

# **Etudes de diverses souches d'*Azospirillum* isolées au Sénégal : effet de l'inoculation par ces souches d'un système « sol-riz » non stérile**

Daniel GAUTHIER  
Gérard RINAUDO  
Microbiologistes ORSTOM  
Laboratoire de Biologie des Sols  
ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

## **Résumé**

*Nous avons étudié 32 souches d'Azospirillum isolées, pour la plupart, de l'endorhizosphère du riz. Ces souches se différencient nettement par leur sensibilité à l'oxygène en conditions de fixation d'azote ( $pO_2$  optimales entre 0,5 et 2 %  $O_2$ ), leur ARA spécifique maximale (2 à 64 nmoles  $C_2H_4$  par mn et par mg de protéines) et leur capacité à utiliser le glucose et la pectine comme seule source de carbone.*

*Les résultats obtenus, lors de l'inoculation d'un système « sol-riz » non stérile par ces souches, montrent que l'ARA rhizosphérique du riz peut être modifiée par l'introduction d'une souche d'Azospirillum. Les différences d'ARA rhizosphériques entre les systèmes inoculés et le témoin non inoculé, varient de + 60 % à - 80 % selon les souches. Cependant, la réponse à l'inoculation peut être très différente d'un sol à l'autre.*

**Mots-clés :** Endorhizosphère - Activité Réductrice d'Acétylène (ARA) - *Azospirillum* - Riz.

## **Abstract**

A STUDY OF VARIOUS AZOSPIRILLUM STRAINS ISOLATED IN SENEGAL : THE EFFECT OF INOCULATION OF A NON-STERILE RICE-SOIL SYSTEM BY THESE STRAINS.

*32 Azospirillum strains (most of them being isolated from the rice rhizosphere) were studied. These strains were sharply differentiated by their oxygen sensibility in nitrogen fixing conditions (optimal  $O_2$  concentration between 0,5 and 2 %  $O_2$ ), their optimal specific ARA (from 2 to 64 nmoles  $C_2H_4$  per mn and per mg protein) and their ability to use glucose and pectine as sole carbon source.*

*Inoculation with Azospirillum strains could either increase (+ 60 %) or decrease (- 80 %) rhizospheric ARA of rice grown in a non sterile soil. Such a response was shown to vary with soil type investigated.*

**Key words :** Endorhizosphere - Acetylene Reduction Activity (ARA) - *Azospirillum* - Rice.

## **I. INTRODUCTION**

Depuis que DOBEREINER et DAY (1975) ont mis en évidence le rôle de *Spirillum lipoferum* dans l'activité réductrice d'acétylène (ARA) dans la rhizosphère de *Digitaria*, de nombreuses études ont été consacrées à ce microorganisme que l'on retrouve fréquemment dans les régions tropicales (DOBEREINER *et al.*, 1976). Sa présence a été notamment observée dans les racines du riz (LAKSHIKUMARI *et al.*, 1976 ; NAYAK et RAJARAMAMOHAN RAO, 1977).

Au cours d'une étude prospectrice sur les sols de rizière du Sénégal (RINAUDO, non publié), il a été constaté que ce microorganisme était très fréquent dans l'endorhizosphère du riz (88 % des échantillons analysés). Nous avons constitué une collection de 32 souches d'*Azospirillum* provenant, pour la plupart, de l'endorhizosphère du riz (l'endorhizosphère se définissant comme l'ensemble des cellules du cortex racinaire et des microorganismes hétérotrophes qui le colonisent). Nous avons entrepris une étude som-

maire de quelques caractères physiologiques des souches isolées (utilisation du glucose et de la pectine comme source de carbone, activité réductrice d'acétylène, sensibilité à l'oxygène) ainsi que leur aptitude à modifier par inoculation l'ARA rhizosphérique d'un système sol-riz non stérile.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. SOUCHES BACTÉRIENNES

Sur les 32 souches d'*Azospirillum* utilisées, 27 ont été isolées à partir de l'endorhizosphère du riz, 3 de l'endorhizosphère du mil (souches 20, 21, 27) et 2 de l'endorhizosphère du maïs (souches 28, 29).

### 2.2. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

La base saline des différents milieux utilisés est celle du milieu Kalininskaya (milieu K) (BIGGINS, 1969). Le pH est ajusté à 6,8. A cette base saline est ajouté du DL-malate de sodium 20 mM, du glucose 2 g/l ou de la pectine 1,5 g/l en présence ou non de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM. Les cultures sont faites en milieu liquide agité pendant 20 h à 30° C.

### 2.3. MESURE DE L'ARA SPÉCIFIQUE

L'ARA spécifique est mesurée sur des cellules entières par la méthode de la réduction de l'acétylène (POSTGATE, 1972). Elle est exprimée en nmoles d'éthylène produit par mn et par mg de protéines dosées par la méthode de LOWRY *et al.*, (1951).

Une préculture en phase exponentielle en milieu riche (nutrient broth) est centrifugée, lavée et resuspendue, dans le milieu K + malate sans azote, à une concentration de  $2,5 \cdot 10^7$  cellules/ml (GAUTHIER, 1978). 25 ml de cette suspension bactérienne sont mis dans un flacon sérum de 150 ml. L'atmosphère du flacon est remplacée par de l'argon, puis on y ajoute différentes quantités d'oxygène (0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 5 %). Les flacons sont agités 3 h à 30° C puis on ajoute 10 % d'acétylène. La production d'éthylène est linéaire pendant 3 h.

### 2.4. SOLS

Nous avons utilisé le sol de la station ORSTOM de Bel Air (Sénégal), et le sol « gris » de Casamance (Sénégal). Les caractéristiques de ces sols sont rapportées dans le tableau I. Ces sols n'ont pas été stérilisés.

### 2.5. VARIÉTÉ DE RIZ

Morobérékan.

### 2.6. MESURES DE L'ARA RHIZOSPHERIQUE

Elles ont été faites sur des systèmes sol-riz au stade plantule de 3 semaines (tubes de 14 × 220 mm comprenant environ 20 g de sol). L'incubation sous acétylène a été effectuée au moyen d'un dispositif dans lequel le système racinaire est placé en anaérobiose, et les parties aériennes dans l'air (RAIMBAULT *et al.*, 1977). L'ARA rhizosphérique est exprimée en nmoles d'éthylène formé par plante et par heure.

TABLEAU I

Caractéristiques des sols utilisés

Caractéristiques	Sol de Casamance	Sol de Bel Air
● Texture (en $10^{-2}$ du sol sec)		
Argile 0 à 2 $\mu$	3,6	3,6
Limon fin 2 à 20 $\mu$	18,6	1,8
Limon grossier 20 à 50 $\mu$	31	1,5
Sable fin 50 à 200 $\mu$	35	53,6
Sable grossier 200 à 2.000 $\mu$	10,2	38,6
● pH	5,2	7,5
● Matière organique (en $10^{-3}$ du sol sec)		
C	3,1	3
N	0,25	0,27
C/N	12,5	11,1
● $\text{P}_{205}$ total (en $10^{-3}$ de sol sec)	0,105	0,430

### 2.7. INOCULATION DU SYSTÈME SOL-RIZ NON STÉRILE

Les cultures d'*Azospirillum* ont été lavées dans un tampon phosphate (0,04 M ; pH 7) puis incorporées à de la tourbe. Cet inoculum a été mélangé au sol non stérile (à raison de  $3 \times 10^8$  bactéries par gramme de sol) immédiatement avant la mise en place des graines de riz prégermées. Les témoins ont reçu un inoculum autoclavé de manière à ce que les quantités d'azote apporté soient identiques pour tous les traitements. Nous avons effectué 12 répétitions par traitement.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. UTILISATION DU GLUCOSE ET DE LA PECTINE COMME SOURCE DE CARBONE

Le glucose étant un exsudat majeur du riz (BOUREAU, 1977) nous avons étudié l'aptitude de ces diverses souches à utiliser ce substrat comme source de carbone. Dix sept souches utilisent bien ce substrat.

La capacité d'utiliser la pectine comme source de carbone nous a semblé intéressante. En effet cela pourrait permettre aux bactéries de pénétrer à l'intérieur des racines, au niveau des lamelles mitoyennes des cellules du cortex racinaire (UMALI-GARCIA *et al.*, 1978). Douze souches utilisent bien la pectine comme source de carbone. Les taux de croissance mesurés à 30° C varient de 0,25 à 0,33 divisions par heure selon les souches.

#### 3.2. EFFET DE LA TENSION D'OXYGÈNE SUR L'ARA SPÉCIFIQUE

TABLEAU II

ARA spécifique de quelques souches d'*Azospirillum* en fonction de la tension d'oxygène

Souches	ARA spécifiques à différentes tensions d'O <sub>2</sub> (nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mn/mg protéines)			
	0,5 % O <sub>2</sub>	1 % O <sub>2</sub>	2 %	5 % O <sub>2</sub>
R 07	8	39	47	< 0,5
DK 27	54	31	4,5	< 0,5
O 72	18	20	7	4
BK 85	< 0,5	57	4	< 0,5
DK 93	< 0,5	21	2	< 0,5
A 95	33	12	2	< 0,5

Bien que toutes les souches étudiées soient microaérophiles, la tension d'oxygène pour laquelle l'ARA spécifique est maximale (pO<sub>2</sub> optimale) varie suivant les souches considérées (Tabl. II). Sur la figure 1 on a porté, pour chaque souche, l'ARA spécifique maximale et la tension d'oxygène lui correspondant. On constate que les ARA spécifiques maximales varient de 2 à 64 nmoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> formées par mn et par mg de protéine et qu'elles sont situées à des tensions d'oxygène comprises entre 0,5 et 1,5 %.

#### 3.3. INOCULATION DU SYSTÈME SOL-RIZ PAR 32 SOUCHES D'AZOSPIRILLUM

L'introduction de souches d'*Azospirillum* dans le sol peut modifier profondément l'ARA rhizosphérique. En effet celle-ci varie entre 35 et 305 nmoles de

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> par plante et par heure suivant les souches introduites, le témoin avec bactéries autoclavées, atteignant 190 nmoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> par plante et par heure.

Il n'y a pas de corrélation entre l'ARA rhizosphérique et l'aptitude des souches introduites à utiliser le glucose ou la pectine comme source de carbone. Il semble en revanche qu'il y ait une corrélation négative entre l'ARA rhizosphérique et l'ARA spécifique des souches introduites. En effet le test de corrélation de SPEARMAN indique que pour 32 données, la valeur critique au risque de 5 % est de 0,351 ; nous avons trouvés des valeurs de - 0,432 pour l'ARA spécifique optimale et de - 0,518 pour l'ARA spécifique déterminée à une tension d'oxygène de 1 %.

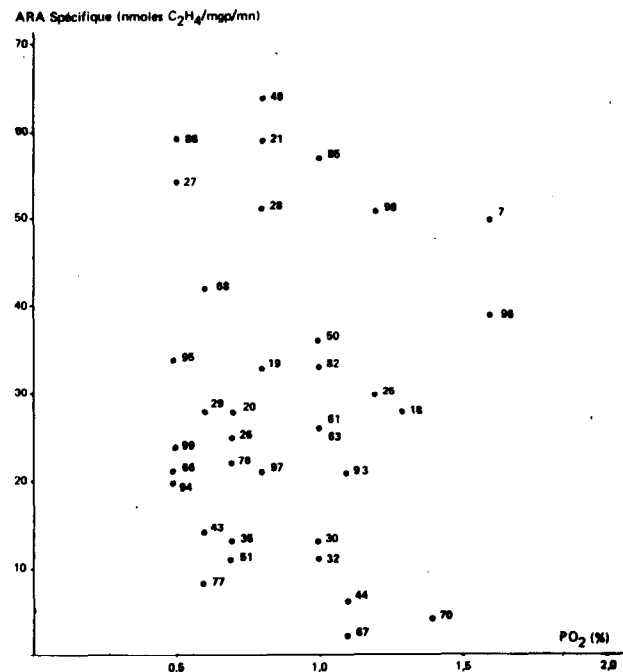


FIG. 1. - ARA spécifique de 32 souches d'*Azospirillum* placées à leur pO<sub>2</sub> optimale. Abscisses : pO<sub>2</sub> (%) ; Ordonnées : ARA spécifique (nmoles c<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg P/mn).

Sur la figure 2, on a reporté l'ARA rhizosphérique en fonction de l'ARA spécifique des souches, déterminée sous une tension d'oxygène de 1 %. Nous remarquons, en particulier, que l'ARA rhizosphérique la plus forte a été obtenue par inoculation du sol avec la souche DK 93, qui est la seule souche de la collection à avoir été isolée de l'endorhizosphère du riz planté sur le sol de Bel Air ; elle est probablement parfaitement adaptée à ce sol.

L'effet de l'inoculation du riz, par une souche donnée, peut varier considérablement en fonction du sol. Le tableau III donne quelques exemples d'inoculation sur deux sols différents.

On constate en particulier que la souche DK 93, qui augmente l'ARA rhizosphérique dans le sol de Bel Air, ne la modifie pas dans le sol gris de Casamance. Quant à la souche BK 85, elle augmente l'ARA rhizosphérique dans le sol gris et la diminue dans le sol de Bel Air.

TABLEAU III

Influence du sol sur l'ARA rhizosphérique lors de l'inoculation par différentes souches d'*Azospirillum* (nmoles  $C_2H_4$ /mg P/mn)

Souches	ARA rhizosphérique nmoles $C_2H_4$ /plante/h	
	Sol de Bel Air (Dakar)	Sol Gris (Casamance)
Témoin	190 ± 74	60 ± 50
R 07	58 ± 35	50 ± 37
S 28	194 ± 60	86 ± 42
BK 85	35 ± 22	124 ± 45
DK 93	304 ± 118	43 ± 26
R 30	208 ± 55	50 ± 20
SD 51	258 ± 74	106 ± 50

#### 4. CONCLUSION

Les souches d'*Azospirillum* étudiées se différencient nettement les unes des autres pour les caractères physiologiques analysés. Bien que le glucose soit un exsudat majeur de la rhizosphère du riz, seulement 17 souches peuvent l'utiliser comme source de carbone. Quant à la pectine, elle est utilisée comme source de carbone par 12 souches sur 32. Les ARA spécifiques mesurées sont très variables selon les souches (2 à 64 nmoles  $C_2H_4$  par mn et mg de protéine) et, bien que ces souches soient toutes microaérophiles, leur sensibilité à l'oxygène est différente.

Les essais d'inoculation d'un système « sol-riz » non stérile montrent qu'il est possible de modifier l'ARA rhizosphérique du riz, en introduisant une souche d'*Azospirillum*. Sur le sol de Bel Air, il a été observé une corrélation négative entre l'ARA spécifique des souches déterminée sous une tension de

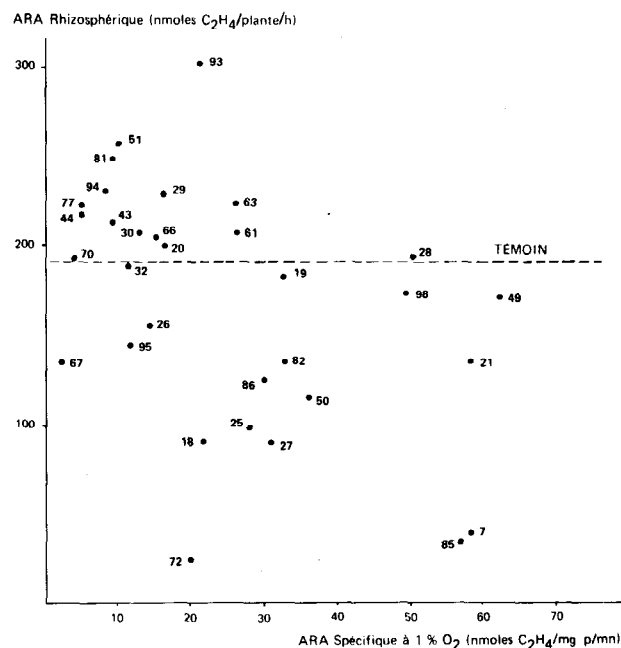


FIG. 2. - Introduction de diverses souches d'*Azospirillum* dans la rhizosphère du riz sur le sol de Bel-Air : ARA rhizosphérique en fonction de l'activité spécifique de ces souches à 1 % de  $O_2$ . Abscisses : ARA spécifique à 1 %  $O_2$  (nmoles  $C_2H_4$ /mg P/mn) ; Ordonnées : ARA rhizosphérique (nmoles  $C_2H_4$ /plante/heure).

1 % d'oxygène, et l'ARA rhizosphérique. Cependant, cette corrélation ne s'est pas vérifiée sur sol gris de Casamance.

C'est sans doute au niveau des caractères physico-chimiques du sol, de la plante elle-même et surtout de la microflore native qu'il faut chercher les raisons qui rendent une souche plus performante qu'une autre lors de l'inoculation. La rhizosphère est un milieu biologique d'une grande complexité dont l'équilibre est régi par une multitude de facteurs susceptibles d'interagir les uns avec les autres. Parmi ces facteurs, les interactions microbiennes jouent probablement un rôle majeur dans la composition de la microflore. L'étude de ces interactions pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes biologiques qui se déroulent au niveau de la rhizosphère.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM, le 31 janvier 1980.

## BIBLIOGRAPHIE

- BIGGINS (D.R.) and POSTGATE (J.R.), 1969. - *J. Gen. Microbiol.* 56 : 181-193.
- BOUREAU (M.), 1977. - Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude de l'exsudation racinaire du riz. *Cahier ORSTOM, sér. Biol.* vol. XII, n° 2 : 75-82.
- DOBEREINER (J.), DAY, (J.M.), 1975. - Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen sites. First symposium N<sub>2</sub> - fixation, Washington State Univ. : 518-538.
- DOBEREINER (J.), MARRIEL, (I.E.), NERY (M.), 1976. - Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*, Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22 : 1464-1473.
- GAUTHIER (D.), 1978. - Etude de la fixation de l'azote chez *Azospirillum brasiliense*. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle de Microbiologie. PARIS VII.
- LAKSHMI KUMARI (M.), KAVIMANDAN (S.K.), SUBBA RAO (N.), 1976. - Occurrence of nitrogen fixing *spirillum* in roots of rice, sorghum, maize and other plants. *Ind. J. Exp. Biol.* 14 : 638-639
- LOWRY (O.H.), ROSE BROUGH (N.J.), FARR (A.L.) and RANDALL (R.J.), 1951. - Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- NAYAK (D.N.) RAJARAMAMOHAN RAO (V.), 1977. - Nitrogen fixation by *spirillum* sp from rice roots. *Arch Microbiol.* 115 : 359-360.
- POSTGATE (J.R.), 1972. - In : Norris, J. Rand Ribbons D.W. (Eds). *Methods in Microbiology*, vol. 6. B. : 343-356. Academic Press, New York.
- RAIMBAULT (M.), RINAUDO (G.), GARCIA (J.-L.), BOUREAU (M.), 1977. - A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 9 : 193-196.
- UMALI-GARCIA (M.), HUBBELL (D.H.), GASKINS (M.H.), 1978. - Process of infection of panicum maximum by *spirillum lipoferum* (Environmental Role of Nitrogen fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria. *Ecol. Bull.* (Stockholm) 26 : 373-379.