Afrique SCIENCE *16(1) (2020) 300 - 306*
ISSN 1813-548X, http://www.afriquescience.net

Isolement et caractérisation physiologique de rhizobactéries d'oignon cultivé dans la zone vallée Fleuve Sénégal

Seydina Omar NDIAYE[1], Adama DIOUF[1,2*], Fatou NDOYE[2,3], Ibrahima DIOP[2], Oumar TOURE[2], Malick NDIAYE[1] et Tahir Abdoulaye DIOP[1]

[1] Laboratoire de Biotechnologies des Champignons, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005, Dakar, Sénégal.
[2] Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel Air, BP 1386, Dakar Sénégal
[3] Laboratoire de Microbiologie, Université Sine Saloum El hadji Ibrahima Niass, Kaolack, Sénégal

* Correspondance, courriel : *adama1.diouf@ucad.edu.sn*

Résumé

La culture de l'oignon pour satisfaire les besoins du marché local au Sénégal est caractérisée par une large utilisation de fertilisant chimique avec comme conséquence une dégradation de l'environnement. Pour remédier à cette situation, l'utilisation de biofertilisant est préconisée. Des échantillons composites de sol ont été prélevés dans les champs de culture d'oignon de la zone agro-écologique Vallée Fleuve Sénégal pour l'isolement et la caractérisation de rhizobactéries. La production d'auxine, l'indice de solubilisation du phosphore et le comportement des souches vis-à-vis des facteurs abiotiques tels que le pH, la température et la salinité ont été déterminés. Au total, 49 souches de « *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* » (PGPR) phénotypiquement distinctes ont été isolées de la rhizosphère de l'oignon. Les souches performantes aux intéressantes propriétés favorisant la croissance des plantes (*Plant Growth Promoting* : PGP) ont été sélectionnées. Ainsi la production d'auxine a été notée chez 34 souches, avec un maximum de 1250 ng/mL alors que seul 4 souches solubilisent le phosphore. En somme, les souches de rhizobactéries aux caractères agro-physiologiques leurs permettant de résister aux facteurs contraignants de l'environnement et d'améliorer la croissance de l'oignon ont été mises en collection pour leur utilisation dans des essais d'inoculation en milieu réel.

Mots-clés : *activité PGP, biofertilisant, oignon, Sénégal.*

Abstract

Isolation and physiological characterization of onion rhizobacteria grown in the Senegal River Valley area

Onion production to meet the needs of Senegalese local market is characterized by a wide use of chemical fertilizer which results in a degradation of the environment. To mitigate this situation, the use of biofertilizer is recommended. A composite soil sample was taken from onion cultivation fields in the agro-ecological zone of the Senegal River Valley for isolation and characterization of rhizobacteria. Auxin production, solubilization index of phosphorus and the behavior of the strains with respect to abiotic factors such as pH, temperature

and salinity were determined. A total of 49 phenotypically distinct Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) strains are isolated from the rhizosphere of the onion. Successful strains with interesting Plant Growth Promoting (PGP) properties are selected. Thus auxin production was observed in 34 strains, with a maximum of 1250 ng/mL whereas only 4 strains solubilize P. In short, rhizobacterial strains with agro-physiological characters that enable them to withstand environmental constraints and to improve onion growth are collected for use in inoculation trials in the field.

Keywords : *PGP activity, biofertilizer, onion, Senegal.*

1. Introduction

L'oignon est cultivé essentiellement dans les zones agro-écologiques Niayes et Vallée Fleuve Sénégal. Cependant, les besoins en consommation de la population sont loin d'être couverts. Face à cette situation, les producteurs font recours à une forte utilisation d'engrais chimiques dont les effets néfastes entrainent une pollution des eaux souterraines associée à une dégradation des sols. Toutefois, du fait du coût exorbitant de ces fertilisants minéraux et de l'impossibilité de mise en jachère des terres agricoles dans ces zones, certains producteurs font recours systématiquement à la fertilisation organique. Cette dernière, en plus d'apporter des éléments nutritifs, est au cœur du développement de l'activité biologique des sols [1, 2]. Ainsi, l'activité des microorganismes naturellement établis dans les sols permet une amélioration de la qualité des sols agricoles. Ces microorganismes présentant d'énormes potentialités sont constitués essentiellement de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes appelés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Ainsi, la grande diversité fonctionnelle de ces bactéries permet à celles-ci d'agir directement ou indirectement comme biofertilisatrices, phytostimulatrices et phytoprotectrices [3, 4]. En effet, les PGPR participent à la biosynthèse des sidérophores, de l'acide indole acétique (AIA) et des exo-polysaccharides, à la solubilisation du phosphore et à la protection des plantes contre les pathogènes du sol. Plusieurs auteurs ont montré une amélioration de la croissance et de la productivité de l'oignon cultivé sous inoculation rhizobactérienne [5 ; 6]. Des essais menés au champ ont montré que l'apport d'inocula de différentes souches de PGPR avait un effet positif sur le développement, la qualité des bulbes et le rendement de la culture d'oignon. L'objectif de cette présente étude est d'isoler des bactéries du sol rhizosphérique de l'oignon et de déterminer leurs caractères agronomiques intéressants en vue de leur utilisation comme biofertilisant.

2. Matériel et méthodes

2-1. Isolement des bactéries

Les échantillons de sols rhizosphériques de l'oignon ont été prélevés dans l'horizon 0 à 20 cm de trois sites de la zone Vallée fleuve Sénégal : Ndioum, Cambou-Ngonaké et Léyoukouré. Pour chaque localité, quatre échantillons recueillis ont été mélangés et homogénéisés par tamisage. Un aliquote de 10 g de chaque sol a été dilué dans 90 mL d'un tampon phosphate de composition en g/L : NaCl 8 ; KCl 0,2; Na_2HPO_4 1,44 ; KH_2PO_4 0,24. La dilution obtenue après une heure d'agitation a été décantée pendant 30 mn. Un volume de 100 µl du surnageant a été récupéré dans un tube Eppendorf contenant 900 µL de la solution tampon. Ainsi une série de dilutions au dixième de 10^{-1} à 10^{-5} a été effectuée pour chaque suspension de sol. Un aliquote de 100 µl de chaque niveau de dilution a été ensemencé sur milieu *Tryptic Soy Agar* (TSA) en boîte de Petri et répété trois fois. Les boîtes ensemencées sont mises en incubation pendant 24 h à l'étuve bactériologique (28°C). Les différentes colonies bactériennes notées ont été purifiées. Les souches obtenues sont conservées à -80°C dans du glycérol 60 %.

2-2. Évaluation des caractères PGP des souches bactériennes

L'étude de caractères PGP a porté sur la capacité à synthétiser de l'auxine (Acide Indole Acétique) et à solubiliser le phosphore.

- *Production d'auxine*

La capacité de production d'auxine par les souches bactériennes a été testée selon la technique décrite par [7]. A partir de la culture liquide de chaque souche, 25 µL ont été ensemencés dans 4 mL de milieu Luria Bertani (LB) supplémenté avec 1 g de tryptophane. Après 48 h d'incubation à température ambiante, 2 mL de la culture liquide ont été centrifugés à 8000 rpm pendant 10 mn. Un millilitre du surnageant a été mélangé à 2 mL du réactif de Salkowski et exposé à l'obscurité pendant 30 mn. Pour chaque isolat, trois répétitions ont été faites. La production d'auxine est révélée par une coloration rose du mélange dont l'intensité de cette coloration a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Une estimation de cette production d'auxine a été effectuée par comparaison à une courbe standard établie à partir d'une solution mère d'auxine.

- *Solubilisation du phosphore*

Le pouvoir de solubilisation du phosphore des isolats a été testé sur du milieu solide gélosé de Pikovskaya [8] contenant du phosphate tricalcique [$Ca_3(PO4)_2$]. A partir de la culture bactérienne, une goutte de 5 µL de chaque isolat a été délicatement ensemencée sur milieu de Pikovskaya. L'incubation des boites de Petri a été faite à 28°C ± 2°C pendant 12 jours. Trois répétitions ont été effectuées par isolat et incubées à 28°C pendant 12 jours. La capacité des souches bactériennes à solubiliser le phosphate se traduit par l'apparition d'un halo translucide autour de la colonie. Le diamètre du halo a été déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie de celui de l'ensemble constitué par la colonie et le halo [9]. L'indice de solubilisation (IS en mm) a été calculé par la ***Formule*** décrite par [10].

$$IS = \frac{\text{diamètre de la colonie+diamètre du halo transparent}}{\text{diamètre de la colonie}} \quad (1)$$

2-3. Tests de tolérance aux facteurs stressants

Les isolats présentant des caractères PGP intéressants ont été sélectionnés et soumis à d'autres tests relatifs à leur comportement vis à vis de certains facteurs abiotiques tels que le pH, la salinité et la température. Le milieu de culture TSA a été utilisé pour l'étude des différents types de stress. Pour l'étude de l'effet du pH, les souches sont ensemencées sur milieu gélosé en boîtes de Petri à pH 4,5 ; 5 ; 6 ; 8 ; 9 et 10 puis mises en incubation à 28°C à l'étuve bactériologique. De même pour le stress salin, les souches sont cultivées sur milieu TSA contenant 16 ; 32 ; 56 ; 80 ; 104 ; 126 et 160 g NaCl/L et incubées à 28°C. Enfin pour l'effet de la température, les boîtes sont ensemencées sur milieu gélosé et mises en incubation à différents niveaux de température compris entre 6 et 52°C. Pour tous ces paramètres, les boîtes de culture sont mises en incubation pendant 7 jours et observées quotidiennement pour répertorier la croissance bactérienne.

2-4. Analyses statistiques

Les données traitées à l'aide du logiciel R ont été soumises à l'analyse de variance au seuil de 5 %. Le test HSD de Tukey a été utilisé pour classer les souches en différents groupes.

3. Résultats

3-1. Isolement des souches

Des colonies bactériennes nettes, distinctes et séparées ont été observées dans tous les niveaux de dilutions à l'exception de la dilution 10^{-5}. Différents types de colonies ont été sélectionnées sur la base de leurs caractères morphologiques tels que la taille, la couleur, la forme, la surface et la consistance. Au total 49 souches phénotypiquement distinctes ont été retenues après purification.

3-2. Synthèse d'auxine

Les résultats ont montré un divers degré de synthèse d'auxine de 34 souches ***(Figure 1)***. L'analyse de variance a révélé une différence très significative pour la concentration en auxine synthétisé par les souches au seuil de probabilité de 5 %. Selon le test HSD de Tukey, 5 groupes de souches ont été identifiés. Un groupe de 4 souches a présenté la plus grande quantité d'auxine synthétisé avec des concentrations avoisinant 1250 ng/mL. Le groupe de souches le plus représentatif (58,82 %) a synthétisé les plus faibles concentrations d'auxine, estimées en moyenne à 220 ng/mL.

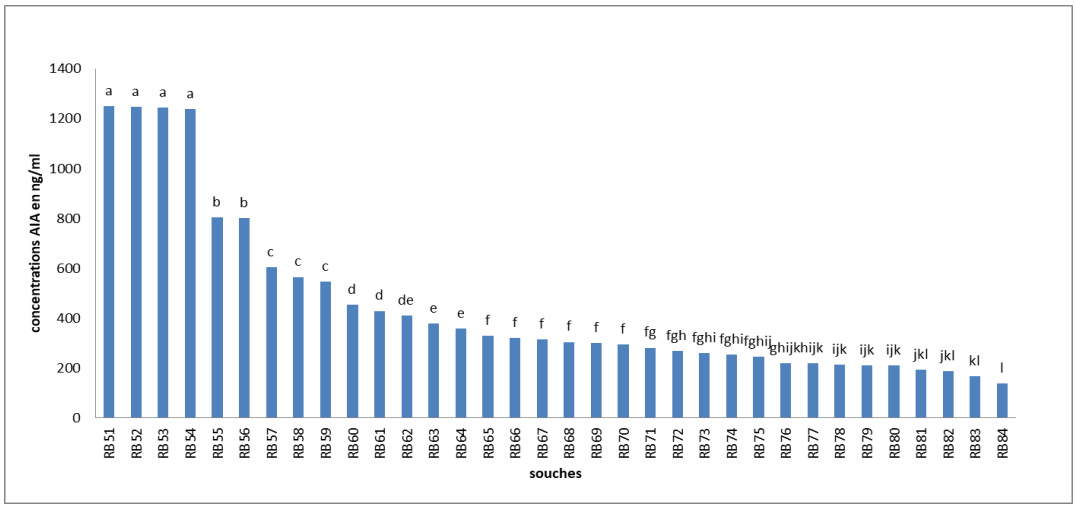

Figure 1 : *Production d'auxine des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de l'oignon*

3-3. Solubilisation du phosphore

La culture des 34 souches productrices d'auxine sur milieu Pikovskaya a montré qu'un faible nombre de rhizobactéries était capable de solubiliser le phosphore. Seules, quatre souches ont présenté un halo autour de la colonie bactérienne indiquant ainsi une capacité de solubilisation de P du phosphate tricalcique. Ces souches ont montré des indices de solubilisation du P très proches comprises entre 2,4 et 2,9.

3-4. Comportement des souches vis-à-vis de facteurs abiotiques

- *Effet du pH sur le développement des souches*

L'analyse des résultats a montré un effet des différents pH sur le comportement des souches testées. La plus grande partie des souches (76 %) se sont développées aux pH 6 et pH 8 avoisinant la neutralité correspondant au pH idéal pour la culture bactérienne. Environ 35 % des souches se sont développées à pH 5. Au même moment, aucune souche n'a résisté dans le milieu très acide à pH 4,5 alors que 15 % des souches ont pu survivre en milieu alcalin à pH 10.

- *Effet de la température sur le développement des souches*

A l'exception de la température d'isolement (28°C), les taux de développement les plus importants sont obtenus dans la gamme immédiate de températures supérieures à 28°C. La température de 36°C s'est également révélée être favorable à la croissance bactérienne avec un taux de croissance de 97 %. A la température de 48°C, des colonies bactériennes ne sont observées que sur 12 % des cultures en boîte de Petri. Ces dernières se sont développées à 42°C. En revanche, aucune souche n'a pu se développer à la température de 52°C qui a constitué le niveau extrême appliqué lors de cette étude.

- *Effet de la salinité sur le développement des souches*

L'augmentation de la teneur en sel du milieu de culture a réduit progressivement le niveau de développement des bactéries. Lorsque les souches sont ensemencées dans un milieu contenant 16 g NaCl/L, environ 24 % des bactéries sont affectées par la salinité. Le taux de survie le plus faible (18 %) est noté à la concentration de 126 g NaCl/L. A la teneur en sel de 160 g NaCl/L, une absence totale de colonies bactériennes est constatée sur les milieux de culture ensemencés.

4. Discussion

Généralement, les pratiques culturales affectent négativement les terres du fait de l'utilisation de fertilisants chimiques, de pesticides et de mauvais systèmes d'irrigation dans les périmètres maraîchers. A cela s'ajoutent très souvent des facteurs environnementaux défavorables. De nos jours, un grand intérêt est porté sur les biotechnologies microbiennes pour le développement d'une agriculture durable [4, 11]. Ainsi, l'usage des inocula microbiens est préconisé à travers le monde pour réduire l'emploi de produits chimiques et atténuer leurs effets néfastes sur le sol, l'environnement et les produits agricoles. Plusieurs études ont montré que l'adaptation des plantes à leur milieu est guidée par une diversité génétique des microorganismes qui leur sont étroitement associés [12]. Dans le cadre de la présente étude, l'isolement de 49 souches bactériennes atteste de la grande diversité morphologique des bactéries dans la rhizosphère de l'oignon. Un screening basé sur les propriétés physiologiques d'intérêt agronomique est effectué sur les microorganismes isolés de la zone de culture de l'oignon. Ainsi, une collection de 34 souches sélectionnées pour leurs caractères promoteurs de la croissance des plantes sont mises en place. Ces souches de PGPR ont présenté une très grande diversité phénotypique et fonctionnelle. Des résultats similaires sont rapportés par plusieurs auteurs qui ont montré une corrélation entre la biodiversité des rhizobactéries et la diversité d'actions biotiques dans les écosystèmes terrestres [13]. Spécifiquement, [14] ont décrit les bactéries solubilisatrices de phosphore (BSP) comme étant un groupe constitué d'espèces hétérogènes réparties dans plusieurs genres. La diversité des rhizobactéries ainsi que leurs activités sont également affectées positivement ou négativement par les facteurs du milieu comme en attestent les travaux de [15, 16]. Selon ces derniers, la salinité affecte négativement l'abondance, la diversité, la composition et le fonctionnement des microorganismes du sol. La présente étude a montré que le nombre de souches de la collection susceptibles de solubiliser le P est relativement très faible (11,76 %) avec un même niveau de capacité à solubiliser le phosphore évalué par leurs indices de solubilisation. En effet, ces résultats ne sont pas en adéquation avec les données souvent rapportées sur les populations bactériennes capables de solubiliser le phosphore qui est plus importante dans les sols agricoles. Récemment, les résultats des travaux de [14] stipulent que les microorganismes solubilisant le phosphore représentent 20 à 40 % de la population de microbienne. Au Sénégal, des travaux de [17] ont montré une forte présence de bactéries solubilisatrices du phosphore (BSP) dépassant log 5,24 UFC/g de sol dans la zone des Niayes. L'utilisation de la capacité biosynthétique de l'auxine comme outil de sélection de souches PGPR efficaces a été préconisée par plusieurs auteurs [18]. Dans le cadre de nos

travaux, il a été observé une capacité productrice d'auxine chez les souches sélectionnées à différentes concentrations. Ainsi, on peut prendre en considération les souches les plus efficaces pouvant produire jusqu'à 1250 ng/ml surtout lorsqu'elles associent ce caractère à la résistance à un ou plusieurs facteurs contraignants du milieu. Certaines souches ont aussi montré des niveaux de résistance intéressante vis-à-vis des facteurs stressants du milieu. Celles-ci seraient de potentiels candidats à l'inoculation des cultures d'oignon dans les sols dégradés. La capacité de certaines souches à résister aux milieux fortement salinisés, acides ou alcalins constitue un atout pour la sélection de souches élites pour la production d'inoculum. Dans ce cadre, les travaux de [19] ont montré que l'adaptation et le développement des végétaux sur des sols salés seraient facilités par l'apport de PGPR. Dans le même sens, les travaux de [20] avaient montré que les rhizobactéries pouvaient aider les plantes à tolérer les stress alcalins et salins et supplier leur déficience en nutriments. Par ailleurs, la plupart des rhizobactéries testées résistent aux températures moyennes locales généralement enregistrées dans la zone d'étude. Tenant compte des conditions climatiques dans les zones de culture de l'oignon, la température ne peut alors constituer une contrainte majeure pour les bactéries rhizosphériques. Ces dernières peuvent potentiellement contribuer à l'atténuation des effets néfastes des températures stressantes sur les cultures en leur procurant des nutriments supplémentaires. La collection de germplasms rhizobactériens capables de produire de l'auxine et solubiliser le phosphore, constitue un atout pour la production d'inoculum. Les caractères PGP des souches couplés à leurs capacités à résister aux facteurs abiotiques stressants de leur environnement permettent ainsi d'accroître leurs potentialités agronomiques en milieu paysan.

Références

[1] - A. BATIONO, F. LOMPO, S. KOALA, Research on nutrient flows and balances in West Africa: state-of-the art. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 71 (1998) 19 - 35

[2] - L. HAN, K. SUN, J. JIN, B. XING, Some concepts of soil organic carbon characteristics and mineral interaction. *Soil Biol. and Biochem.,* 94 (2016) 107 - 121

[3] - E. SOMERS, J. VANDERLEYDEN, M. SRINIVASAN, Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30 (2004) 205 - 240

[4] - M. AHEMAD, M. KIBRET, Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sc.*, 26 (2014) 1 - 20

[5] - P. VERMA, J. YADAV, K. NATH, T. LAVAKUSH, V. SINGH, Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. *Intern. J. Agric. Research,* 5 (2010) 954 - 983

[6] - J. COLO, HAJNAL-JAFARITI, S. DURIC, D. STAMÉNOV, S. HAMIDOVIC, Plant Growth Promotion Rhizobacteria in Onion Production. *Polish Journal of Microbiology*, 63 (2014) 83 - 88

[7] - G. SIDDHI, M. K. MEENA, S. DATTA, Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant *Chlorophytum borivilianum* and in-vitro screening for activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA production. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3 (2014) 1082 - 1090

[8] - R. I. PIKOVSKAYA, Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17 (1948) 362 - 370

[9] - C. NGUYEN, W, YAN, F. LE TACON, F. LAPEYRIE, Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil,* 143 (1992) 193 - 199

[10] - M. A. EDI-PREMONO, P. L. MOAWAD, G. VLECK, Effect of phosphate solubilising *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indon J. Crop Sci.*, 11 (1996) 13 - 23

[11] - M. V. B. FIGUEIREDO, L. SELDIN, F. F. ARAUJO, R. L. R. MARIANO, Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications D.K. Maheshwari (ed.) *In* Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 18 (2010)

[12] - R. RODRIGUEZ, R. REDMAN, More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J. Exp. Bot.*, 59 (2008) 09 - 14

[13] - P. DIBY, Y. R. SARMA, V. SRINIVASAN, J. M. ANANDARA, *Pseudomonas fluorescens* mediated vigour in black pepper (*Piper nigrum* L.) under greenhouse cultivation. *Ann Microbiol,* 55 (3) (2005) 171 - 74

[14] - M. SOLANKI, B. S. KUNDU, K. NEHRA, Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals of Agrarian Science*, 16 (2018) 458 - 463

[15] - J. BORNEMAN, P. W. SKROCH, K. M. O'SULLIVAN, J. A. PALUS, N. G. RUMJANEK, J. L. JANSEN, J. NIENHUIS, E. W. TRIPLETT, Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and environmental microbiology*, 62 (6) (1996) 1935 - 1943

[16] - D. N. RIETZ, R. J. HAYNES, Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 (2003) 845 - 854

[17] - A. DIOUF, M. NDIAYE, A. KANE, M. A. FALL-NDIAYE, T. A. DIOP, Influence of green manure from inoculated gliricidia on rhizobacterial population in the rhizosphere of maize. *Inter. J. Cur. Sci.,* 11 (10) (2019) 7450 - 7453

[18] - A. KHALID, M. ARSHAD, Z. A. ZAHIR, Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (3) (2004) 473 - 480

[19] - N. K. ARORA, S. TEWARI, S. SINGH, N. LAL, D. K. MAHESHWARI, PGPR for protection of plant health under saline conditions. In *Bacteria in agrobiology: stress management*. Springer, Berlin, Heidelberg, (2012) 239 - 258

[20] - B. R. GLICK, Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research,* 169 (2014) 30 - 39