'AZOTE ET LE RIZ.....</b>   | <b>8</b>  |
| I- Rôles de l'azote sur le riz .....                                       | 9         |
| II- Nutrition azotée du riz.....   | 9         |
| III- Azote dans le sol.....  | 10        |
| <b>C- GENERALITES SUR LE SYSTEME DE RIZICULTURE INTENSIVE ou SRI .....</b> | <b>10</b> |
| I- Historique .....  | 10        |
| II- Les facteurs responsables du haut rendement en SRI .....               | 11        |
| <b>D- LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE ou BNF.....</b>                    | <b>11</b> |
| <b>E- LA BACTERIE : <i>Azospirillum sp</i> .....</b>                       | <b>11</b> |
| I- Mode d'action de l' <i>Azospirillum sp</i> .....                        | 11        |
| II- Les différentes espèces d' <i>Azospirillum</i> .....                   | 12        |

|  |    |
|--|----|
| <b>Deuxième partie : MATERIELS ET METHODES</b> .....                       | 13 |
| A- MATERIEL BIOLOGIQUE.....  | 14 |
| I- Caractéristiques des variétés de riz utilisées .....                    | 14 |
| 1- Variété X 265 (FOFIFA) .....  | 14 |
| 2-Variété FOFIFA 161 .....   | 14 |
| II- <i>Azospirillum sp.</i> .....  | 14 |
| B- PREPARATION DE L'INOCULUM .....   | 15 |
| I- Préparation d'extrait des racines de riz .....                          | 15 |
| II- Isolement et purification des souches d' <i>Azospirillum sp.</i> ..... | 16 |
| III- Méthodes d'observation.....   | 17 |
| 1- Observation macroscopique.....  | 17 |
| 2- Observations microscopiques .....                                       | 17 |
| 2-1- Observation à l'état frais .....                                      | 17 |
| 2-2- Observation après coloration.....                                     | 17 |
| IV- Multiplication des souches .....                                       | 18 |
| 1- Production de l' inoculum liquide .....                                 | 18 |
| 2- Technique de production de l' inoculum liquide.....                     | 18 |
| V- Dénombrement des colonies bactériennes.....                             | 19 |
| C- Evaluation de l'inoculation ou bactérisation.....                       | 19 |
| 1- Technique d'inoculation .....   | 20 |
| 1-1- Expérimentation en serre.....   | 20 |
| 1-2- Expérimentation au champ.....   | 21 |
| 2- Observation directe et suivi .....                                      | 22 |
| 3- Les caractères agronomiques étudiés.....                                | 22 |
| 4- Analyse statistique .....   | 23 |
| <b>Troisième partie : RESULTATS ET INTERPRETATIONS</b> .....               | 25 |
| A- OBSERVATION MICROSCOPIQUE.....  | 26 |
| B-EFFETS DE LA BACTERISATION SUR LES PLANTS DE RIZ.....                    | 26 |
| I- SUR LE NOMBRE DE TALLES PAR PIED .....                                  | 26 |
| II- SUR LA LONGUEUR DE FEUILLES PANICULAIRES.....                          | 27 |
| III- SUR LE NOMBRE DES GRAINES FERTILES (PLEINES) PAR PANICULE .....       | 29 |
| VI- SUR LE NOMBRE DE GRAINES DANS 100 g DE POIDS.....                      | 30 |
| V- SUR LE RENDEMENT DU RIZ.....  | 31 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Quatrième partie : DISCUSSIONS, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>                | <b>34</b> |
| A- DISCUSSIONS SUR LES EFFETS DE LA BACTERISATION EN FONCTION DES<br>TRAITEMENTS ..... | 35        |
| B- CONCLUSION .....  | 36        |
| C- PERSPECTIVES .....  | 37        |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....  | 38        |
| ANNEXES  |           |
| ABSTRACT   |           |
| RESUME   |           |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Résumé de l'analyse de la variance.....  | 23 |
| Tableau 2 : Tableau montrant l'effet de la bactérisation sur le nombre de graines dans 100 g de poids (serre ; champ).....                 | 30 |
| Tableau 3 : Tableau montrant l'effet de la bactérisation par l' <i>Azospirillum sp</i> sur le rendement du riz (serre ; champ).....        | 31 |
| Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets de la bactérisation par l' <i>Azospirillum sp</i> sur le NT, LFP, NGF... (serre ; champ)..... | 33 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Exemple de stades de croissance du riz.....   | 8  |
| Figure 2 : Photo de l' <i>Azospirillum sp</i> .....  | 15 |
| Figure 3 : Phase de maturation des graines de la variété X265 avec le système SRI.....   | 16 |
| Figure 4 : Racine d'une touffe de riz.....   | 16 |
| Figure 5 : Photos de l'expérimentation en serre (IP, TP) pendant la phase végétative ....  | 20 |
| Figure 6 : Photos de l'expérimentation en serre (INP, TNP) pendant la phase végétative .....   | 20 |
| Figure 7 : Dispositif expérimental au champ.....   | 21 |
| Figure 8 : Effet de la bactérisation du riz par l' <i>Azospirillum sp</i> sur le nombre de talles par pied (serre ; champ).....                | 27 |
| Figure 9 : Effet de la bactérisation du riz par l' <i>Azospirillum sp</i> sur la longueur de feuilles paniculaires (serre ; champ).....        | 28 |
| Figure 10 : Photos de l'expérimentation au champ (TP,IP).....  | 28 |
| Figure 11 : Photos de l'expérimentation au champ (INP, TNP).....   | 28 |
| Figure 12 : Effet de la bactérisation du riz par l' <i>Azospirillum sp</i> sur le nombre de graines fertiles par panicule (serre ; champ)..... | 29 |

## Liste des annexes

|   |  |
|---|--|
| Annexe I : Composition des milieux utilisés   |  |
| Annexe II : Tableau montrant les effets de la bactérisation par l' <i>Azospirillum sp</i> suivant le stade d'évolution du riz |  |
| Annexe III : Tableau récapitulant les composantes de rendement du riz   |  |
| Annexe IV : Analyses statistiques des données   |  |
| Annexe V : Caractéristiques d' <i>Oryza sativa</i> , variétés Mailaka et Mahefa   |  |
| Annexe VI : Nombre de colonies d' <i>Azospirillum sp</i> dans les boîtes de pétri choisies                                    |  |

### Liste des abréviations

IRRI : International Rice Research Institute

SCV : Sous Couverture Végétale

SRI : Système de Riziculture Intensive

ESSA : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques

EDS : eau distillée stérile

YEM : Yeast Extract Mannitol

NT : nombre de talles

LFP : longueur de feuilles paniculaires

NGF : nombre de graines fertiles

GP : graines pleines

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

FOFIFA : Foibe Fikarohana ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra (Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural)

N : Azote

Na : Sodium

°C : degré Celsius

g : gramme

kg : kilogramme

ml : millilitre

cm : centimètre

l : litre

ha : hectare

qsp : quantité suffisante pour

m<sup>2</sup> : mètre carré

BM : Bleu de méthylène

RN : Rouge Neutre

min : minute

jrs : jours

BNF : Biologic Nitrogen Fixation (Fixation Biologique de l'Azote)

$K_2HPO_4$  : Diphosphate de Potassium

$KH_2PO_4$  : Monophosphate de Potassium

$Mg SO_4 7H_2O$  : Heptahydrate de Sulfate de Magnésium

NaCl : Chlorure de Sodium

$FeCl_3$  : Chlorure Ferreux

$Na_2MoO_4,2H_2O$  : Molybdate de Sodium

$H_2O$  : eau

$CaCl_2$  : Chlorure de Calcium

$NH_3$  : Ammoniac gaz

### Glossaire

Protiste : une subdivision ou un règne chez les Eucaryotes

Nitrogénase : enzyme responsable de la fixation biologique de l'azote atmosphérique

Rhizosphère : la zone du sol aux alentours immédiats des racines avec sa population microbienne

Hétérotrophe : êtres vivants qui sont incapables de fabriquer les matières organiques

Procaryotes : organisme unicellulaire dépourvu de noyau

Eucaryotes : organisme qui possède un noyau bien différencié, un cytoplasme à structure réticulaire pourvu d'organites (mitochondries, appareil de Golgi)

Inoculum : préparation sous forme liquide contenant la souche utilisée

Touffe : assemblage de talles du riz

Effective : donnants des effets positifs

# INTRODUCTION

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains microorganismes utilisent l'azote moléculaire en le réduisant en ammoniac grâce à une enzyme, la nitrogénase. Les microorganismes fixateurs d'azote sont des bactéries et des cyanobactéries qui vivent en général, soit à l'état libre dans le sol, soit en association ou en symbiose avec une plante.

L'azote est l'un des facteurs limitants les plus fréquents de la production du riz.

Bien que les réserves en azote moléculaire ( $N_2$ ) soient énormes, seules les formes minérales  $NH_4^+$  et  $NO_3^-$  sont assimilables par la plante (riz). La fixation biologique de l'azote est donc un atout pour le riz afin de faciliter un maximum d'absorption d'azote (NIELSEN, 1997).

Le riz constitue la plante alimentaire la plus importante du monde, nourrissant plus de la moitié de la population du globe (YOBOUE, 1986). L'analyse de la distribution de la production révèle que les rendements les plus faibles se rencontrent dans les pays tropicaux les moins développés qui comptent surtout parmi les plus gros consommateurs de cette denrée (2 t/ha).

A Madagascar, devant la croissance démographique qui évolue de l'ordre de 70% (ANDRIANJAKA, 2001), le riz qui est l'alimentation de base de la population s'avère insuffisant. Pour cette raison l'état est amené à importer une quantité de plus en plus importante de riz blanchi allant jusqu'à 200.000 t/an (RAHARISON, 1996).

Face à ces problèmes, certaines techniques sont utilisées pour l'amélioration de la production rizicole peuvent être utilisées afin de satisfaire les besoins alimentaires. Parmi ces techniques, le système de riziculture intensive ou S.R.I. est le plus adéquat aux conditions économiques des paysans malgaches et peut donner un surplus de production grâce à l'existence de bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère à savoir les *Azospirillum sp.* En effet, le S.R.I est l'une de technique pour obtenir les *Azospirillum sp* au niveau de racines.

Dans le laboratoire de Biotechnologie en amélioration de plantes (Université d'Antananarivo), de nombreuses études ont été déjà réalisées sur l'amélioration du rendement de riz pluvial. Elles ont été, en général, concentrées sur d'autres domaines (exemple : androgénèse, influençant la réponse en culture d'anthères, ...).

La présente étude nous permet de montrer l'avantage sur le transfert de la technique du SRI vers la riziculture pluviale, essentiellement l'utilisation des souches spécifiques comme l'*Azospirillum sp* (LADHA et REDDY, 2000) capable de mettre en solution des

éléments nutritifs ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), et qui pourrait amener à une augmentation de la productivité.

Notre étude a comme objectif général l'amélioration de la nutrition azotée du riz pluvial c'est-à-dire diminution de l'emploi de fertilisant tout en augmentant la productivité par l'application de la biotechnologie.

Nos objectifs spécifiques consistent à :

- trouver une solution au manque d'azote par exploitation des potentialités du riz à se nourrir par la fixation biologique de l'azote atmosphérique,
- optimiser la nutrition minérale du riz pluvial par le système de culture « Sous Couverture Végétale »,
- obtenir des inoculum de la souche d'*Azospirillum sp.*

Pour ce faire, notre travail est divisé en quatre parties distinctes :

- la première partie : généralités,
- la deuxième partie : les matériels et méthodes,
- la troisième partie : les résultats et interprétations,
- la quatrième et dernière partie : discussions, conclusion, et perspectives.

## Première partie : GENERALITES

## A- GENERALITES SUR LE RIZ

### I- Aperçu général sur la culture du riz dans le monde (IRRI Rice Almanac, 1997)

Le riz, tient une place non négligeable dans l'économie de nombreux pays tels que la Chine, le Japon, les Philippines, Madagascar.

Beaucoup de recherches ont déjà été effectuées en matière de riziculture en vue d'améliorer la productivité du riz tout en essayant de contrôler les facteurs intervenant dans l'élaboration du rendement.

A la tête de celles-ci se trouve une conduite culturale qui aide le riz à donner son maximum de production (gestion de l'eau, fertilisation, densité de plantation, contrôle des mauvaises herbes, contrôle phytosanitaire, âge de repiquage etc. ...) et de même les recherches variétales basées sur la génétique qui ne cessent de se perfectionner en quête de souches plus performantes (très productives, résistantes aux maladies).

Recherche  
↳ mise au pt de i+k ?  
↳ ————— variété

### II- Systématique du riz

Le riz appartient au :

- Règne : VEGETAL
- Embranchement : SPERMAPHYTES
- Sous- embranchement : ANGIOSPERMES
- Classe : LILIOPSIDA
- Sous- classe : COMMELINIDAE
- Ordre : POALES
- Famille : POACEAE
- Sous-famille : POOIDEAE
- Tribu : ORYZAE
- Genre : *Oryza*
- Espèce : *sativa*
- Sous-espèce : japonica
- Variétés : FOFIFA 161, X265

### III- La physiologie du riz

La connaissance de la physiologie du riz est l'élément scientifique commun de départ de toute proposition d'amélioration des performances techniques et économiques des riziculteurs. Combinée aux pratiques en cours et aux conditions de production, elle apporte une bonne évaluation des méthodes actuelles.

Au cours de son développement, le riz présente deux stades bien distincts (ANDRIANJAKA, 2001) :

- le stade végétatif au cours duquel le riz constituera son appareil végétatif (racines, tiges, feuilles) ;
- le stade reproducteur pendant lequel le plant de riz met en place les organes de réserves qui donneront les graines.

Ces deux stades (végétatif, reproducteur) sont la base de l'élaboration du rendement.

En principe, la durée du stade reproducteur reste toujours la même pour les différentes variétés de riz et pour les différentes techniques de production mais la différence réside surtout au niveau de la phase végétative (YOSHIDA, 1985).

#### 1- Stade végétatif

Le stade végétatif comprend différentes phases qui vont de la levée à la fin du tallage.

##### 1-1- La levée

Cette étape commence par l'émergence du coléoptile hors de la surface de la terre (pépinière en milieu exondé) ou de l'eau (submergé). De ce fait, la levée succède directement à la période de germination.

La germination est favorisée par la température et l'humidité mais elle n'est pas influencée par la lumière (température 10 °C à 40 °C, humidité suffisante).

##### 1-2- Le stade plantulaire

C'est la période suivant la levée jusqu'à la formation de la cinquième feuille. Ce stade peut durer de 20 à 25 jours à compter de la date de semis.

### 1-3- Le tallage

Le tallage correspond au phénomène qui permet aux entre-nœuds situés à la base des plants de donner des talles secondaires, leur formation se déroule de façon concentrique et suivant une direction centrifuge. Chaque talle formée devient par la suite génératrice d'autres talles (VALLOIS, 2000).

### 2- Stade reproducteur

Ce stade débute au moment de l'initiation paniculaire et comprend différentes phases (figure1) :

- l'initiation paniculaire,
- la montaison,
- l'épiaison,
- la floraison,
- et la maturation de graines.

L'**initiation paniculaire** commence par la formation de l'ébauche de la panicule au niveau du nœud supérieur du talle, qui est difficile à reconnaître à l'œil nu, seules des observations microscopiques permettent d'identifier les primordia paniculaires.

La **montaison** est caractérisée par le gonflement de la tige par la suite de la formation et de la migration des organes de réserves. Elle marque également un changement dans le mode de gestion de l'eau.

L'**épiaison** est l'émergence de la panicule hors de la gaine. Elle est assimilée à l'émergence de la moitié des panicules et s'effectue pendant une période de 10 à 14 jours, variable suivant la vitesse d'émergence des panicules et le nombre des plants. Elle exige une moyenne de température de 22 °C.

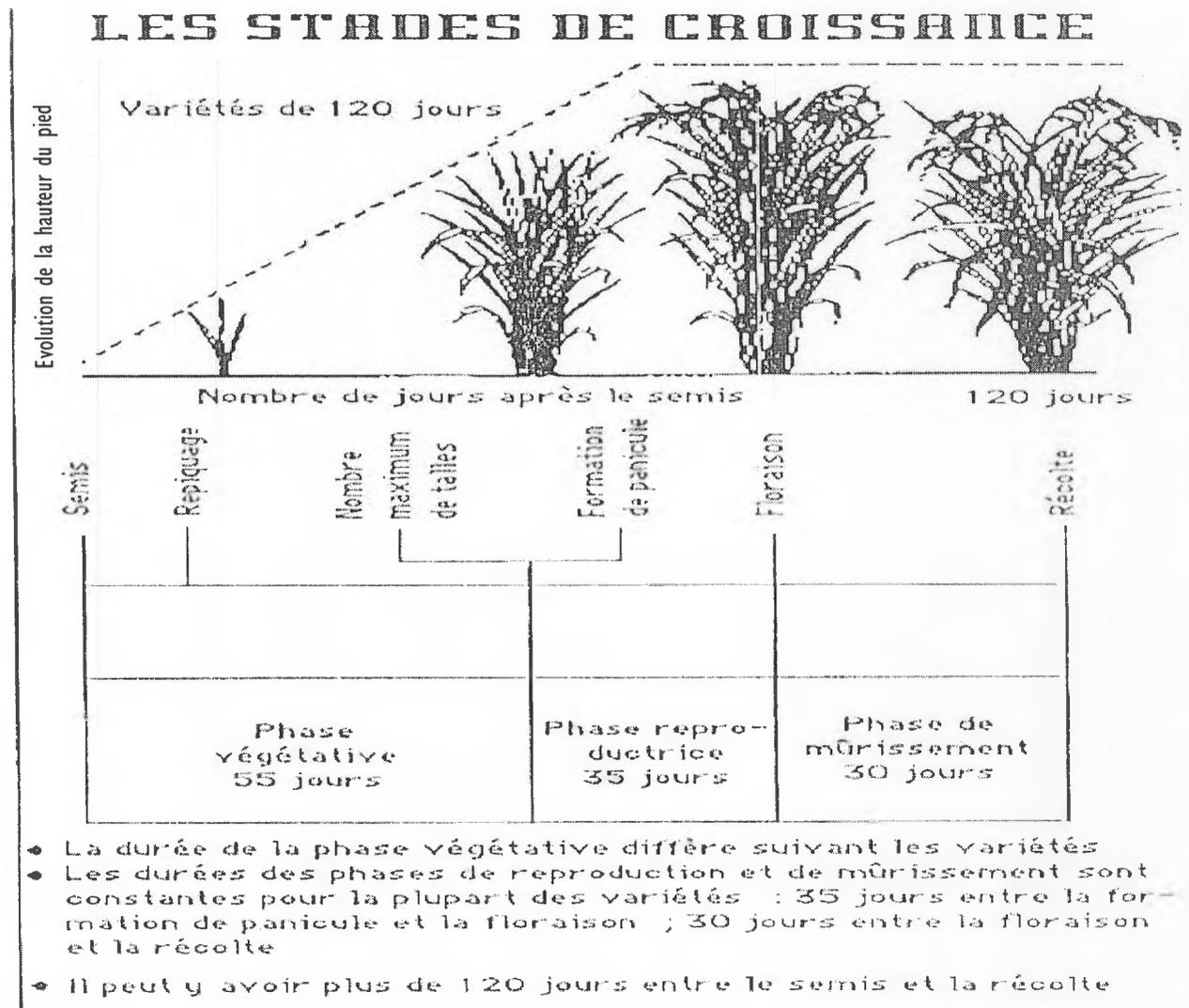
De l'initiation paniculaire à l'épiaison, il faut compter en général 30 jours (YOSHIDA, 1981). Au cours de la **floraison** s'effectue l'anthèse, les glumelles s'écartent, permettant la sortie des étamines. L'anthère s'ouvre, la pollinisation s'effectue durant les heures qui suivent. Puis les glumelles se referment laissant les étamines à l'extérieur où elles se dessèchent et tombent.

Au sein d'une panicule, l'anthèse dure 7 à 10 jours.

En région tropicale, l'anthèse a lieu entre 8 h et 13 h (ANDRIANJAKA, 2001).

Pendant la phase de **maturation**, les graines se remplissent de substances de réserves et acquièrent leur maturité en passant du stade laiteux (graine remplie de substance aqueuse incolore) au stade pâteux (graine remplie de pâte molle) et enfin au stade mûr (graine pleine et résistante).

La maturation des graines dure environ 30 jours (YOSHIDA, 1981) et elle est identifiable au jaunissement de l'extrémité de la feuille paniculaire.



**Figure 1** : Exemple de stades de croissance du riz (YOSHIDA, 1981)

## B- L'AZOTE ET LE RIZ

L'Azote, du grec « zôê » qui signifie vie, est un élément indispensable à la croissance et à la vie des plantes. Il fait partie intégrante de la matière vivante (BALANDREAU, 1975).

Chez la plante, l'azote forme 1% à 4% de son poids sec. Cette teneur varie en fonction de l'organe végétatif, de l'âge des plantes et de l'espèce végétale. Les feuilles, les tissus jeunes, les plantes fixatrices d'azote en sont les plus riches (FLORENZANO, 1966)

L'élément azote (N) peut se présenter sous trois formes :

- minérale (azote nitrique),
- protidique dans les chloroplastes des feuilles et dans les graines,
- soluble dans les composées aminées et amides des organes de réserves.

Dans la nature, l'azote se rencontre soit à l'état libre sous forme gazeuse ( $N_2$ ) soit à l'état combiné sous forme d'azote organique ou minérale.

### **I- Rôles de l'azote sur le riz**

L'azote constitue un élément principal de la croissance du riz. Avec les éléments fondamentaux C, H, O, il joue un rôle capital dans les mécanismes vitaux. Il assure principalement :

- une croissance rapide des organes végétatifs,
- une activité photosynthétique intense qui se traduit par une production abondante de matières sèches,
- la formation des organes reproducteurs et la composition d'un haut rendement,
- une amélioration de la valeur nutritive du riz par l'accroissement du taux de protéines des graines.

### **II- Nutrition azotée du riz**

La nutrition azotée du riz s'exerce en deux étapes successives (RAJAOMILISON, 2003) :

- de la germination jusqu'au stade de deux feuilles, le jeune plant de riz se nourrit exclusivement des réserves des graines, qui sont essentiellement les protéines,
- de la formation de la troisième feuille à la fructification, le plant de riz subvient à ses propres besoins et il se nourrit à partir de son milieu. C'est la phase déterminante du cycle de riz pendant laquelle il montre des exigences de plus en plus importantes en azote.

longe phase

### III- Azote dans le sol

La teneur en azote total dans le sol varie de 0,01 à 0,5% et autour de 0,1% pour les terres cultivées. Mais cette quantité n'est pas entièrement assimilable et utilisée par la plante.

En effet, l'azote sous forme protidique et l'azote organique stable comme l'humus ne sont pas directement assimilables.

L'azote du sol peut donc se présenter à l'état gazeux, minéral ou organique. Les formes minérales et organiques majoritaires jouent un rôle capital dans la nutrition des plantes : l'azote organique assure le stock, tandis que l'azote minéral constitue la forme d'absorption (BALANDREAU, 1983 ; MOROT et al 1997-1998).

- L'azote organique provient de la décomposition de la matière organique du sol par le processus d'humification.

Ce processus de formation des complexes colloïdaux se déroule dans la couche superficielle du sol où l'azote organique est représenté par 95% de l'azote total.

- L'azote minéral qui se présente sous deux formes :
  - l'azote ammoniacal, produit par l'ammonification de l'azote organique. Il peut être absorbé sur le complexe adsorbant donc à l'état échangeable.

Dissout dans la solution du sol ou à l'état fixe, il peut passer d'un état à un autre selon la réaction d'équilibre suivante :



- l'azote nitrique issu de la nitrification de l'azote ammoniacal sous certaines conditions écologiques.

Il est très mobile dans le sol et très soluble dans l'eau, peut être perdu par lessivage ou par dénitrification.

*Absorpt° de l'N par le riz*

## C- GENERALITES SUR LE SYSTEME DE RIZICULTURE INTENSIVE ou SRI

### I- Historique

Le SRI a été découvert par hasard en 1983-1984 par le Père Henri de LAULANIE, à Antsirabe.

Depuis, les recherches d'explication et de perfectionnement de la technique n'ont cessé de progresser (NORMAN, 2002 ; RANDRIAMIHARISOA, 2002).

Ainsi, en 1990, le SRI fut introduit chez les paysans et deux ans plus tard, il a été reconnu par le gouvernement malgache. Il est diffusé partout dans l'île. En 1994, le système, grâce à la collaboration de l'Université de Cornell (Yathaca, New York) est porté à l'échelle internationale.

Parmi les nombreux pays intéressés, certains se lancent déjà actuellement dans cette voie, et l'année dernière, le SRI vient d'être reconnu par le plus grand Institut International travaillant sur le riz l'IRRI (International Rice Research Institute, Philippines)

## **II- Les facteurs responsables du haut rendement en SRI**

Les résultats de recherches réalisés auparavant (ANDRIANJAKA, 2001 ; RALIJAONA 2002) nous permettent de dire que les facteurs intervenant dans l'amélioration du rendement par SRI avec leurs importances respectives : le repiquage à un brin de jeunes plants âgés de 8 à 12 jours, l'écartement des plants dans un modèle de 30 cm × 30 cm, le sarclage répété, la parfaite maîtrise d'eau,...

STEWART (1977) et HAMDI (1982) ont aussi signalé l'existence de différentes sortes de microorganismes résidant dans la rhizosphère ou à l'intérieur même des racines qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

## **D- LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE ou BNF**

La BNF correspond à la réduction de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) en ammoniacque par les microorganismes (libres, associatifs, ou symbiotiques) selon une réaction catalysée par un complexe enzymatique appelé « nitrogénase ». Sur cette transformation, deux protons sont réduits en hydrogène qui s'effectue simultanément d'où la réaction (GILLER, 1993 ; PARAKARN, 2003):  $N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$

## **E- LA BACTERIE : *Azospirillum sp***

### **I- Mode d'action de l'*Azospirillum sp***

Comme tous les microorganismes fixateurs d'azote, l'*Azospirillum sp* est capable de réduire l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) en azote assimilable grâce à l'enzyme « nitrogénase ». Il augmente les composés azotés (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en stimulant l'activité nitrogénasique.

En plus, d'après NICOLAS (1977), l'*Azospirillum sp* transfère l'azote métabolisable vers la plante grâce à des enzymes, par exemple : la pectinase ..., qui peuvent digérer certains composants de la paroi des cellules végétales. } mel

L'*Azospirillum sp* peut produire des hormones végétales comme : l'AIA (Acide Indol Acétique) qui amplifie le développement des racines (le développement racinaire améliore la prise d'eau et des éléments minéraux) ; les gibbérellines (GA<sub>3</sub>) qui provoquent l'allongement des entre-nœuds, accélèrent la floraison ; la cytokinine qui entraîne la multiplication des bourgeons.

Les études qui ont été faites auparavant ont montré que l'*Azospirillum sp* peut produire de l'éthylène qui accélère la maturité des graines.

## II- Les différentes espèces d'*Azospirillum*

L'*Azospirillum* est l'un des microorganismes isolés dans la rhizosphère du riz (GAUTHIER, 1977). Il est largement répandu non seulement dans les rizières mais aussi dans la rhizosphère de plusieurs espèces de graminées tropicales et tempérées telles que le blé, le maïs, le mil.

Parmi les espèces, nous pouvons citer :

- *Azospirillum lipoferum*,
- *Azospirillum brasilense*,
- *Azospirillum amazonense*,
- *Azospirillum irakense*,
- *Azospirillum halopraeferens*.

L'espèce *Azospirillum halopraeferens* n'est rencontrée que dans des sols salés, les quatre autres ont pu être découvertes dans la rhizosphère du riz.

Les espèces *Azospirillum lipoferum* et *Azospirillum brasilense* ont été isolées à partir des racines et des tiges de riz (LADHA et REDDY, 2000 ; DOMMELEN, 1998). Ces espèces possèdent des caractères similaires et elles se trouvent souvent ensemble.

L'espèce *Azospirillum amazonense* a été rencontrée plus rarement, avec un taux de présence dans le sol de 39 à 41%, isolée à partir des racines de riz (PEREIRA et al, 1988 ; LADHA et REDDY, 2000 ; FABIANO et CARDONA, 1985).

L'espèce *Azospirillum irakense* a été rencontrée dans la rhizosphère et à l'intérieur des racines du riz. Elle est capable de coloniser les cellules de l'épiderme des racines (KHAMMAS et al, 1989, cités par LADHA et REDDY, 2000).

Deuxième partie :  
MATERIELS ET METHODES

## A- MATERIEL BIOLOGIQUE

### I- Caractéristiques des variétés de riz utilisées

Deux variétés de riz *Oryza sativa*, sous-espèce *japonica* ont été utilisées pour cette étude à savoir les variétés X 265 et FOFIFA 161. Elles appartiennent à la famille des Poaceae. Les graines de X265 proviennent du Département de Recherches Rizicoles Tsimbazaza et la FOFIFA 161 de l'URP SCRID MADAGASCAR.

#### 1- Variété X 265 (FOFIFA)

La variété X 265 est la variété adaptée à la culture irriguée, de nom malgache « Mailaka », en provenance de Philippines. Elle est cultivée dans les régions des Hautes Terres avec le maximum de rendement de 9,5 t/ ha et résistante au *Pyricularia* (ANNEXE V).

Cette variété a été choisie pour le SRI afin d'en extraire les souches d'*Azospirillum sp* à partir de ces racines. Lors de la première campagne les *Azospirillum sp* seront utilisés pour l'inoculation du riz pluvial lors d'une deuxième campagne.

#### 2-Variété FOFIFA 161

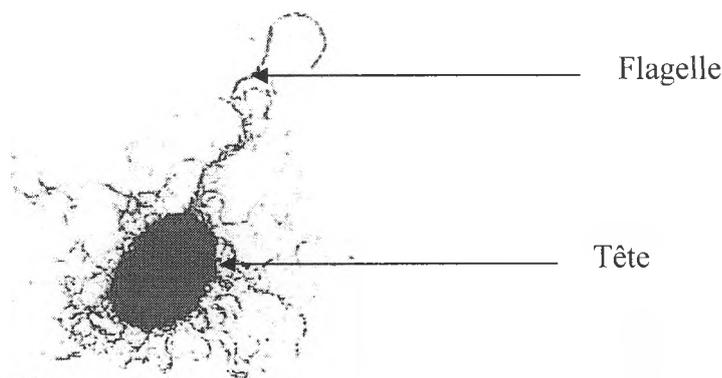
La variété FOFIFA 161 est une variété hybride de l'IRAT 114 et du FOFIFA 133. Elle est connue pour sa forte adaptation à la culture pluviale à raison de 6,6 t/ ha de rendement. Elle est rustique, résiste à la verse, tolère la pyriculariose (ANNEXE V).

Les graines de FOFIFA 161 ont servi de matériels pour la bactérisation ou l'inoculation avec les *Azospirillum sp*.

### II- *Azospirillum sp*

Les *Azospirillum sp* sont les bactéries qui prédominent dans la rhizosphère du riz sous SRI et qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Ils appartiennent aux Protistes, sous règne des Procaryotes, au groupe des Eubactéries, et sous groupe des Protéobactéries (figure 2). C'est une bactérie gram négatif, un organisme microscopique unicellulaire, de forme ovoïdale, dotée d'une forte mobilité grâce à un flagelle polaire. C'est un organisme d'une

respiration aérobie facultative. Ces espèces sont sensibles aux basses températures (DÖBEREINER, 1987 ; BILAL et al, 1990 ; SINGLETON et al, 1984).



**Figure 2:** *Azospirillum sp*

**Source:** Central Research Institute for Food Crops (CRIFC) New England (1989)

Leur activité fixatrice est optimale entre 32 °C et 40 °C.

L'*Azospirillum sp* (DAY et DÖBEREINER, 1976) préfère les milieux à pH neutre ou légèrement basique.

C'est une bactérie hétérotrophe typique qui se nourrit aux dépens des réactions d'oxydo-réduction et qui appartient aux groupes fixateurs associatifs d'azote en étroite association avec les racines du riz et s'installe autour des racines.

Comme source d'énergie, l'*Azospirillum sp* utilise les carbones provenant des exsudats et des débris racinaires. Elle peut fixer 55 à 70 kg / ha d'azote (LADHA et al 1998).

## **B- PREPARATION DE L'INOCULUM**

L'inoculum est la préparation sous forme liquide contenant la souche utilisée c'est-à-dire les *Azospirillum sp*. Ainsi, la souche sélectionnée doit être effective c'est-à-dire compétitive et dotée d'une forte capacité de survie dans le sol afin de pouvoir affronter les contraintes naturelles du milieu. L'inoculum est ensuite réutilisé comme inoculant des graines du riz pluvial FOFIFA 161.

### **I- Préparation d'extraits de racines de riz**

Les *Azospirillum sp* sont extraites à partir de racines de plantes de riz cultivées selon le système de culture SRI. Dix touffes de riz avec le maximum de talles (35 à 57 talles) et au

stade de maturation des graines ont été prélevées (figure 3). Les racines ont été lavées avec l'eau de robinet, puis avec de l'eau distillée stérile (figure 4). Elles ont été ensuite découpées en petits morceaux. 5 g de ces morceaux sont broyés avec le mortier bien lavé, versés dans la fiole jaugée qui contient 50 ml d'eau distillée stérile (EDS) et un barreau aimanté, passés sur l'agitateur magnétique pour bien les mélanger. Cette solution est dénommée T0.



**Figure 3 :** Phase de maturation des graines de la variété X265 avec le système SRI



**Figure 4:** Racine d'une touffe de riz

## **II- Isolement et purification des souches d'*Azospirillum sp***

Pour l'isolement et la purification de la souche d'*Azospirillum sp*, le milieu DÖBEREINER a été utilisé ; il possède des propriétés spécifiques constituant des substances essentielles, nécessaires au développement normal de cette bactérie tout en détruisant les autres microbes indésirables (DÖBEREINER, 1976).

Ce milieu est composé de :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{NaCl}$ ,  $\text{FeCl}_3$  ;  $\text{NaMoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  ; glucose (ANNEXE I).

Ensuite, nous avons adopté une série de dilution, c'est-à-dire dilution en cascade de concentration  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ , dans le but de connaître la quantité de bactéries contenues dans chaque inoculum. A 9 ml d'EDS, 1 ml de solution T0 a été ajoutée pour donner la concentration  $10^{-1}$  ; puis à 1ml de cette dernière ( $10^{-1}$ ) est ajoutée 9 ml d'EDS pour donner la concentration  $10^{-2}$  et ainsi de suite jusqu'à la concentration  $10^{-9}$ .

Chaque préparation a été mise dans 9 tubes à essai et quelques gouttes de chaque dilution sont mises dans 9 boîtes de Pétri (correspondant à chaque dilution) contenant le milieu DÖBEREINER sous forme solide. Ces dernières sont étalées avec un racloir sur toute la

surface pour bien isoler les colonies. Les boîtes sont scellées avec du parafilm et portées à l'incubateur maintenu à 28 °C jusqu'à ce que les colonies bactériennes apparaissent.

### **III- Méthodes d'observation**

#### **1- Observation macroscopique**

Après quelques jours (4 à 10 jours) d'incubation à 28 °C, les colonies bactériennes sont apparues. Et pour chaque dilution, les colonies ont été observées selon leur forme, couleur, transparence, relief et taille.

#### **2- Observations microscopiques**

##### **2-1- Observation à l'état frais**

Les colonies bactériennes ont été observées à l'état frais, c'est-à-dire sans colorant, pour la mobilité de l' *Azospirillum sp.*

##### **2-2- Observation après coloration**

Les colorants utilisés sont le bleu de méthylène (BM) ou le rouge neutre (RN).

Pour une meilleure observation, trois étapes ont été considérées : **Etalement-Fixation-Coloration**

- **L'étalement** : les lames ont été nettoyées avec l'alcool à 90 °C. L'anse est placée juste au dessus de la flamme bleue du bec Bunsen, le fil maintenu vertical, puis elle est refroidie.

Pour le prélèvement, l'anse est posée sur la colonie bactérienne se trouvant dans une boîte de Pétri choisie. Ce choix est fait selon le nombre et la quantité des colonies bactériennes. Puis l'anse est transférée au centre de la lame numérotée pour bien identifier les différentes colonies dans les différentes boîtes de Pétri.

L'anse est tournée en stries ovales de plus en plus grandes. Un espace libre doit être laissé sur les 4 côtés de la lame, enfin la lame est séchée à l'air.

- **La fixation** : la lame est passée trois fois dans la flamme d'un bec Bunsen très rapidement, le côté de l'étalement étant tourné vers la face supérieure.

○ **La coloration :**

- le bleu de méthylène (BM) colore toutes les bactéries en bleu et permet de bien voir leur forme.
- le rouge neutre (RN) colore aussi toutes les bactéries en rose (pour vérification).

Après la fixation, la lame doit être recouverte par le bleu de méthylène (BM), ou du rouge neutre (RN) en laissant agir une minute et elle est rincée à l'EDS puis séchée.

Après toutes ces étapes, l'observation au microscope optique est effectuée.

#### **IV- Multiplication des souches**

La multiplication des souches d'*Azospirillum sp* a pour but d'avoir une quantité suffisante pour l'expérimentation.

##### **1- Production de l'inoculum liquide**

La souche d'*Azospirillum sp* estensemencée dans l'erenmeyer de 500 ml contenant du milieu liquide YEM (RANDRIAMBOLOLONA, 2002) composé de : Mannitol ;  $K_2HPO_4$  ; Glutamate de Sodium ; NaCl ;  $MgSO_4, 7H_2O$  à une concentration de 10g/l ;  $CaCl_2$  à 40g/l ;  $FeCl_3, 6H_2O$  à 4g/l, extrait de levure (ANNEXE I). Ce dernier est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

##### **2- Technique de production de l'inoculum liquide**

La technique est la suivante : 5 ml d'eau distillée stérile sont versées dans les différentes boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé de DÖBEREINER et les colonies bactériennes provenant des solutions pour les dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ . (RANDRIAMBOLOLONA, 2002). Les colonies bactériennes sont détachées avec une Öse stérilisée à la flamme du bec Bunsen puis refroidie. Les boîtes sont agitées pendant une dizaine de secondes. A l'aide d'une pipette stérile, les suspensions bactériennes de ces trois boîtes de Pétri sont transvasées dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu YEM liquide. Puis l'inoculum liquide, une fois bien agité, est incubé à 30 °C pendant 72 h à l'étuve pour que les bactéries se multiplient bien. Après 72 h, le nombre de bactéries c'est-à-dire le nombre d'*Azospirillum sp* est évalué.

## V- Dénombrement des colonies bactériennes

La méthode de suspension - dilution a été utilisée (BEUNARD, 1983).

Une série de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$  a été préparée comme suit :

- 1 ml de l'inoculum liquide + 9 ml d'EDS =  $10^{-1}$
- 1 ml de la solution  $10^{-1}$  + 9 ml d'EDS =  $10^{-2}$  et ainsi de suite jusqu'à  $10^{-9}$

Les différentes dilutions sont réparties dans 9 tubes à essai bien stériles.

Après homogénéisation de la solution contenue dans chaque tube, 1 ml de chaque dilution a été versé dans 9 boîtes de Pétri différentes qui contiennent le milieu YEM avec agar, c'est-à-dire sous forme solide. Les boîtes, une fois recouvertes et scellées, sont incubées à 30 °C pendant 72 h dans l'étuve.

Le nombre d'*Azospirillum sp* contenu dans 1 ml d'inoculum de départ peut être déduit en multipliant le facteur de dilution correspondant avec le nombre de colonies formées suivant la formule :

$$N = n / d$$

Avec : N=nombre d'*Azospirillum sp* par millilitre de suspension

n= nombre de colonies comptées

d= dilution

Toutes les manipulations (isolement, purification, multiplication, dénombrement) ont été faites en milieu stérile à proximité d'un bec Bunsen sous une hotte à flux laminaire. Et tout le matériel utilisé (verreries...) est stérilisé avant leur utilisation à l'autoclave pendant 20 min, à 120 °C.

## C- Evaluation de l'inoculation ou bactérisation

L'inoculation ou bactérisation consiste à introduire dans le sol des souches de bactéries ciblées (FAGES et al, 1992). Deux modes d'inoculation peuvent être adoptés : l'inoculation indirecte où l'inoculum est appliqué au sol et l'inoculation directe qui consiste à imbiber les graines de riz avant leur semis avec l'inoculum. Cette dernière a été pratiquée.

Les graines qui n'ont pas été inoculées constituent les témoins.

## 1- Technique d'inoculation

### 1-1- Expérimentation en serre

Les graines adaptées au riz pluvial FOFIFA 161 ont été utilisées.

D'abord, les graines bien saines et pleines sont passées à l'étuve à une température de 52 °C pendant 3 jours pour lever la dormance. Puis 10 g de ces graines ont été imbibées par 5 ml de l'inoculum liquide : ce sont les graines traitées (inoculées) (DÖBEREINER, 1976 ; ANDRIANJAKA, 2001 ; RANDRIAMBOLOLONA, 2002). D'autres graines bien pleines (10g) ont été imbibées par 5 ml d'eau de robinet et qui vont servir de témoins.

Puis, 10 g de graines traitées (inoculées par l'inoculum liquide) ou non inoculées (témoins) ont été déposées dans différents sachets plastiques soigneusement lavés de couleur sombre, bien fermés, selon la dose de l'inoculum liquide ou de l'eau de robinet. Ces sachets sont mis à l'étuve pendant 36 h à 30 °C.

#### Dispositif expérimental

Pour la culture en serre, 16 pots (seau de 10 l) qui contiennent des sols de rizière, ont été utilisés. Ils sont troués à leur base pour l'évacuation d'eau en surplus pendant l'arrosage.

Les traitements sont réalisés comme suit :

- 10 pots contenaient des semences inoculées dont 5 pots paillés et 5 pots non paillés
- 6 pots contenaient de semences non inoculées ou témoins dont 3 pots paillés et 3 pots non paillés

Chaque pot contient un poquet avec 10 graines selon leur traitement (figures 5 et 6).

Notons que les pailles de riz sont découpées en petits morceaux d'environ 1cm de long.



**Figure 5 :** Expérimentation en serre (IP, TP) pendant la phase végétative

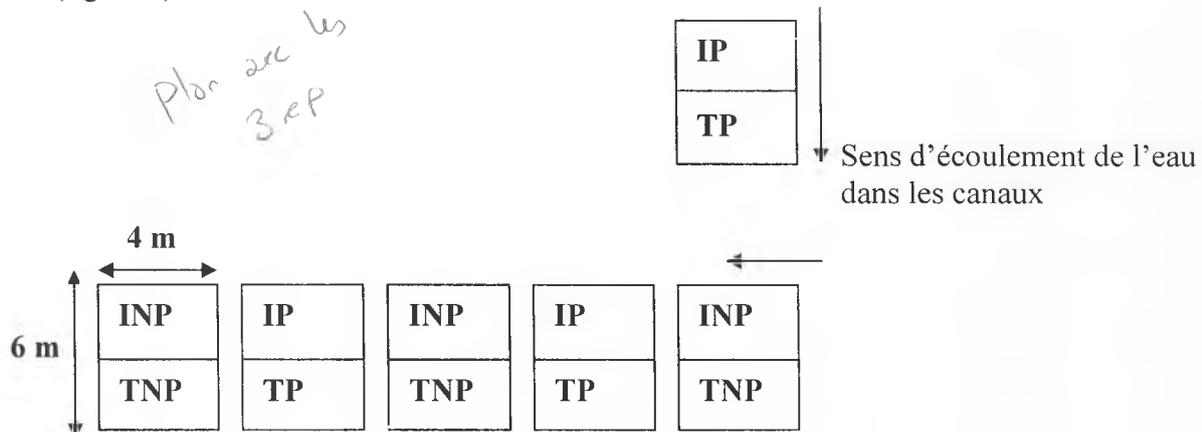


**Figure 6 :** Expérimentation en serre (INP, TNP) pendant la phase végétative

## 1-2- Expérimentation au champ *en irrigué?*

L'expérimentation est faite sur le terrain d'application de l'ESSA d'Antananarivo dont la surface totale utilisée est de 109,5 m<sup>2</sup>. ?  $6 \times 24 = 144 \text{ m}^2$  *c'est quoi?*

Le dispositif expérimental est une expérimentation disposée en parcelle vue le nombre important de traitements (6 parcelles de 24 m<sup>2</sup> de surface chacune) avec trois répétitions (figure 7).



TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

**Figure 7** : Dispositif expérimental au champ

Nous avons utilisé ici les mêmes semences. D'abord, les graines saines et bien remplies sont mises dans l'étuve à 52 °C pendant 3 jours pour lever la dormance. De même que précédemment :

- 200 g de graines bien pleines inoculées par 100 ml de l'inoculum liquide (traitées),
- 100 g de graines imbibées par 50 ml de l'eau de robinet (témoins).

Les différentes quantités de graines traitées sont enfermées dans des sachets plastiques sombres bien lavés. Ces derniers sont mis à l'étuve à 30 °C pendant 36 h.

### Repiquage *semis*

Après 36 h à l'étuve, les graines sont semées en poquet espacé de 30 cm de chaque côté ; 10 graines sont enfoncées jusqu'à une profondeur de 3 cm.

## 2- Observation directe et suivi

Un suivi de près est nécessaire en serre et au champ dans le but de :

- s'assurer du bon déroulement du cycle cultural afin d'intervenir immédiatement au cas où cela s'imposerait (exemple : constatation de l'évolution de couleur de feuillage, développement des organes reproducteurs,...)
- noter les faits et les détails susceptibles d'influencer ou d'agir sur les différents traitements (exemple : les dégâts causés par les cyclones, le rat,...).

## 3- Les caractères agronomiques étudiés

Afin d'évaluer les effets et les impacts des différents traitements sur la croissance et le développement des plants de riz, ainsi que le rendement certains caractères agronomiques ont été considérés en prenant leur moyenne. Pour cela 10 pieds de riz ont été prélevés sur une surface de 1 m<sup>2</sup> ciblée dans chaque parcelle avec trois répétitions pour chaque traitement. Il s'agit des moyennes :

- du nombre de talles par pied,
- de la longueur de feuilles paniculaires,
- du nombre de panicules,
- du nombre de graines pleines (fertiles)/ le nombre de graines stériles (vides) = nombre moyen des graines entièrement développées par panicule,
- du poids de 1000 graines et le nombre de graines dans 100 g de poids,
- et l'évaluation de rendement.

Ce dernier est exprimé en kg/ha d'après la formule (ANDRIANARISOA, 2004) :

$$R = \frac{N_{pa}/m^2 \times E/_{pa} \times \%GP \times P1000G}{10000}$$

Avec : **R** : rendement théorique en kg/ha

**N<sub>pa</sub>/m<sup>2</sup>** : nombre de panicules par mètre carré

**E/<sub>pa</sub>** : nombre d'épillets par panicule

**%GP** : pourcentage de graines pleines (fertiles) traduisant la capacité de production réelle

**P1000G** : poids de mille graines

#### 4- Analyse statistique

Nous avons choisi l'analyse de variance dans le but de déterminer la significativité entre les moyennes observées (tableau 1).

Les données de chaque expérience ont été analysées par le test de FISHER-SNEDECOR.

La significativité des différences a été considérée au seuil de probabilité 5%.

**Tableau 1** : Résumé de l'analyse de la variance

| (1)<br>Origine              | (2)<br>Somme des carrés des écarts | (3)<br>Nombre de degré de liberté | Variance<br>= (2)/ (3) | Test de FISHER-SNEDECOR |
|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Entre colonne               | $\sum(Ti^2/ni)-T_G^2/N$            | $c-1$                             | $S^2_1$                | $S^2_1/S^2_2$           |
| Intra colonne ou résiduelle | $\sum x^2 - \sum(Ti^2/ni)$         | $N-c$                             | $S^2_2$                |                         |
| Total                       | $\sum x^2 - T_G^2/N$               | $N-1$                             |                        |                         |

$c$  : nombre de colonnes

$ni$  : nombre de mesures dans les colonnes  $i$

$N$  : nombre total de mesures =  $\sum ni$

$Ti$  : total de mesures dans les colonnes  $i$

$T_G$  : total général des mesures =  $\sum Ti$

- La variance intra colonne  $S^2_2$  exprime la variance des mesures dans une colonne.
- La variance entre colonne exprime la variabilité d'une mesure d'une colonne à l'autre.
- $F$  désigne le rapport entre la variabilité d'une mesure à l'autre entre les diverses colonnes et la variabilité des mesures dans une même colonne.

Les moyennes diffèrent significativement dans leur ensemble au risque de 5% si  $F$  dépasse la limite  $F_{N-c}^{c-1}$  lue dans la table de  $F$  « point 5% » pour le degré de liberté  $(c-1)$  et  $(N-c)$ .

Si les valeurs sont significatives, on passe à la comparaison 2 à 2 des moyennes.

La variance de la moyenne du traitement est  $S^2_2 / c$ , la variance de la différence entre les moyennes de deux traitements est  $S^2_2 / c \times 2$ .

L'écart type est  $\sqrt{S^2_2 \times 2/c}$ .

La différence est significative si la différence de deux moyennes entre deux traitements est supérieure à  $t_\alpha \times \sqrt{S^2_2} \times 2/c$  qui est la plus petite différence significative (Ppds) où  $t_\alpha$  est donnée par la table de STUDENT au seuil de probabilité  $\alpha$  donné.

Le test est positif si  $F_c > F_t$ .

Avec :  $F_c$  : F calculé obtenu par l'analyse de variance

$F_t$  : F théorique dans la table F de Snedecor pour p (probabilité) = 0,05 dans le cas contraire ( $F_c < F_t$ ), le test est négatif.

Notons que quand le rapport F est inférieur à la limite donnée par les tables, qui est toujours supérieure à 1, nous pouvons donc conclure d'emblée que les moyennes ne diffèrent pas significativement.

Troisième partie :  
**RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

## **A- OBSERVATION MICROSCOPIQUE**

Dans un premier temps, la présence des bactéries a été observée au microscope grâce à leur mobilité. Les bactéries apparaissent en colonies de forme ronde, de couleur blanche cassée, de transparence translucide, de relief bombé et de taille moyenne.

Une fois identifiées, les bactéries sont mises en évidence par la technique étalement- fixation- coloration. A partir des différentes concentrations (dilutions) les boîtes de Pétri présentant le plus grand nombre de colonies bactériennes ont été sélectionnées.

La moyenne du nombre de colonies d'*Azospirillum sp* a été calculée pour les concentrations suivantes : 86 colonies dans la boîte contenant la solution de dilution  $10^{-6}$ , 34 colonies pour  $10^{-7}$  et 28 colonies pour  $10^{-8}$  (ANNEXE VI).

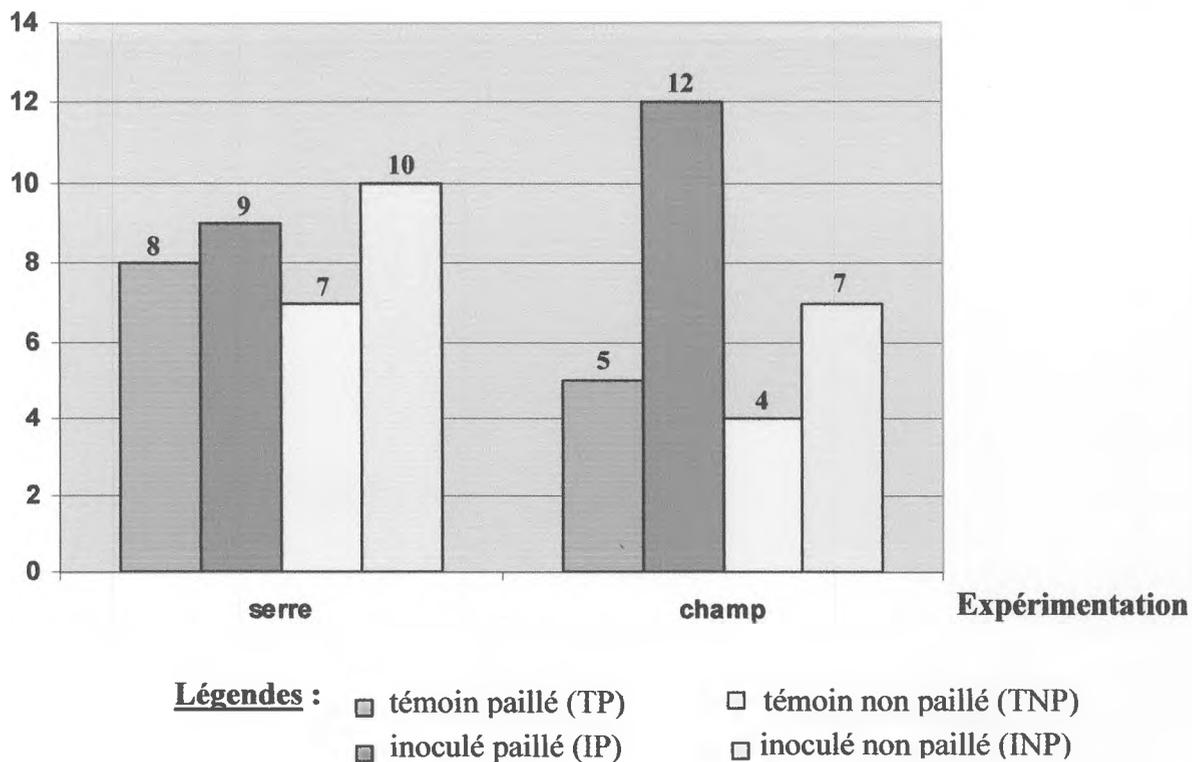
## **B- EFFETS DE LA BACTERISATION SUR LES PLANTS DE RIZ**

L'évaluation des résultats sur la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* est exprimée en fonction du nombre de talles par pied, de la longueur de feuilles paniculaires, du nombre de graines fertiles (pleines) par panicule du nombre de graines dans 100g de poids et du rendement du riz obtenu.

### **I- SUR LE NOMBRE DE TALLEES PAR PIED**

L'histogramme suivant (figure 8) montre l'effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur le nombre de talles par pied selon les différents traitements (TP, IP, TNP, INP). L'abscisse représente les deux expérimentations (serre, champ) et l'ordonnée le nombre de talles par pied.

## Nombre de talles par pied



**Figure 8 :** Effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur le nombre de talles par pied (culture en serre ; culture au champ).

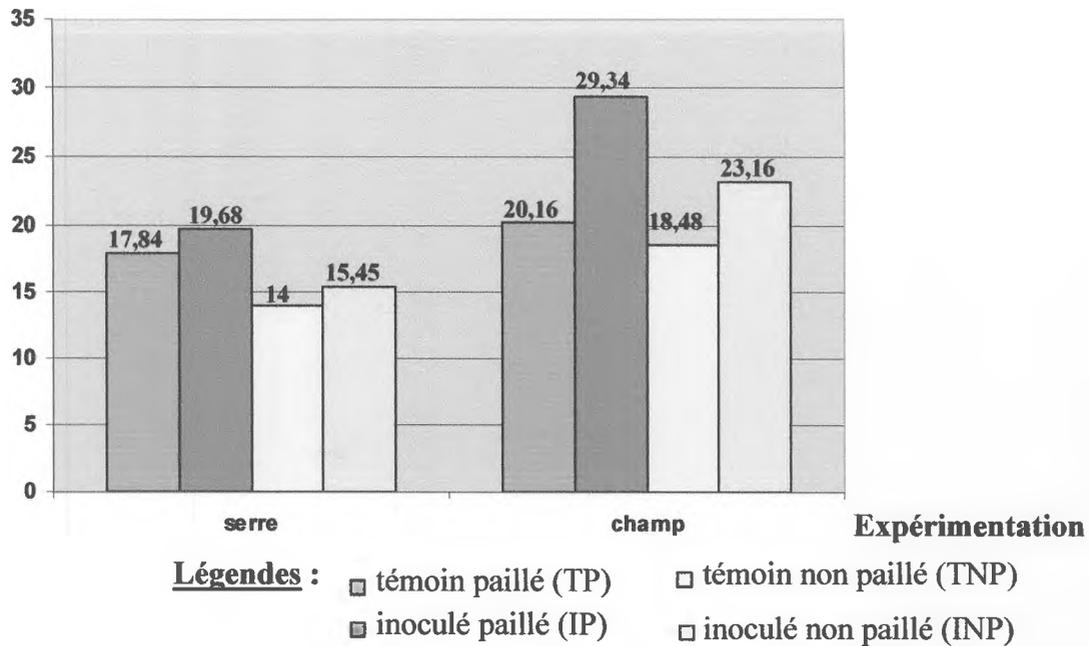
D'après la figure 8, pour les deux essais, le nombre de talles pour le traitement inoculé paillé (9 talles en serre, 12 talles au champ) est supérieur au nombre de talles pour le traitement témoin paillé (8 talles en serre, 5 talles au champ) et ce nombre est supérieur pour le traitement inoculé non paillé (10 talles en serre, 7 talles au champ) que pour le traitement témoin non paillé (7 talles en serre, 4 talles au champ).

Or l'analyse des résultats sur le nombre de talles par pied de riz les plus représentatifs, pour des différents traitements par rapport aux témoins, met en évidence un effet non significatif pour la culture en serre ( $F_c = 0,80 < F_t = 3,59$ ) et un effet significatif pour la culture au champ ( $F_c = 5,27 > F_t = 4,07$ ).

## II- SUR LA LONGUEUR DE FEUILLES PANICULAIRES

La figure 9 montre l'histogramme de l'effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur la longueur des feuilles paniculaires selon les différents traitements (TP, IP, TNP, INP). L'abscisse représente l'expérimentation en serre, au champ et l'ordonnée la longueur des feuilles paniculaires en centimètre.

**Longueur des feuilles  
paniculaires (cm)**



**Figure 9:** Effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur la longueur de feuilles paniculaires (culture en serre ; culture au champ).

La figure 9 montre que les longueurs de feuilles paniculaires sont plus grandes chez les plants de riz inoculés paillés (19,68 cm en serre, 29,34 cm au champ) ou non paillés (15,45 cm en serre et 23,16 cm au champ) par rapport aux témoins, c'est-à-dire les plants de riz non inoculés paillés (17,84 cm en serre, 20,16 cm au champ) ou non paillés (14 cm en serre et 18,48 cm au champ).

Pour l'expérimentation au champ les figures ci-dessous montrent les différenciations entre le témoin paillé et le traitement inoculé paillé (figure 10) et entre le traitement inoculé non paillé et le témoin non paillé (figure 11).



**Figure 10 :** Expérimentation au champ (TP, IP)



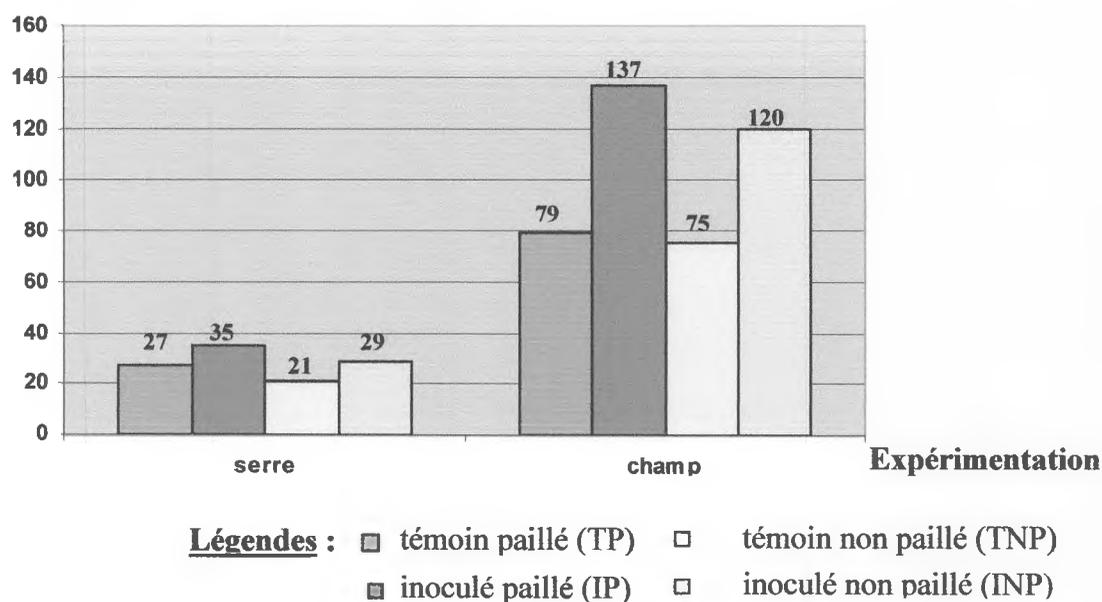
**Figure 11 :** Expérimentation au champ (INP, TNP)

Les résultats d'analyse de variance portant sur les longueurs de feuilles paniculaires ont montré qu'une différence significative existe entre les effets de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* des différents traitements par rapport aux témoins pour la culture au champ ( $F_c = 13,31 > F_t = 4,07$ ) et un effet non significatif pour la culture en serre ( $F_c = 2,11 < F_t = 3,59$ ).

### III- SUR LE NOMBRE DE GRAINES FERTILES (PLEINES) PAR PANICULE

L'histogramme suivant (figure 12) représente l'effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur le nombre de graines fertiles par panicule selon les différents traitements (TP, IP, TNP, INP). En abscisse sont rapportées les deux expérimentations (en serre, au champ) et en ordonnée le nombre de graines fertiles.

**Nombre de graines fertiles**



**Figure 12:** Effet de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur le nombre de graines fertiles par panicule (culture en serre ; culture au champ)

D'après la figure 12, le nombre de graines fertiles est supérieur sur les plants de riz inoculés paillés (35 graines en serre, 137 graines au champ) ou non paillés (29 graines en serre, 120 graines au champ) par rapport au nombre de graines fertiles sur les plants de riz non inoculés paillés (27 graines en serre, 79 graines au champ) ou non paillés (21 graines en serre et 75 graines au champ).

L'analyse de variance a montré qu'il existe une différence significative entre les effets de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* sur le le nombre de graines fertiles (NGF) par rapport aux témoins pour la culture au champ ( $F_c= 53,19 > F_t= 4,07$ ) et un effet non significatif pour la culture en serre ( $F_c= 1,87 < F_t= 3,59$ ).

## VI- SUR LE NOMBRE DE GRAINES DANS 100 g DE POIDS

Le tableau 2 montre le nombre de graines dans 100 g de poids. Ce nombre complète les informations sur la phase de remplissage de graines : plus le nombre est élevé, plus les graines sont moins remplies et vice versa.

**Tableau 2 :** Tableau montrant le nombre de graines dans 100 g de poids

| Traitements | Nombre de graines dans 100 g de poids |                          |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------|
|             | Culture en serre                      | Culture au champ         |
| TP          | 2941 <small>34,0</small>              | 2778 <small>36,0</small> |
| IP          | 2778 <small>36,0</small>              | 2632 <small>38</small>   |
| TNP         | 3226 <small>31,0</small>              | 3125 <small>32</small>   |
| INP         | 3030 <small>33,0</small>              | 2857 <small>35</small>   |

2941  
1  
100g

Avec :

**TP:** témoin paillé

**TNP:** témoin non paillé

**IP:** inoculé paillé

**INP:** inoculé non paillé

D'après le tableau 2, pour les deux expérimentations, le nombre de graines dans 100 g de poids est inférieur pour les traitements inoculés paillés (2778 graines en serre, 2632 graines au champ) que les témoins paillés (2941 graines en serre, 2778 graines au champ) avec une différence de 163 graines en serre ; 146 graines au champ et ce nombre est inférieur pour les plants de riz inoculés, non paillés (3030 graines en serre, 2857 graines au champ) que les témoins non paillés (3226 graines en serre, 3125 graines au champ) avec une différence de 196 graines en serre ; 268 graines au champ.

Donc, les graines récoltées à partir des plants bactérisés paillés ou non paillés (IP ; INP) sont bien remplis par rapport aux témoins paillés ou non paillés (TP ; TNP).

## V- SUR LE RENDEMENT DU RIZ

Le rendement théorique en kg/ha (R) est exprimé par la formule

$$R = \frac{Npa/m^2 \times E/pa \times \% GP \times P 1000 G}{10000}$$

+ intéressant  
poids de gr sur une  
surface

Avec : **R** : rendement théorique en kg/ha

**Npa/m<sup>2</sup>** : nombre de panicules par mètre carré

**E/pa** : nombre d'épillets par panicule

**%GP** : pourcentage de graines pleines (fertiles) traduisant la capacité de production réelle

**P1000G** : poids de mille graines

**Tableau 3 :** Tableau montrant l'effet de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* sur le rendement du riz

| Traitements | Rendement en kg/ha |                  | Rendement en t/ha |                  |
|-------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|
|             | Culture en serre   | Culture au champ | Culture en serre  | Culture au champ |
| <b>TP</b>   | 1472               | 1707             | 1,5               | 1,7              |
| <b>IP</b>   | 2245               | 7316             | 2,2               | 7,3              |
| <b>TNP</b>  | 908                | 1107             | 0,9               | 1,1              |
| <b>INP</b>  | 2040               | 3691             | 2                 | 3,7              |

Avec :

**TP**: témoin paillé

**TNP**: témoin non paillé

**IP**: inoculé paillé

**INP**: inoculé non paillé

Comme le rendement est le résultat du produit de ses composantes, une simple analyse de variance sur ce rendement ne révèle aucune information sur sa variation suivant un tel ou tel facteur étudié (tableau 3) :

- **Le rendement est corrélé avec le nombre de panicules par m<sup>2</sup> :**

C'est-à-dire nombre de talles par pied par m<sup>2</sup> ; or d'après l'analyse de variance le nombre de panicules par m<sup>2</sup> est identique sur les témoins que sur les plants de riz inoculés pour la culture

en serre, c'est-à-dire un effet non significatif. Ce qui entraîne aussi un effet non significatif sur le rendement.

D'après notre expérimentation au champ, la bactérisation par l'*Azospirillum sp* donne des effets significatifs sur le nombre de panicules par rapport aux témoins. Donc, le nombre élevé de panicules par m<sup>2</sup> implique un haut rendement.

- **Le rendement et le nombre d'épillets par panicule (nombre total de graines)**

Le rendement augmente au fur et à mesure que le nombre d'épillets augmente.

Or en serre, la bactérisation par l'*Azospirillum sp* donne un effet non significatif sur le nombre d'épillets que sur les témoins ( $F_c = 1,26 < F_t = 3,59$ ). Elle agit positivement sur le nombre d'épillets par panicule au champ ( $F_c = 9,83 > F_t = 4,07$ ), donc la bactérisation agit aussi sur le rendement.

- **Le rendement et le pourcentage de graines pleines**

Le pourcentage de graines pleines (% GP) est la troisième composante du rendement.

Mais, il n'existe pas une différence significative entre les effets de la bactérisation sur le pourcentage de graines pleines que sur les témoins pour la culture en serre.

Au champ, cette troisième composante de rendement est plus élevée chez les plants de riz bactérisés cultivés dans un terrain paillé ou non paillé que chez les plants de riz non bactérisés cultivés dans un terrain non paillé ou paillé (le % GP est calculé à partir du nombre total de graines et du nombre de graines fertiles).

- **Le rendement et le poids de 1000 graines**

En serre, aucune différence significative n'a été constatée sur les effets de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* sur le P1000G que sur les témoins, mais une différence significative a été remarquée durant l'expérimentation au champ.

Le tableau 4 représente la récapitulation des effets de la bactérisation du riz par l'*Azospirillum sp* sur les caractères étudiés (nombre de talles par pied, longueur des feuilles paniculaires, nombre de graines fertiles,...) en serre et au champ selon les différents traitements (TP, IP, TNP, INP).

**Tableau 4 :** Tableau récapitulatif des effets de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* sur le NT, LFP, NGF... (Culture en serre ; culture au champ)

| Traitements | Effet sur le nombre de talles par pied |       | Effet sur la longueur de feuilles paniculaires (cm) |       | Effet sur le nombre de graines fertiles par panicule |       |
|-------------|--|-------|---|-------|--|-------|
|             | Serre                                  | Champ | Serre   | Champ | Serre  | Champ |
| <b>TP</b>   | 8                                      | 5     | 17.84   | 20.16 | 27   | 79    |
| <b>IP</b>   | 9                                      | 12    | 19.68   | 29.34 | 35   | 137   |
| <b>TNP</b>  | 7                                      | 4     | 14  | 18.48 | 21   | 75    |
| <b>INP</b>  | 10                                     | 7     | 15.45   | 23.16 | 29   | 120   |

Avec :

**TP:** témoin paillé

**TNP:** témoin non paillé

**IP:** inoculé paillé

**INP:** inoculé non paillé

Quatrième partie :

DISCUSSIONS, CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

## A- DISCUSSIONS SUR LES EFFETS DE LA BACTERISATION EN FONCTION DES TRAITEMENTS

D'après le tableau 4, pour la culture en serre ou au champ, les effets sont bénéfiques pour les traitements inoculé paillé (IP) et inoculé non paillé (INP) par rapport aux témoins (les traitements TP ; TNP), mais ils sont plus intéressants pour le traitement inoculé paillé (IP) que pour le traitement inoculé non paillé (INP).

En effet, la bactérisation des semences de riz pluvial avec la dose optimale en *Azospirillum sp* ( $10^{10}$  *Azospirillum sp/ml*) des semences de riz pluvial conduit : à l'amélioration de la performance de ces plants c'est-à-dire amélioration du nombre de talles, de la longueur de feuilles paniculaires, du nombre de panicules, du nombre de graines pleines, du poids de 1000 graines, du nombre de graines dans 100 g de poids et du rendement.

En plus, la pratique du système de culture sous couverture végétale (effet du paillage) renforce le développement des plants de riz pluvial. Ceci a permis de maintenir l'équilibre biologique du sol, du fait d'une assimilation régulière de l'azote suivi d'une réduction de la dégradation du sol et des attaques pathogènes.

Les résultats d'analyse de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* sur la variété FOFIFA 161 selon les différents traitements ont donné des effets non significatifs sur les caractères étudiés (NT, LFP, NGF,...) par rapport aux témoins pour la culture en serre et des changements significatifs au champ : le rendement augmente, la phase végétative au maturation de graines est accélérée. *non maîtrée*

Donc, toutes ces observations peuvent être dues aux différents facteurs suivants :

- la composition des populations microbiennes fixatrices d'azote

Au champ, les *Azospirillum sp* peuvent prendre une croissance exponentielle c'est-à-dire qu'ils sont en nombre élevé, sans compétition avec les autres microorganismes. Le nombre élevé d'*Azospirillum sp* conduit à l'augmentation de l'intensité de l'activité réductrice, donc la quantité d'azote assimilable par le riz est suffisante.

En serre, cette intensité de l'activité réductrice est faible.

- les conditions du milieu environnant

La température de la serre pendant la phase végétative du riz varie entre 16 °C à 30 °C. Or l'activité fixatrice maximale de l'*Azospirillum sp* se situe entre 32 °C et 40 °C et la lumière qui détermine l'intensité de la photosynthèse chez la plante (riz) est insuffisante, ce qui provoque la diminution de la quantité de carbone disponible.

Les conditions sont favorables aux *Azospirillum sp* au champ et en plus le repiquage a été réalisé pendant la saison de pluie.

La quantité de carbone déposé au sol est nécessaire pour l'alimentation et le développement de la microflore fixatrice c'est-à-dire les *Azospirillum sp*.

D'après l'étude (HOLGUIN, 2003), les *Azospirillum sp* sont appelés « plant growth promoting bacteria » ou PGPB ou bactéries de promotion développement des plantes (riz) en fournissant directement les éléments nutritifs aux plantes ou facilitant l'absorption de certains éléments nutritifs dans la rhizosphère. Il a confirmé aussi l'existence des phytohormones induites par les *Azospirillum sp* comme : AIA (Acide Indol Acétique) qui favorise la croissance racinaire, les cytokinines qui provoquent la multiplication des bourgeons, les gibbérellines qui entraînent l'allongement des entre-nœuds, préfloraison et l'éthylène qui accélère la maturation des graines.

Toutes ces observations confirment les résultats (ANDRIANJAKA, 2001) qui ont mis en exergue l'activité de la fixation biologique de l'azote en riziculture. ANDRIANJAKA a affirmé que plus la concentration bactérienne (*Azospirillum sp*) est importante, plus l'azote assimilable ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) est suffisant, et plus les caractères agronomiques sont développés, donc le rendement est amélioré.

## **B- CONCLUSION**

La fixation biologique de l'azote est le résultat d'un équilibre entre une plante supérieure et une bactérie. Il est important de bien connaître les conditions optimales pour pouvoir en faire bénéficier la plante : la bonne structure du sol (sol aéré), peu d'azote combiné, la présence de souches en nombre suffisant et les conditions favorables de développement de la plante (climat, techniques culturales, variétés adaptées, absence de maladies,...)

La présente étude a pu confirmer l'existence de bactéries fixatrices d'azote dans les racines du riz sous SRI et mettre en évidence l'action de ces souches bactériennes qui sont les « *Azospirillum sp* ».

En effet, la bactérisation par les *Azospirillum sp* sur les semences du riz pluvial FOFIFA 161, engendre une augmentation du rendement rizicole sur l'expérimentation au champ de 3,7 t/ha à 7,3 t/ha qui dépasse son rendement habituel de 2,6 t/ha à 6,6 t/ha et du rendement non significatif sur l'expérimentation en serre de 2 t/ha à 2,2 t/ha vu les causes biologiques, climatiques, édaphiques ...

Actuellement, nous sommes donc en mesure de soutenir la possibilité de remplacer les fertilisants minéraux par la bactérisation par l'*Azospirillum sp* tout en augmentant la productivité.

Par ailleurs, la pratique du système de culture sous couverture végétale (SCV) qui entraîne le développement racinaire, latéralement et en profondeur et donc d'une grande capacité des plantes (riz) à explorer le sol pour l'eau et les nutriments est aussi un atout pour l'amélioration de ce rendement. Il restaure la fertilité du sol et assure l'optimisation de la production d'une manière durable.

Enfin, cette étude a également permis d'ouvrir une nouvelle approche à la vulgarisation de la bactérisation par l'*Azospirillum sp* et à contribuer au développement agricole en général du pays, en mettant à la portée des riziculteurs la dose optimale de la bactérisation en *Azospirillum sp* pour cette pratique ( $10^{10}$  *Azospirillum sp*/ml) ainsi que les différentes étapes de la technologie. Cette dose optimale a été obtenue en broyant 5 g de racines que l'on dilue dans 50 ml d'eau.

### C- PERSPECTIVES

D'après les résultats de la présente recherche, il reste encore des questionnements qui méritent d'être traités en tant que thème de recherche.

Les sujets suivants nous paraissent prioritaires pour la suite :

- L'isolement et l'identification des souches d'*Azospirillum sp* issues de la bactérisation directe.
- Malgré les résultats positifs découverts par ces travaux de recherche, il est difficile de faire l'inventaire des différentes espèces d'*Azospirillum* trouvées à Madagascar qui est due au manque de souches de référence.
- A part *Azospirillum sp*, il est nécessaire de faire l'identification des autres microorganismes présents au niveau du cortège racinaire.
- La mesure de la quantité d'azote fixée ou transformée par l'*Azospirillum sp*.
- L'isolement et l'identification des souches à partir des racines du riz pluvial et réutiliser l'inoculum avec les mêmes semences pour une prochaine campagne.
- Sensibilisation des paysans pour l'utilisation de la bactérisation par *Azospirillum sp* dans la culture du riz pluvial.
- La fabrication de l'inoculum pour une plus large diffusion commerciale.
- Mise au point de la banque de donnée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDRIANARISOA, K .S, 2004. Expérimentation agronomique sur l'effet de l'inoculation de la riziculture pluviale par les exsudats (sèc) racinaires des plants de riz cultivés en SRI au stade de plein tallage. Antananarivo (MG) : ESSA ,125 f : fig, carte, table, graph, bibliographie, MEM : Département Agriculture.
- ANDRIANJAKA, A .H, 2001. Mise en évidence des opportunités de développement de la riziculture par adoption du SRI et évaluation de la fixation biologique de l'azote : cas des rizières des Hautes Terre Mémoire de fin d'études ESSA-Agriculture, Université d'Antananarivo.
- BALANDREAU, 1975. Activité nitrogénasique dans la rhizosphère de quelques graminées. Thèse de doctorat-ès Sciences Naturelles, Université de Nancy I.
- BALANDREAU, 1983. Biology and fertility of soils.
- BILAL, R., RASUL, G., QURESHI, J. A., & MALIK, K. A., 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. World J. Microbiol. Biotech.6: 46- 52.
- DE LAULANIE, H., 1993. Le Système de Riziculture Intensive malgache, in Tropicultura.
- DÖBEREINER, 1976.[http : //www.cnpq.br/](http://www.cnpq.br/)
- DÖBEREINER, J., 1976. Nitrogen fixation in grass bacteria in the tropics. Empresa Brasileira de Pesquisa Agrocecuaria (EMBRAPA) Rio de Janeiro, Brazil.
- DÖBEREINER, J., FALK, E. C., JOHNSON, J. L., & KRIEG, N. R, 1984. Desoxyribonucléic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhaes, and emendation of description of the genus *Azospirillum* Int J. System Bacteriol, 1985., 35: 117- 118.
- DOMMELEN, V.A., 1998. Methyl ammonium transport in the Nitrogen. Fixing Bacterium *Azospirillum brasilense*, Thèse de Doctorat-ès Sciences Naturelles Département des Biotechnologies, Institut Pasteur, France.
- FABIANO, E., & CARDONA, A., 1985. Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense*. Applied Environmental Microbiology, 50, 183- 185.
- FAGES, J., & PIONEER, 1992. An Industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology, symbiosis, 13, 15- 26.

- FLORENZANO, 1966. Nitrogen and rice, [http : // www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)
- GAUTHIER, D. G., 1977. Etude de diverses souches d'*Azospirillum* isolées au Sénégal : effet de l'inoculation de ces souches d'un système « sol-riz » non stérile, Laboratoire de Biologie des sols ORSTOM, DAKAR, Sénégal.
- GILLER. 1993. Nitrogen fixation in tropical cropping systems CAB. International-Wallinford, Oxon ox 108 DE-UK.
- HAMDI, Y.A., 1982. Application of nitrogen-fixing systems in soil improvement and management FAO Soils Bulletin, 49,188 pp.
- HOLGUIN, 2003. Inoculation of tomato plants with *Azospirillum brasilense*, Departement of Biology, University of Waterloo, ON N2L 3G1, Canada.
- IRRI, 1997. Rice Almanac. Second Edition IRRI Los Banos Philippines. CIAT Cali Colombia
- IRRI, 1998. International Rice Research Institue Los Banos, Philippines.
- LADHA, J. K., & REDDY, 2000. The quest for nitrogen fixation in rice, IRRI, Los Banos, Philippines, [http:// www.une.edu.au/ sciences](http://www.une.edu.au/sciences).
- LADHA, J.K., 1998. Opportunities for increased nitrogen use from improved lowland rice germoplasm, Field Crops Research, 56, 41- 76.
- MAGALHAES, F.M.M., & DÖBEREINER, J., 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad .Bras.Cien, 55, 417- 430.
- MOROT, J.F., & GAUDRY, 1997.Assimilation de l'azote par les plantes. Aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires, INRA, Paris, France , 422 pages.
- MOROT, J.F., & GAUDRY, 1998. L'assimilation de l'azote par les plantes [http : // www.intra.fr](http://www.intra.fr)
- NIELSEN, D.R., & DONALD, M.I.G., 1978. Nitrogen in the Environment (2 volumes). Academic Press, New York.
- NORMAN, U., 2002. Assesments of the System of Rice Intensification Proceedings of an International Conference Sanya, China.
- PARAKARN, T., 2003. The biological nitrogen fixing rice for the future agricultural improvement. Biological Departement, Faculty of science, Mahasarakham University , [http : // www.msu.ac.th/ biodept.htm](http://www.msu.ac.th/biodept.htm)
- PIONEER, 2005. Diminution de l'apport d'engrais azotés aux cultures grâce à des bactéries fixatrices d'azote : analyse industrielle du cas d'*Azospirillum*, France, [http:// www.cbb.developpement.com/00/14/1428.htm](http://www.cbb.developpement.com/00/14/1428.htm)

- RAJAOMILISON, P. 2003. Amélioration de la fertilisation de la riziculture par l'utilisation de souches d'*Azospirillum sp* du SRI. Mémoire de fin d'études, Département des Eaux et Forêts, ESSA, Université d' Antananarivo.
- RALIJAONA, L. A., 2002. Contribution à l'amélioration de la fixation biologique de l'azote dans le SRI par la détermination de la dose de compost et par inoculation d'*Azospirillum sp*. Mémoire d'Ingénieur en Agronomie : ESSA, Université d' Antananarivo.
- RANDRIAMBOLOLONA, N., 2002. Etudes expérimentales pour la mise au point sous serre de l'inoculation adéquate de revenue du riz par *Azospirillum sp*. Mémoire de fin d'études, Département Agriculture, Université d'Antananarivo.
- RANDRIAMIHARISOA, R., 2002. Research results on the System of Rice Intensification in Madagascar, Université d'Antananarivo, International Workshop on SRI in SANYA, China.
- SINGLETON, P., & SAINSBURY, D., 1984. Bactériologie MBB, 55 : pp : 22- 27 ; 92-97 ; Institut Pasteur Madagascar.
- VALLOIS, P., 2000. Loi du tallage de KATAYAMA, IPNR, Madagascar [http:// www.simicro.mg/ipnr/](http://www.simicro.mg/ipnr/)
- YOBOUE, P.C.N., 1986. Variation de l'expression génétique dans une descendance androgénique de riz à haut niveau d'homozygotie IAEA-SM- 282/26. Institut de savanes. Centre de cultures vivrières Côte d'Ivoire p357- 446.
- YOSHIDA, S., 1981. Fundamentals of rice crop science, IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines, 269 pages.

# ANNEXES

## ANNEXE I: Composition des milieux utilisés (RANDRIAMBOLOLONA, 2002)

### ○ Composition du milieu DÖBEREINER pour 1000 ml

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,4 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0,1 g   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,1 g   |
| NaCl                                  | 0,02 g  |
| FeCl <sub>3</sub>                     | 0,01 g  |
| NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,002 g |
| Glucose                               | 1,0 g   |
| H <sub>2</sub> O (qsp)                | 1000 ml |
| pH                                    | 7       |
| Agar                                  | 15,5 g  |

### ○ Composition du milieu YEM pour 1000 ml

|  |         |
|--|---------|
| Mannitol   | 10 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                            | 0,5 g   |
| Glutamate de Sodium  | 0,5 g   |
| NaCl   | 0,05 g  |
| Solution T (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O à 10 g/l) | 10 ml   |
| Solution U (CaCl <sub>2</sub> 0,40 g/l)                    | 1,0 ml  |
| Solution V (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O à 4 g/l)  | 1,0 ml  |
| Extrait de levure  | 1,0 g   |
| H <sub>2</sub> O (qsp)                                     | 1000 ml |
| pH   | 6,8     |
| Agar   | 20 g    |

**ANNEXE II : Tableau montrant les effets de la bactérisation par l' *Azospirillum sp* suivant le stade d'évolution du riz**

- Sur le nombre de talles

| Traitements | 15 jours |    | 30 jours |    | 45 jours |    | 60 jours |    | 75 jours |    | 90 jours |    | 105 jours |    |
|-------------|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|
|             | S        | Ch | S         | Ch |
| TP          | 10       | 4  | 10       | 5  | 10       | 5  | 11       | 5  | 11       |    | 8        |    | 8         |    |
| IP          | 10       | 8  | 10       | 10 | 10       | 12 | 9        | 12 | 9        |    | 9        |    | 9         |    |
| TNP         | 10       | 4  | 10       | 4  | 10       | 4  | 7        | 4  | 7        |    | 7        |    | 7         |    |
| INP         | 10       | 7  | 10       | 7  | 10       | 7  | 10       | 7  | 10       |    | 10       |    | 10        |    |

S : serre

Ch : champ

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

**ANNEXE III : Tableau récapitulant les composantes de rendement du riz**

| Traitements | Npa/m <sup>2</sup> |       | E/pa  |       | % GP  |       | P 1000 G |       |
|-------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|
|             | serre              | champ | serre | champ | serre | champ | serre    | champ |
| TP          | 163                | 60    | 30    | 88    | 88,48 | 89,79 | 34       | 36    |
| IP          | 175                | 140   | 39    | 143   | 91,37 | 96,17 | 36       | 38    |
| TNP         | 143                | 46    | 23    | 85    | 89,05 | 88,47 | 31       | 32    |
| INP         | 208                | 88    | 32    | 127   | 92,87 | 94,35 | 33       | 35    |

Npa/m<sup>2</sup> : nombre de panicule par m<sup>2</sup>

E/pa : nombre d'épillet par panicule

%GP : pourcentage de graines pleines

P 1000G : poids de 1000 graines

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

## ANNEXE IV : Analyses statistiques des données

### 1-Nombre de talles du riz par pied (Fof)

| Traitements         | TP  |     | IP   |      | TNP |     | INP  |     | Total               |                    |
|---------------------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|-----|---------------------|--------------------|
|                     | S   | Ch  | S    | Ch   | S   | Ch  | S    | Ch  | S                   | Ch                 |
| X <sub>1</sub>      | 8   | 3   | 4    | 9    | 5   | 5   | 11   | 10  |                     |                    |
| X <sub>2</sub>      | 6   | 7   | 13   | 16   | 9   | 2   | 12   | 5   |                     |                    |
| X <sub>3</sub>      | 10  | 6   | 10   | 10   |     | 5   | 11   | 6   |                     |                    |
| X <sub>4</sub>      |     |     | 9    |      |     |     | 6    |     |                     |                    |
| X <sub>5</sub>      |     |     | 7    |      |     |     | 11   |     |                     |                    |
| Ti                  | 24  | 16  | 43   | 35   | 14  | 12  | 51   | 21  | T <sub>G</sub> =132 | T <sub>G</sub> =84 |
| Moyenne             | 8   | 5   | 9    | 12   | 7   | 4   | 10   | 7   |                     |                    |
| Ecart type          | 1,6 | 1,7 | 3    | 3    | 2   | 1,4 | 2,1  | 2,1 |                     |                    |
| Ti <sup>2</sup>     | 576 | 256 | 1849 | 1225 | 196 | 144 | 2601 | 441 | 5222                | 2066               |
| Ti <sup>2</sup> /ni | 192 | 85  | 370  | 408  | 98  | 48  | 520  | 147 | 1180                | 688                |
| ∑x <sup>2</sup>     | 200 | 94  | 415  | 437  | 106 | 54  | 543  | 161 | 1264                | 746                |

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

S : Serre

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

Ch : Champ

| Origine                     | Somme des carrés des écarts |        | Nombre de degré de liberté |       | Variance |       | Test de Fisher-Snedecor |       |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|----------------------------|-------|----------|-------|-------------------------|-------|
|                             | Serre                       | Champ  | Serre                      | Champ | Serre    | Champ | Serre                   | Champ |
| Entre colonne               | 18,40                       | 108,35 | 3                          | 3     | 6,13     | 36,11 | 0,80                    | 5,26  |
| Intra colonne ou résiduelle | 84                          | 54,85  | 11                         | 8     | 7,63     | 6,85  |                         |       |
| Total                       | 102,40                      | 163,20 | 14                         | 11    |          |       |                         |       |

2-Longueur de feuilles paniculaires (cm) du riz (Fofifa 161)

| Traitements         | TP      |         | IP      |             | TNP        |             | INP         |             | Total                      |                            |
|---------------------|---------|---------|---------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
|                     | S       | Ch      | S       | Ch          | S          | Ch          | S           | Ch          | S                          | Ch                         |
| X <sub>1</sub>      | 15,58   | 17,14   | 25,38   | 31,84       | 14,20      | 19,46       | 14,78       | 24,22       |                            |                            |
| X <sub>2</sub>      | 23,05   | 23,50   | 18,28   | 27,74       | 13,80      | 19,86       | 15,52       | 23,36       |                            |                            |
| X <sub>3</sub>      | 14,89   | 19,84   | 15,94   | 28,44       |            | 16,12       | 14,05       | 21,90       |                            |                            |
| X <sub>4</sub>      |         |         | 21,18   |             |            |             | 19,35       |             |                            |                            |
| X <sub>5</sub>      |         |         | 17,60   |             |            |             | 13,55       |             |                            |                            |
| Ti                  | 53,52   | 60,48   | 98,38   | 88,02       | 28         | 55,44       | 77,25       | 69,48       | T <sub>G</sub> =257,1<br>5 | T <sub>G</sub> =273,4<br>2 |
| Moyenne             | 17,84   | 20,16   | 19,68   | 29,34       | 14         | 18,48       | 15,45       | 23,16       |                            |                            |
| Ecart type          | 3,7     | 2,6     | 3,3     | 1,8         | 0,6        | 1,7         | 2,1         | 0,9         |                            |                            |
| Ti <sup>2</sup>     | 2864,39 | 3657,83 | 9678,62 | 7747,5<br>2 | 784        | 3073,5<br>9 | 5967,5<br>6 | 4827,4<br>7 | 19294,57                   | 19306,41                   |
| Ti <sup>2</sup> /ni | 954,80  | 1219,27 | 1935,72 | 2582,5<br>0 | 261,3<br>3 | 1024,5<br>3 | 1193,5<br>1 | 1609,1<br>6 | 4345,36                    | 6435,46                    |
| ∑x <sup>2</sup>     | 995,75  | 1239,65 | 1990,73 | 2592,1<br>3 | 392,0<br>8 | 1032,9<br>7 | 1214,7<br>5 | 1611,9<br>1 | 4593,31                    | 6476,66                    |

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

S : Serre

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

Ch : Champ

| Origine                     | Somme des carrés des écarts |        | Nombre de degré de liberté |       | Variance |       | Test de Fisher-Snedecor |       |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|----------------------------|-------|----------|-------|-------------------------|-------|
|                             | Serre                       | Champ  | Serre                      | Champ | Serre    | Champ | Serre                   | Champ |
| Entre colonne               | 67,64                       | 205,59 | 3                          | 3     | 22,54    | 68,53 | 2,11                    | 13,31 |
| Intra colonne ou résiduelle | 117,28                      | 41,18  | 11                         | 8     | 10,66    | 4,14  |                         |       |
| Total                       | 184,92                      | 246,77 | 14                         | 11    |          |       |                         |       |

### 3-Nombre de graines fertiles par panicule du riz (Fofifa 161)

| Traitements         | TP   |       | IP    |        | TNP  |       | INP   |        | Total               |                      |
|---------------------|------|-------|-------|--------|------|-------|-------|--------|---------------------|----------------------|
|                     | S    | Ch    | S     | Ch     | S    | Ch    | S     | Ch     | S                   | Ch                   |
| X <sub>1</sub>      | 28   | 80    | 47    | 125    | 21   | 75    | 24    | 122    |                     |                      |
| X <sub>2</sub>      | 30   | 71    | 29    | 149    | 20   | 72    | 26    | 119    |                     |                      |
| X <sub>3</sub>      | 22   | 87    | 30    | 138    |      | 78    | 27    | 120    |                     |                      |
| X <sub>4</sub>      |      |       | 33    |        |      |       | 48    |        |                     |                      |
| X <sub>5</sub>      |      |       | 38    |        |      |       | 23    |        |                     |                      |
| Ti                  | 80   | 238   | 177   | 412    | 41   | 225   | 148   | 361    | T <sub>G</sub> =446 | T <sub>G</sub> =1236 |
| Moyenne             | 27   | 79    | 35    | 137    | 21   | 75    | 30    | 120    |                     |                      |
| Ecart type          | 3,4  | 7     | 6,6   | 10     | 0,5  | 2,5   | 9,3   | 1,3    |                     |                      |
| Ti <sup>2</sup>     | 6400 | 56644 | 31329 | 169744 | 1681 | 50625 | 21904 | 130321 | 61314               | 407334               |
| Ti <sup>2</sup> /ni | 2133 | 18881 | 6266  | 56581  | 841  | 16875 | 4381  | 43440  | 13621               | 135777               |
| ∑x <sup>2</sup>     | 2168 | 19010 | 6483  | 56870  | 841  | 16893 | 4814  | 43445  | 14306               | 136218               |

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

S : Serre

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

Ch : Champ

| Origine                     | Somme des carrés des écarts |         | Nombre de degré de liberté |       | Variance |         | Test de Fisher-Snedecor |       |
|-----------------------------|-----------------------------|---------|----------------------------|-------|----------|---------|-------------------------|-------|
|                             | Serre                       | Champ   | Serre                      | Champ | Serre    | Champ   | Serre                   | Champ |
| Entre colonne               | 355,77                      | 8458,11 | 3                          | 3     | 118,59   | 2819,37 | 1,87                    | 53,18 |
| Intra colonne ou résiduelle | 695,98                      | 424,08  | 11                         | 8     | 63,27    | 53,01   |                         |       |
| Total                       | 1051,75                     | 8882,19 | 14                         | 11    |          |         |                         |       |

#### 4-Nombre total de graines du riz par panicule (Fofifa 161)

| Traitements         | TP   |       | IP    |        | TNP  |       | INP   |        | Total               |                      |
|---------------------|------|-------|-------|--------|------|-------|-------|--------|---------------------|----------------------|
|                     | S    | Ch    | S     | Ch     | S    | Ch    | S     | Ch     | S                   | Ch                   |
| X <sub>1</sub>      | 32   | 88    | 54    | 130    | 24   | 83    | 25    | 130    |                     |                      |
| X <sub>2</sub>      | 34   | 84    | 33    | 155    | 22   | 82    | 26    | 125    |                     |                      |
| X <sub>3</sub>      | 25   | 129   | 32    | 143    |      | 90    | 28    | 127    |                     |                      |
| X <sub>4</sub>      |      |       | 34    |        |      |       | 56    |        |                     |                      |
| X <sub>5</sub>      |      |       | 41    |        |      |       | 23    |        |                     |                      |
| Ti                  | 91   | 301   | 194   | 428    | 46   | 255   | 158   | 382    | T <sub>G</sub> =489 | T <sub>G</sub> =1366 |
| Moyenne             | 30   | 100   | 39    | 143    | 23   | 85    | 32    | 127    |                     |                      |
| Ecart type          | 3,9  | 20,3  | 8,2   | 10,2   | 1    | 3,6   | 12,3  | 2,1    |                     |                      |
| Ti <sup>2</sup>     | 8281 | 90601 | 37636 | 183184 | 2116 | 65025 | 24964 | 145924 | 72997               | 484734               |
| Ti <sup>2</sup> /ni | 2760 | 30200 | 7527  | 61061  | 1058 | 21675 | 4993  | 48641  | 16338               | 161577               |
| ∑x <sup>2</sup>     | 2805 | 31441 | 7866  | 61374  | 1060 | 21713 | 5750  | 48654  | 17481               | 163182               |

TP : témoin paillé

IP : inoculé paillé

S : Serre

TNP : témoin non paillé

INP : inoculé non paillé

Ch: Champ

| Origine                     | Somme des carrés des écarts |         | Nombre de degré de liberté |       | Variance |         | Test de Fisher-Snedecor |       |
|-----------------------------|-----------------------------|---------|----------------------------|-------|----------|---------|-------------------------|-------|
|                             | Serre                       | Champ   | Serre                      | Champ | Serre    | Champ   | Serre                   | Champ |
| Entre colonne               | 395,75                      | 6077,95 | 3                          | 3     | 131,91   | 2025,98 | 1,26                    | 9,83  |
| Intra colonne ou résiduelle | 1149,40                     | 1648,69 | 11                         | 8     | 63,27    | 206,08  |                         |       |
| Total                       | 1545,15                     | 7726,64 | 14                         | 11    |          |         |                         |       |

## ANNEXE V: Caractéristiques d'*Oryza sativa*, variétés Mailaka et Mahefa

### MAILAKA n° 3914 ou X265 (FOFIFA)

Origine: Philippines (IRRI)

Cycle cultural: 160-165 jours

Région de culture: Haute Terre

Adaptation à la culture irriguée

Graines: demi-rondes

Supporte le déficit hydrique et inondation

Résistant au *Pyricularia*

Plus productive quand on apporte du fertilisant

Egrenage: peu difficile

Productivité moyenne: 5 t/ ha

Maximum de production: 9,5 t/ ha

### MAHEFA n° 488 ou FOFIFA 161

Origine: IRAT 114 x FOFIFA 133 (URP SCRID MADAGASCAR)

Cycle cultural: 155 jours

Région de culture: Haute Altitude

Adaptation à la culture pluviale

Graines demi- rondes grosses

Rustique, résiste à la verse, tolère la pyriculariose

Egrenage: peu sensible

Productivité moyenne: 2,6 t/ ha

Maximum de production: 6,6 t/ha

## ANNEXE VI : Nombre de colonies d' *Azospirillum sp* dans les boîtes de pétri choisies

| Dilutions        | Nombre de colonies d' <i>Azospirillum sp</i> |                |
|------------------|--|----------------|
|                  | premier essai                                | deuxième essai |
| 10 <sup>-6</sup> | 80   | 92             |
| 10 <sup>-7</sup> | 31   | 37             |
| 10 <sup>-8</sup> | 26   | 30             |

# Amélioration de la nutrition azotée du riz pluvial par la fixation biologique de l'azote avec les bactéries *Azospirillum* sp.

## Equipe de recherche

- ◆ RATSIMIALA RAMONTA Isabelle<sup>1</sup>
  - ◆ VIAVY Elodie Judica<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>: Faculté des Sciences  
Laboratoire de Physiologie Végétale.

## Tableau de résultat

| Traitements            | Nombre de graines X 10 |       | Longueur des feuilles paniculaires en cm |       | Nombre de tiges |       |
|------------------------|------------------------|-------|--|-------|-----------------|-------|
|                        | Serre                  | Champ | Serre                                    | Champ | Serre           | Champ |
| Témoin paillé TP       | 4                      | 8     | 17,8                                     | 20,2  | 8               | 8     |
| Inoculé paillé IP      | 4                      | 14    | 19,7                                     | 29,4  | 9               | 11    |
| Témoin non paillé TNP  | 2                      | 8     | 14                                       | 18,5  | 7               | 3     |
| Inoculé non paillé INP | 3                      | 12    | 15,4                                     | 23,2  | 10              | 7     |

Tableau montrant les effets de la bactérisation par *Azospirillum* sp.

## Experimentation en serre



TP,IP



TNP,INP

## Methodologie

- ▶ Recherche des bactéries *Azospirillum* sp. au niveau des racines du riz X 265 en SRI
- ▶ Identification des souches
- ▶ Multiplication des souches d'*Azospirillum* sp.
- ▶ Inoculation de ces souches sur la variété de riz pluvial Fofifa 161
- ▶ Analyse du cortège racinaire



Phase de maturation des graines du système SRI sur la variété X265



Racine de riz

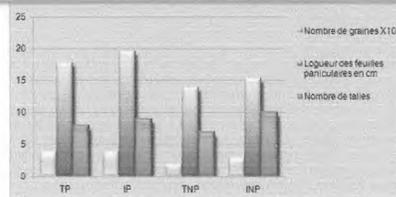
## Conclusion et perspectives

- ▶ Le traitement « inoculé paillé » a donné les meilleures réponses:
  - pour le nombre de graines par panicule
  - pour la longueur des feuilles paniculaires
  - pour le nombre de tiges par touffe.
- ▶ L'expérimentation au champ confirme bien les résultats obtenus en serre
- ▶ La bactérisation par *Azospirillum* sp. améliore le rendement du riz pluvial par conséquent la nutrition azotée.
- ▶ Les résultats vont permettre d'orienter le choix des systèmes à développer et à diffuser selon les conditions pédoclimatiques et socio-économiques des fertilisants organiques et minéraux.

## Remerciement

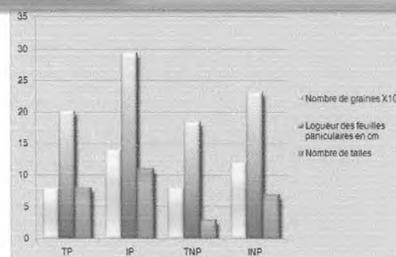
Cette étude a été supportée grâce à la collaboration de la Faculté des Sciences d'Antananarivo (Laboratoire de Physiologie végétale), avec l'URP-SCRID le CIRAD et l'IRD.

## En serre



Traitements: TP témoin paillé, IP inoculé paillé, TNP témoin non paillé, INP inoculé non paillé

## Au champ



Traitements: TP témoin paillé, IP inoculé paillé, TNP témoin non paillé, INP inoculé non paillé

**Nom :** VIAVY

**Prénoms :** Elodie Judica

**Titre :** AMELIORATION DE LA NUTRITION AZOTEE DU RIZ PLUVIAL PAR LA  
FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE AVEC LES BACTERIES *Azospirillum sp*

## **Résumé**

L' *Azospirillum sp* est une bactérie fixatrice d'azote. Elle a été isolée à partir des racines de touffes de riz (X 265) cultivées selon le Système de Riziculture Intensive (SRI) en plein tallage et atteignant plus de 35 talles par pied. Elle peut être identifiée sur un milieu de DÖBEREINER.

L'inoculation par l' *Azospirillum sp* ( $10^{10}$  *Azospirillum* /ml) de semences de riz pluvial Fofifa 161 a fait apparaître une augmentation significative du rendement sur l'expérimentation au champ (3,7 à 7,3 t/ha) et un effet non significatif sur l'expérimentation en serre (2 to 2,2 t/ha).

Le système de culture sous couverture végétale (SCV) est un avantage pour améliorer progressivement les productivités en maintenant les activités biologiques plus intenses.

Aussi bien en serre qu'au champ, les effets sont plus bénéfiques pour les traitements inoculé paillé (IP) et inoculé non paillé (INP) que les traitements témoin paillé (TP) et témoin non paillé (TNP).

**Mots clés :** Amélioration de rendement du riz, nutrition azotée, fixation biologique de l'Azote, *Azospirillum sp* , SCV.

**Rapporteur :** Dr RATSIMIALA RAMONTA Isabelle

**Name:** VIAVY

**Given Name:** Elodie Judica

**Title:** IMPROVEMENT OF THE NITROGENOUS NUTRITION OF THE PLUVIAL RICE BY THE BIOLOGIC FIXATION OF NITROGEN WITH THE BACTERIA *Azospirillum sp*

### ABSTRACT

*Azospirillum sp* is a bacterium fixatrice of nitrogen. It is isolated from the roots of tufts of cultivated rices (X 265) according to the System of Riziculture Intensive (SRI) in full tallage and reaching more than 35 talles. She can be identified in a middle of DÖBEREINER.

The inoculation by *Azospirillum sp* ( $10^{10}$  *Azospirillum* /ml) of pluvial rice seeds Fofifa 161 made appear a significant increase of the output on the experimentation to the field (3,7 to 7,3 t/ha) and a non significant effect on the experimentation in hothouse (2 to 2,2 t/ha).

The system of culture under plant cover (SCV) is an advantage to improve the productivities progressively in maintaining the more intense biologic activities.

As well as hothouse that in field, the effects are more beneficial for the inoculated treatments mulched (IP) and inoculated non mulched (INP) that the mulched treatments witness (TP) and non mulched witness (TNP).

**Key words:** Improvement of rice output, nitrogenous nutrition, Biologic fixation of nitrogen, *Azospirillum sp*, SCV.

**Tutor:** Dr RATSIMIALA RAMONTA Isabelle