

CN 890016
P342
60E

1989/29

ISRA - CNRA
Bibliothèque
BAMBEY

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT RURAL;

INSTITUT SENEGALAIS DE
RECHERCHES AGRICOLES

DIRECTION DES RECHERCHES SUR
LES PRODUCTIONS VEGETALES

PROGRAMME MIRCEN

PRODUCTION D'INOCULUM DE RHIZOBIUM AU SENEGAL

par

Mamadou GUEYE

dans le cadre du cours régional FAO/AIEA sur
l'application des isotopes et des rayonnements
à l'étude de la fixation biologique de l'azote
et des relations sol/nutrition des plantes.

Eambey
21 Aout-15 Septembre 1989

Centre National. de Recherches
Agronomiques de Bam'bey

PRODUCTION D'INOCULUM DE RHIZOBIUM AU SENEGAL

Mamadou GUEYE, MIRCEN/CNRA, B.P. 53 Bambey, Sénégal.

1. Introduction.

L'azote, après l'eau, est le facteur limitant de la production végétale, et ceci, bien que la réserve disponible soit quasi infinie puisqu'il s'agit de l'azote atmosphérique (Burns et Hardy, 1975).

atmosphère	$3,9.10^{21}$ t.
terre, mers, sédiments marins	$24,5.10^{21}$ t.
roches sédimentaires et primaires	$193,4.10^{21}$ t.

Toutefois, sous sa forme moléculaire, l'azote ne peut être directement utilisé que par les microorganismes fixateurs, libres ou vivant en symbiose avec certaines plantes, légumineuses notamment (Fig.1). Ce processus est appelé fixation biologique de l'azote (FBA). Les microorganismes fixateurs, Rhizobium en particulier, qui se trouvent à l'intérieur des nodules, tirent de la plante les éléments nutritifs et l'énergie nécessaires à leur croissance et à leur développement; en retour, les Rhizobium fixent l'azote atmosphérique qui est alors métabolisé par la plante-hôte. La FBA est un processus anaérobie; la nitrogénase en est l'enzyme responsable : il réduit l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (NH_3) (Fig.21

La FBA permet donc la croissance des plantes sans recourir à l'emploi des engrais minéraux azotés trop coûteux : il s'agit d'une véritable économie de l'azote. Cela explique pourquoi beaucoup de pays, particulièrement ceux en développement fournissent d'importants efforts pour la promotion et l'amélioration de la FBA par la collection des Rhizobium et la production d'inoculum dans les laboratoires tels que les Centres de Ressources Microbiologiques (MIRCENS).

2. Production d'inoculum de Rhizobium.

La première étape de la production d'inoculum est d'obtenir une souche de Rhizobium pour la ou les légumineuses à inoculer. Trois conditions doivent être remplies pour produire un inoculum avec la souche de Rhizobium obtenue :

- la souche de Rhizobium doit être très effective, c'est à dire très apte à fixer l'azote dans le nodule de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est recommandé.
- la souche de Rhizobium doit être très compétitive, c'est à dire, qu'en présence d'autres souches de Rhizobium, elle doit être très apte à former des nodules sur le système

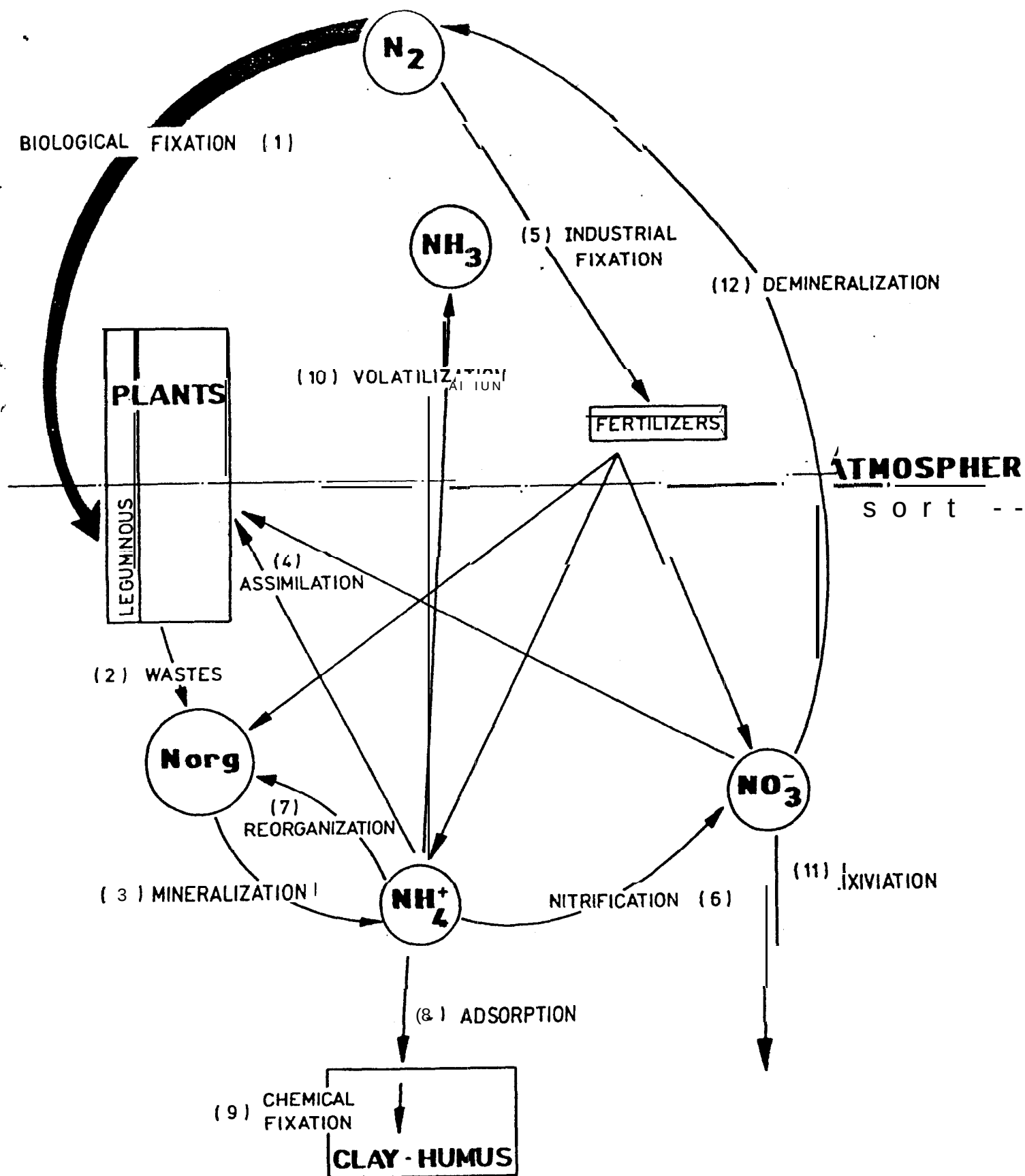


FIG. 1

NITROGEN CYCLE

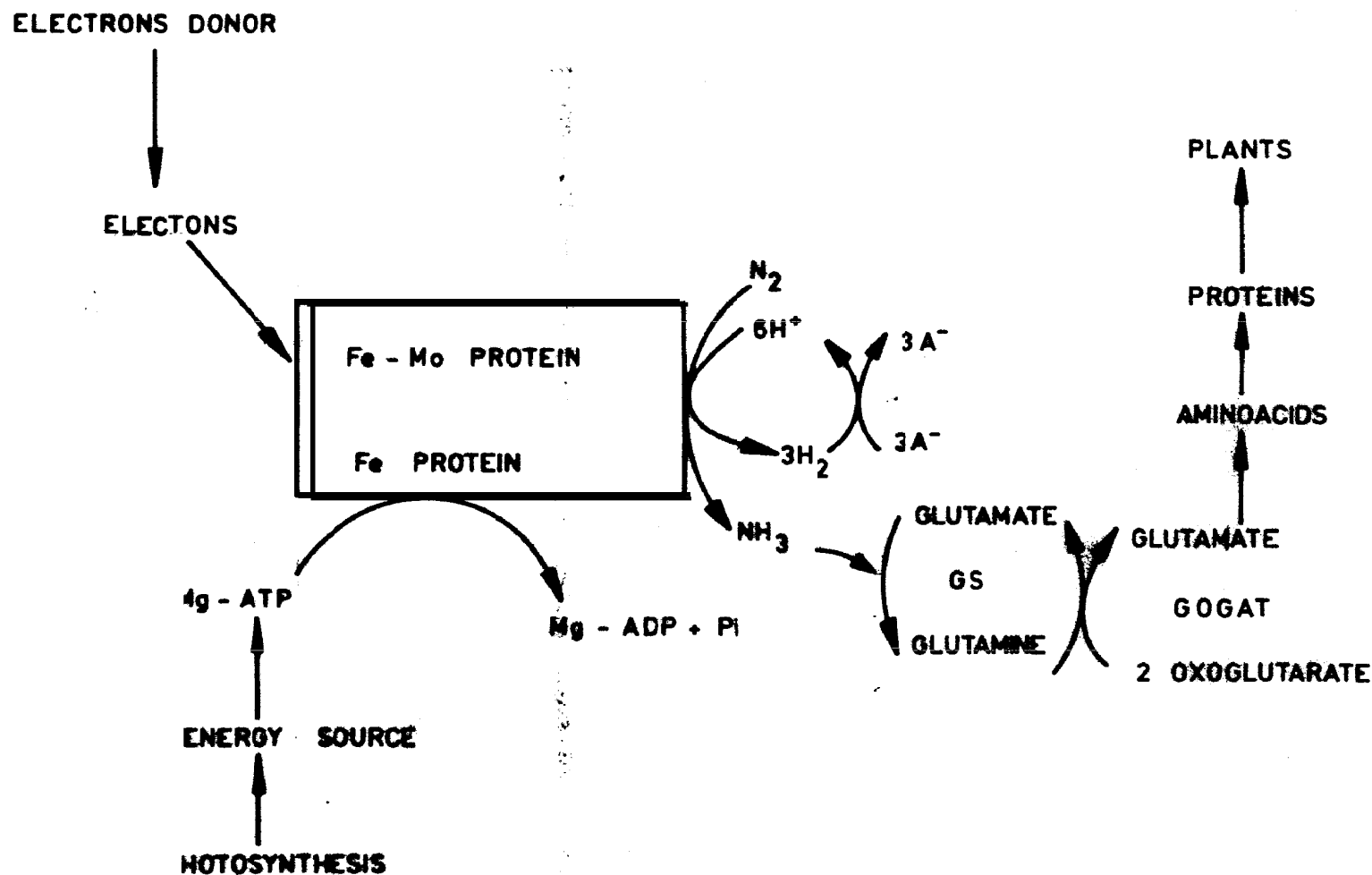


FIG. 2

SCHEME FOR BNF IN A ROOT NODULE

A = ELECTRONS ACCEPTOR

racinaire de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est recommandé.

- la souche de Rhizobium doit présenter un taux de survie très élevé dans le sol.

2.1. Sélection des souches de Rhizobium.

2.1.1. Choix des souches de Rhizobium.

Les souches de Rhizobium les plus performantes pour une légumineuse poussant dans une zone donnée sont le plus souvent celles isolées à partir de zones ayant des conditions similaires (Chatel et Greenwood, 1973; Chatel et Parker, 1973). Cependant, il n'est pas exclu de tester l'effectivité et la compétitivité des souches de Rhizobium isolées dans des zones particulières.

Bien qu'il n'y ait pas de milieu de culture sélectif pour isoler les Rhizobium, les méthodes d'isolement ont été décrites par plusieurs auteurs (Vincent, 1970).

2.1.2. Test des souches de Rhizobium en chambre de croissance et en serre .

Les premières étapes de la sélection des Rhizobium doivent être effectuées en environnement contrôlé. Plusieurs systèmes sont employés pour étudier les associations Rhizobium x légumineuses en conditions contrôlées (Vincent, 1970; Bergensen, 1980) : les tubes Gibson sont en général employés pour les petites graines alors que les jarres Léonard et les pots le sont pour les grosses graines. Quelque soit le système, les solutions utilisées pour la nutrition des plantes doivent être totalement dépourvues d'azote. Dans le cas des jarres Léonard et des pots, les plantes sont arrosées avec de l'eau stérile.

Les plantes doivent être récoltées quand des différences très nettes sont visibles entre les plantes inoculées et les plantes non inoculées. La FBA est alors estimée par le poids sec des parties aériennes et/ou l'azote total de ces parties aériennes.

2.1.3. Test des souches de Rhizobium au champ.

Les essais au champ destinés à étudier les associations Rhizobium x légumineuses représentent l'étape ultime pour estimer l'effectivité et la compétitivité d'une souche de Rhizobium ainsi que son aptitude à survivre dans le sol. Plusieurs précautions doivent être prises avant de mettre en place l'expérience au champ :

- sélection des sites : le site doit être homogène, pauvre

en azote et renfermant une faible population de Rhizobium (10^2 Rhizobium par gramme e sol).

- application des engrais : la FBA ne s'exprime pas si le sol est déficient en éléments essentiels pour la croissance des plantes.

La FBA est estimée par la nodulation, le poids sec des parties aériennes, l'azote total et le rendement en grains.

2.2. Production d'inoculum.

2.2.1. Culture des Rhizobium.

Les Rhizobium sont cultivés dans un milieu classique de Yeast Extract Mannitol (YEM) qui contient par litre d'eau distillée : mannitol : 10g; K_2HPO_4 : 0,5g; NaCl : 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2g; extrait de levure : 1g. Le pH du milieu est ajusté à 7,2.

Les Rhizobium peuvent être cultivés dans plusieurs types de récipients : erlens, ballons, fermenteurs.

2.2.2. Production en mase.

Pour avoir une culture de Rhizobium de forte concentration, on utilise un fermenteur. Une préculture dans un erlen est nécessaire avant l'utilisation du fermenteur. La préculture est ensuite transvasée dans le fermenteur à une proportion de 10%. La culture est aérée par un courant d'air stérile et la température de croissance est comprise entre 25 et 32°C.

Il y a plusieurs types de fermenteurs allant des grands prototypes sophistiqués, stérilisables à la vapeur aux fermenteurs très simples et autoclavables (Fig.3).

2.2.3. Conditionnement de l'inoculum.

Un bon support d'inoculum doit avoir un pouvoir absorbant très élevé et être non toxique aux Rhizobium, facilement stérilisable, disponible en grande quantité, peu coûteux et pouvant adhérer très facilement aux graines. Il y a plusieurs types de supports : tourbe, boue filtrée, argile, lignite, vermiculite et certains polymères comme l'alginate très récemment introduit dans le marché. Cependant, la tourbe reste le support le plus utilisé.

Au Sénégal, deux types de support sont utilisés pour conditionner les inoculums produits : la tourbe et l'alginate.

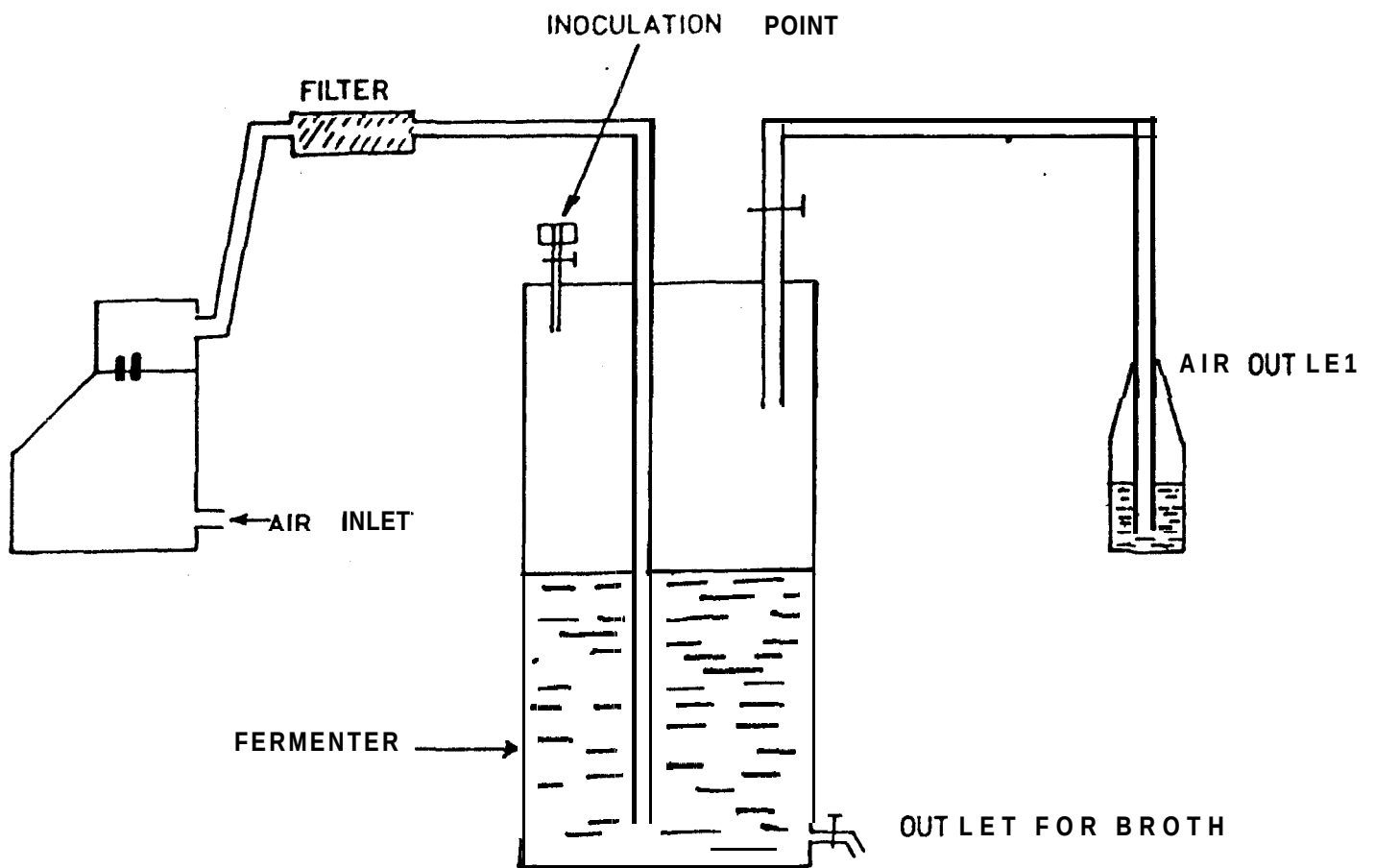


Fig. 3

**DIAGRAMMATIC REPRESENTATION OF THE
SIMPLE AUSTRALIAN FERMENTER FOR
RHIZOBIUM , (DATE 1974)**

2.2.3.1. La tourbe,

Il existe au Sénégal un très grand gisement de tourbe. Cette tourbe est très acide et nécessite une neutralisation préalable. Après séchage au soleil, la tourbe prélevée est neutralisée par addition de chaux vive dont la quantité varie en fonction de l'acidité de la tourbe prélevée. Ensuite, la tourbe est finement broyée, puis autoclavée à 120°C pendant 2h et répartie en sachets de 100, 200 et 300g. A partir du fermenteur, un volume adéquat de suspension de Rhizobium est alors introduit dans chaque sachet. Après cette opération, de petits trous d'aération sont aménagés sur les sachets avec une aiguille. Les sachets sont ensuite laissés à la température ambiante pendant 7 jours. Ils sont ensuite récupérés et conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2.3.2. L'alginate.

L'alginate est un polymère de polyacrilamide. La suspension de Rhizobium est mélangée à une solution d'alginate 4% (v/v). Ensuite, le mélange est versé goutte à goutte dans une solution de CaCl₂ 2%. Il se forme des billes d'alginate dans lesquelles les Rhizobium sont inclus. Les billes sont ensuite séchées sous un flux d'air de 20 à 30°C pendant 24h.

2.2.4. Survie des Rhizobium dans le support.

Quelque soit le support utilisé, les Rhizobium doivent conserver leur pouvoir infectieux le plus longtemps possible au cours du stockage et même après l'application dans le sol ou sur les graines. Il est nécessaire de vérifier la survie des bactéries dans l'inoculum immédiatement avant l'application de celui-ci au champ.

Les inoculums de tourbe produits au Sénégal présentent en général un taux de survie de l'ordre de 60 à 70% alors que les inoculums d'alginate ont un taux de survie de l'ordre de 80%.

3. Conclusion,

La production d'inoculum comporte de multiples et variables aspects : sélection et culture des souches de Rhizobium préparation des supports et contrôle des facteurs affectant la survie des Rhizobium dans les supports, contrôle de la qualité de l'inoculum.

Le contrôle de la qualité des inoculums est un aspect fondamental qui doit garantir l'utilisation des inoculums par les consommateurs. C'est pourquoi, il doit être effectuée par des laboratoires appartenant aux pouvoirs publics en vue d'apporter un cachet officiel à l'utilisation de tout inoculum produit ou introduit.

Au Sénégal, un programme de contrôle de la qualité des inoculums de Rhizobium a été mis en place à l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), dans le cadre du programme MIRCEN.

Bibliographie.

- BERGENSEN, F.J. 1980 Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley and Sons, Chichester, U.K.
- BURNS, R.C. and HARDY, R.W.F. 1975 Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 189 p.
- CHATEL, D.L. and GREENWOOD, R.M. 1973 Soil Biol. Biochem. 5, 809.
- CHATEL, D.L. and PARKER, C.A. 1973 Soil Biol. Biochem. 5, 425.
- DATE, R.A 1974 Legume inoculant production. Proc. INSA. 40, 667-686.
- VINCENT, J.M. 1970 A manual for the practical of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15 Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburg. 164 pp.
-